

# NKG2D及其配体在消化系统肿瘤中的研究进展

万娟, 李国华

万娟, 李国华, 南昌大学第一附属医院消化科 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 30760086

作者贡献分布: 本课题由李国华设计; 万娟撰写; 李国华审校。

通讯作者: 李国华, 教授, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科. liguohua98@sohu.com

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2009-09-07 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

## Advances in understanding the role of NKG2D and its ligands in digestive system tumors

Juan Wan, Guo-Hua Li

Juan Wan, Guo-Hua Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nan Chang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760086

Correspondence to: Professor Guo-Hua Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Center Street, Nan Chang 330006, Jiangxi Province, China. liguohua98@sohu.com

Received: 2009-09-07 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

## Abstract

Natural killer group 2D (NKG2D) is a C-type lectin-like activating receptors on natural killer (NK) cells. The ligands for NKG2D are frequently expressed on the surface of inflammatory cells and tumor cells, but are rarely detected in healthy cells and tissues. In recent years, some studies have proved that there is decreased expression of NKG2D but increased expression of its ligands in tumor cells. NKG2D-mediated antitumor response plays an important role in innate immunity. More and more researchers believe that NKG2D and its ligands have great value for early identification, diagnosis and treatment of tumors. In this article, we will review recent discoveries concerning the role of NKG2D and its ligands in signal transduction and tumor immunity, especially in digestive system tumors.

**Key Words:** NKG2D; Digestive system tumors; Immune surveillance; Immune escape

Wan J, Li GH. Advances in understanding the role of

NKG2D and its ligands in digestive system tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(31): 3233-3236

## 摘要

NKG2D为NK细胞表面的C型凝集素样活化性受体, 其配体主要表达于炎性细胞和肿瘤细胞表面, 在正常细胞表面很少表达甚至不表达。近来实验证实肿瘤细胞中, NKG2D表达下调, 而其可溶性配体的表达明显增加, NKG2D介导的抗肿瘤反应在天然免疫中起重要作用。越来越多研究者认为NKG2D及其配体对肿瘤的早期识别、诊断及治疗研究具有重要意义。本文就NKG2D及其配体的介绍、信号传导、肿瘤免疫, 特别是消化系统肿瘤中的研究现状和诊治中的应用等方面作一综述。

**关键词:** NKG2D; 消化系统肿瘤; 免疫监视; 免疫逃逸

万娟, 李国华. NKG2D及其配体在消化系统肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3233-3236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3233.asp>

## 0 引言

NKG2D(natural killer group 2D)是20世纪90年代发现的免疫受体, 可表达于多种免疫细胞上, 参与适应性及固有性免疫应答, 调节自然杀伤(natural killer, NK)细胞、T细胞、巨噬细胞、树突状细胞的功能。NKG2D配体为HLA-I类相关基因产物, 在人类和鼠类中有所不同, 但相同的是这些分子在正常的细胞不表达或低表达, 却在应激细胞、肿瘤细胞及病原体感染细胞上表达上调, 且研究证实表达NKG2D配体的多种肿瘤和肿瘤细胞系对NK细胞的免疫杀伤有较高的敏感性, 表达NKG2D配体的肿瘤细胞更易被机体清除。这为肿瘤的早期诊断及免疫治疗带来了新希望, 在此我们就NKG2D在消化系统肿瘤方面的研究现状进行了回顾。

## 1 NKG2D及其配体

1.1 NKG2D NKG2D属于NKG2家族, 在人类由位于12p12.3-p13.1(鼠类位于6号染色体)的NK基因

## 背景资料

NKG2D是NK细胞表面的活化性受体, 属于NKG2家族, 其配体主要表达于应激细胞和肿瘤细胞表面, 很少表达甚至不表达于正常细胞表面, NKG2D介导的抗肿瘤反应在天然免疫中起重要作用。消化系统肿瘤的发病率长期居高不下, 使NKG2D及其配体在消化系统肿瘤的早期识别、诊断及免疫治疗等方面具有重要价值。

## 同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科; 张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

### 相关报道

Guerra *et al*通过敲除NKG2D编码基因,首次在基因水平证明了NKG2D在原发性肿瘤中有重要的免疫监视作用. Park *et al*通过多元RT-PCR检测,发现胃肠道肿瘤组织较周围邻近组织中的NKG2D配体的表达水平明显增高,因此认为此多元RT-PCR可能成为一种有效诊断胃肠道肿瘤的方式.

复合体中的klrk1编码,为II型膜蛋白,相对分子质量为42 kDa,是多种免疫细胞表面的C型凝集素样受体,在NK、 $\gamma\delta^+$  T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞介导的对肿瘤和感染的免疫反应起重要作用.

1.2 NKG2D配体 迄今为止,人们已经发现了多种NKG2D配体,人类NKG2G的配体有MHC-I类相关分子MICA、MICB和另一类MHC-I类相关分子ULBP. 鼠类中与NKG2D相结合的是次要组织相容性抗原H260、视黄酸可诱导蛋白(Rae1)、H60、Mult1等,他们表达于多种肿瘤细胞表面.

人类MIC基因定位于6号染色体短臂的MHC I类基因区, MICA和MICB编码区有84%的同源序列,而与经典I类分子仅有28%-30%的同源性. 其具有高度多态性,主要是胞外区有50个位点的氨基酸变化不定<sup>[1]</sup>, MICA有54个等位基因, MICB也有17个等位基因<sup>[2]</sup>. MIC分子有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$  3个胞外结构域,一个跨膜区和一个羧基胞质区. 与经典MHC I类分子明显不同的是, MICs的分子折叠、结构稳定性及其在细胞表面的表达均不需要结合抗原肽和 $\beta 2$ 微球蛋白的辅助<sup>[3]</sup>. 在正常人体内MIC分布仅局限于胃肠道上皮、内皮细胞以及成纤维细胞. 而在感染、肿瘤以及器官移植受体组织细胞中都有MIC的表达.

ULBP即人巨细胞病毒蛋白UL16的结合蛋白,同样属于MHC-I类相关分子家族, ULBP基因家族由10个成员组成,其中6个编码潜在功能的糖蛋白,他们定位于6q24.2-6q25.3长臂近末端,接近于人类相当位置是鼠H2环绕的t复合体. 在对该蛋白家族和小鼠蛋白进行相关性对比中,发现这个亚染色体区域类似于鼠10号染色体片段,即MHC-I相关视黄酸早期转录场所<sup>[4]</sup>. 不同ULBP分子有50%-60%的相同氨基酸序列,与MIC和MHC-I类分子之间大约有25%的序列同源. ULBP结构均带有MHC-I类分子样 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 结构域,但是缺乏免疫球蛋白样 $\alpha 3$ 结构域,同样也不与 $\beta 2$ 微球蛋白结合. 其中ULBP1、ULBP2、ULBP3和RAET1L都是通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)与膜靶向联接的,而ULBP4、RAET1E和RAET1G有跨膜区和胞质区,无需和GPI结合<sup>[5]</sup>. 与MIC相比, ULBP表达更为广泛,可以表达于多种细胞、组织、肿瘤.

小鼠体内,视黄酸早期转录因子1(retinoic acid early transcript 1, Rae1)和组织相容性抗

原60(histocompatibility 60, H60),他们和人的NKG2D配体MICA/MICB无相关性,表达于肿瘤及应激细胞表面. 小鼠ULBP样转录因子1(routine ULBP-like transcript 1, Mult1)在许多组织中都有表达,在一些小鼠肿瘤细胞株中也有表达. 当靶细胞异位产生Mult1时,能激活NK细胞和巨噬细胞的杀伤活性,有效地诱导抗肿瘤反应. Rae1、H60、Mult1三者之间大约有20%-28%相同氨基酸序列.

## 2 NKG2D 信号传导

NKG2D与其配体形成六聚体结构. 在鼠类, NKG2D存在2种截然不同的链接类型. NKG2D-L较NKG2D-S在N基末端多有13种氨基酸. NKG2D活化信号的传导主要依靠接头蛋白(adaptor protein)与受体结合. 最初报道, NKG2D-S与DAP10和DAP12链接,而NKG2D-L不与DAP12链接,但是最近研究表明DAP10和DAP12同等竞争不同种NKG2D. 这些研究都是在基于转染其受体的细胞中进行的,而在原代NK细胞方面的证据仍未见报道, NKG2D-L表达于静止NK细胞表面, NKG2D-S通过激活诱导. DAP10与DAP12的主要差别在于胞质区结构, DAP12含典型的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)Yxx(L/I)x11Yxx(L/I)序列,通过酪氨酸激酶磷酸化后,激活SyK、ZAP-70. 而DAP10不含ITAM,但含与CD28胞质段类似的YxxM基序,即SH2功能区,可与磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的p85亚基结合,通过PI3K可以活化下游分子<sup>[6]</sup>.

在CD8<sup>+</sup> T细胞,缺乏DAP12的表达, NKG2D与DAP10特异性结合. 敲除小鼠DAP10基因后,小鼠NK细胞表面NKG2D分子表达降低,而CD8<sup>+</sup> T细胞上则不再表达NKG2D,其抗肿瘤应答也受到损伤,说明DAP10有助于NKG2D的表达,且能通过其他途径抗肿瘤免疫作用<sup>[7]</sup>. Zompi *et al*<sup>[8]</sup>发现NKG2D/DAP10可以直接使活化的鼠NK细胞脱颗粒,产生细胞毒作用,但不引起细胞因子的表达. 在人类是否也存在这种现象尚需进一步研究. 而抑制PI-3K的活性可以干扰NK细胞释放的穿孔素(perforin)和粒酶B(granzyme B)趋向靶细胞,从而阻止NK细胞杀伤及溶解靶细胞.

NKG2D还可作为协同刺激分子传递第二信号增强其他活化性受体对NK细胞的激活作用<sup>[24]</sup>. NKG2D配体ULBP结合NKG2D后有多种下游信号分子发生变化,如Ca<sup>2+</sup>流动,磷酸化JAK2、STAT5、ERK、AKT等信号分子<sup>[9]</sup>.

### 3 NKG2D及其配体与肿瘤免疫

Guerra *et al*<sup>[7]</sup>通过敲除NKG2D编码基因, 发现鼠原发性肿瘤明显增多, 首次在基因水平证明了NKG2D在原发性肿瘤中有重要的免疫监视作用, 并且表明了NKG2D介导的免疫监视在限制肿瘤早期发生中的作用. 研究发现, 在肿瘤患者大量的肿瘤浸润和相对应的外周血T细胞中, NKG2D的表达显著减少<sup>[10]</sup>. NKG2D与配体结合后可激活NK细胞和CD8<sup>+</sup>效应细胞, 产生IFN- $\gamma$ 并对肿瘤细胞发挥细胞毒性作用, 从而引起NKG2D的免疫监视作用. 而肿瘤免疫逃逸与可溶性配体增加<sup>[11-15]</sup>; MICA与内质网蛋白-5(endoplasmic reticulum protein 5, ERp5)相互作用并通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)从细胞表面脱落, 引起NKG2D的下调或封闭; TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 降低NKG2D及其配体的表达等有关<sup>[6]</sup>.

### 4 消化系肿瘤中NKG2D研究现状

消化系肿瘤中NKG2D均明显下调. 胃癌患者NKG2D较健康者明显降低<sup>[12]</sup>. NK细胞对肝癌细胞有较强的细胞毒效应, 加入抗NKG2DpAb后, 可显著抑制NK细胞对HepG2细胞的细胞毒效应<sup>[16]</sup>. CD8<sup>+</sup> T细胞表面NKG2D表达的下调程度与胃癌的分期、分化程度相关<sup>[17]</sup>. 结肠癌细胞上的MIC通过Fas配体激动NKG2D介导的细胞杀伤作用<sup>[18]</sup>, 通过下调NKG2D配体来逃避机体的免疫监视<sup>[19-20]</sup>.

消化系肿瘤及癌前病变中可溶性MICA/B表达升高. 有学者检测发现慢性肝病和原发性肝癌患者的血清可溶性MICA/B的水平明显高于健康志愿者, 且与肝脏损害程度和是否合并肿瘤都明显相关<sup>[21]</sup>. MICA/B不仅表达于HCC组织而且也表达于肝硬化的肝脏, 经肝动脉栓塞治疗显著降低了血清可溶性MICA的水平, 并且增加了NK细胞及CD8<sup>+</sup> T细胞表面NKG2D的表达. 王山川的研究中, 胃癌患者血清sMICA明显高于健康对照组, 且胃癌患者血清sMICA水平的高低与胃癌发展阶段和转移程度相关<sup>[20]</sup>. Marten *et al*<sup>[22]</sup>研究发现胰腺癌细胞表达MIC及患者血清中可溶性MIC升高水平与肿瘤的分期及分化程度相关, 可溶性MIC通过直接削弱NK和 $\gamma\delta$ T的细胞杀伤性降低NKG2D介导的抗胰腺癌的肿瘤免疫, IFN- $\alpha$ 可能部分是通过上调MIC的表达而非降低可溶性MIC的释放来辅助胰腺癌的治疗的. 抗肿瘤药物表柔比星则可通过下

调金属蛋白10的表达来抑制可溶性MICA分子的脱落, 从而达到治疗肝细胞癌的目的<sup>[23]</sup>.

消化系肿瘤中配体增加与基因启动子甲基化相关. 研究表明在甲基转移酶缺陷的HCT116大肠癌细胞中, 在大量免疫基因上调的同时, MHC基因HLA-A1/A2和ULBP2基因, 编码NKG2D活性配体, 并发现ULBP2启动子的去甲基化与ULBP2的表达增加密切相关<sup>[24]</sup>.

### 5 NKG2D在消化系肿瘤诊治中的应用

目前的一些研究涉及NKG2D在消化系肿瘤诊治中的应用, 提示NKG2D及其配体的相互作用可能清除肿瘤细胞, 或使肿瘤细胞逃避免疫杀伤, 肿瘤细胞表面配体的表达水平起关键作用. Park *et al*<sup>[25]</sup>通过RT-PCR检测, 发现胃肠道肿瘤组织较周围邻近组织中的NKG2D配体的表达水平明显增高, 因此认为此方式的多元RT-PCR可能成为一种有效诊断胃肠道肿瘤的方式. 还有研究人员以编码NKG2D配体H60和肿瘤相关抗原survivin/CEA的联合DNA疫苗治疗小鼠肿瘤, 发现联合应用的疫苗比单独应用肿瘤相关抗原或NKG2D配体的疫苗抗肿瘤能力明显增强<sup>[26]</sup>. 无疑NKG2D配体具有潜在治疗肿瘤价值, 编码NKG2D配体的DNA疫苗作为免疫佐剂可能是一种有效治疗肿瘤的方式. 另外, 抗肿瘤治疗可能有助于NKG2D介导的抗肿瘤免疫. Guerra *et al*<sup>[7]</sup>的研究说明癌症的免疫治疗中可能可以加入一些新的治疗性操作, 这些操作与NKG2D相关性肿瘤免疫有关. 但从致癌相关性的肉瘤模型中可以看出, 由于NKG2D相关性免疫监视的肿瘤易感性并不广泛, 所以这种基因治疗需要修饰而适合特定的肿瘤亚型. 而NKG2D相关的肿瘤靶向治疗有待进一步研究, 目前尚属空白.

### 6 结论

目前关于NKG2D的研究不断增多, 但还是有许多问题仍然有待于进一步的探索和证实. 首先对于NKG2D的下游信号传导尚不很清楚, 主要参与此途径的调节的分子也不清楚. 其次, 肿瘤细胞为什么表达导致自身死亡的MICA/B配体, 而正常细胞只有少部分细胞表达; 可溶性MICA/B虽然可以使肿瘤细胞产生免疫逃逸, 但他是否导致免疫细胞NKG2D下降, 具体机制又是什么? 第三, 是否有其他可溶性NKG2D配体参与肿瘤的免疫逃逸尚不清楚. 第四, 在消化系

**创新盘点**  
本文系统介绍了NKG2D及其配体, 相关信号传导, 总结了NKG2D及其配体在肿瘤免疫, 特别是消化系肿瘤早期诊断, 免疫治疗等方面的最新国内外研究进展. 这将为消化系疾病相关早期检测、免疫治疗试剂及相关肿瘤疫苗的开发提供理论依据.



**同行评价**  
本文能较好地反映国内外消化系统肿瘤基础研究水平,具有一定的科学性和参考价值。

肿瘤中,目前的研究基本局限在NKG2D及其配体MICA/B的表达研究,对其信号传导分子及其他配体等的研究很少。在临床上是否能成为早期诊断、疾病复发、治疗效果评价工具尚不清楚。虽然部分研究提示可能成为消化系统肿瘤治疗的靶点之一,但结果有待进一步验证和探索。

## 7 参考文献

- Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RN, Pei R, Lee J, Ozawa M. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol* 2006; 67: 683-691
- Ahmad T, Marshall SE, Mulcahy-Hawes K, Orchard T, Crawshaw J, Armuzzi A, Neville M, van Heel D, Barnardo M, Welsh KL, Jewell DP, Bunce M. High resolution MIC genotyping: design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens* 2002; 60: 164-179
- Holmes MA, Li P, Petersdorf EW, Strong RK. Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J Immunol* 2002; 169: 1395-1400
- Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clément O, Wicker S, Gilfillan S, Beck S, Trowsdale J, Bahram S. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 2002; 79: 114-123
- Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 129-135
- Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; 27: 5944-5958
- Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28: 571-580
- Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Di Santo JP, Lanier LL, Colucci F. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 2003; 4: 565-572
- Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002; 168: 671-679
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 734-738
- Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 2007; 282: 18922-18928
- Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2006; 118: 1445-1452
- 王义平. NKG2D配体在13种肿瘤细胞系中的表达及意义. *癌症* 2008; 27: 243-248
- Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 2006; 239: 22-30
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006; 118: 684-687
- 杨林, 刘映霞. 肝细胞癌NKG2D表达及对NK细胞细胞毒的影响. *医学临床研究* 2004; 21: 475-477
- Osaki T, Saito H, Yoshikawa T, Matsumoto S, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 382-387
- Ebert EC, Groh V. Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand. *Immunology* 2008; 124: 33-41
- 刘丹, 贾筱琴, 龚卫娟, 田芳, 李明春. 不同淋巴细胞亚群NKG2D的表达与结肠癌发病关系的研究. *实用临床医药杂志* 2008; 12: 47-50
- 王山川. 胃癌患者NK细胞活化性受体NKG2D及其可溶性配体MICA表达的初步研究. *山西医药杂志* 2008; 37: 427-428
- Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1643-1649
- Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gamma delta T cell cytotoxicity. *Int J Cancer* 2006; 119: 2359-2365
- Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 8050-8057
- Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M, Bunes A, Ruschhaupt M, Conrad J, Mang-Fatehi S, Stelniec I, Krapfenbauer U, Poustka A, Schäfer R. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 125: 1626-1639
- Park SW, Bae JH, Kim SD, Son YO, Kim JY, Park HJ, Lee CH, Park DY, Kim JY, Lee MK, Chung BS, Kim SH, Kang CD. Comparison of level of NKG2D ligands between normal and tumor tissue using multiplex RT-PCR. *Cancer Invest* 2007; 25: 299-307
- Zhou H, Luo Y, Lo JF, Kaplan CD, Mizutani M, Mizutani N, Lee JD, Primus FJ, Becker JC, Xiang R, Reisfeld RA. DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10846-10851