

Preparación y toxicidad *in vitro* de un conjugado entre el factor de crecimiento epidérmico y la adriamicina

C. MATEO DE ACOSTA Y A. LAGE

Instituto de Oncología y Radiobiología. Departamento de Bioquímica,
29 entre E y F. Vedado. Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1989

Aprobado en marzo de 1989

RESUMEN

La principal dificultad de la terapia del cáncer en la actualidad es la utilización de agentes tóxicos cuya actividad antitumoral no es específica. Por tal razón se ha pensado en la unión de agentes tóxicos como toxinas o drogas a factores de crecimiento, hormonas y anticuerpos monoclonales para lograr toxicidad específica sobre las células cancerosas.

En este trabajo se presenta la construcción de un conjugado mediante una unión covalente entre el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la adriamicina (ADM). El conjugado retiene la habilidad del EGF de reconocer sus receptores en células de carcinoma mamario, sin perder afinidad y la ADM retiene su toxicidad.

La toxicidad del conjugado fue revertida por adición de un exceso de EGF libre y fue dependiente de la cantidad de receptores de EGF presentes en la superficie celular.

SUMMARY

The main difficulty in current cancer therapy is the use of cytostatic agents which are not specific to cancer cells. One solution to this problem has been the binding of cytotoxic agents such as toxins or drugs, to hormones, growth factors and monoclonal antibodies, in order to obtain specific toxicity toward cancer cells.

In this study a hybrid molecule is presented using Epidermal Growth Factor (EGF) and Adriamycin (ADM) by means of a covalent bridge. The hybrid retained the same binding capacity to the Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in breast cancer cells, while there was no loss of toxicity of the conjugated ADM. The cytotoxicity of the conjugate was reverted by an excess of free-EGF and was dependent on the amount of EGF-R on the cell membranes.

INTRODUCCION

Hasta el presente, una de las mayores limitaciones de los agentes quimioterapéuticos conocidos es la falta de actividad antitumoral específica; la gran mayoría de las drogas antitumorales dañan la proliferación celular de cualquier célula normal o tumoral. La dosis requerida de estas drogas para un adecuado tratamiento del cáncer traen

consigo efectos colaterales no deseados, como mielotoxicidad, cardiotoxicidad y daños gastrointestinales.

Una de las posibilidades teóricas de resolver estos problemas es el uso de anticuerpos monoclonales (Davies *et al.*, 1976; Ghose *et al.*, 1972; Moolten *et al.*, 1975; Rowland *et al.*, 1985) como transportadores de moléculas tóxicas.

Se han realizado experimentos usando anticuerpos unidos a sustancias tóxicas, y se ha reportado que estas moléculas híbridas destruyen las células portadoras del antígeno que reconoce al anticuerpo monoclonal utilizado (Casellas *et al.*, 1981; Blythman *et al.*, 1983).

Algunos agentes citotóxicos, como radionúclidos, enzimas y antimetabolitos, han sido acoplados a anticuerpos. Estos conjugados retienen su actividad farmacológica e inmunológica (Ghose *et al.*, 1983).

Una de las grandes dificultades ha sido encontrar blancos específicos que puedan ser aplicados al tratamiento del cáncer. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) ha ganado interés entre los oncólogos, pues en algunos sistemas celulares, *in vitro*, la transformación maligna es acompañada por la liberación de péptidos parecidos al EGF, como por ejemplo los factores de crecimiento transformantes (TGF) (Todaro *et al.*, 1980). Además, el EGF tiene un rol regulador en el crecimiento del carcinoma mamario de ratón (Kurachi *et al.*, 1983).

Resultados alcanzados en nuestros laboratorios (Pérez *et al.*, 1984; Skood *et al.*, 1986), así como de otros (Fitzpatrick *et al.*, 1984) han demostrado la existencia de receptores de EGF en tumores humanos.

La alta expresión de receptores de EGF en tumores menos diferenciados, abre la posibilidad del uso del EGF como un transportador de drogas, toxinas o radionúclidos.

En el presente trabajo mostramos la preparación y el "testaje" *in vitro* de un conjugado entre el EGF y la adriamicina (ADM). El conjugado retiene la afinidad del EGF a su receptor de membrana, y la toxicidad de la adriamicina, y fue preferencialmente tóxico en células que contienen receptor de EGF.

MATERIALES Y METODOS

Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El EGF recombinante humano fue suministrado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba). La adriamicina (ADM) fue obtenida de farmitalia y el cloruro de doxorubicin-14C (s.a., 59 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) de la AMERSHAM.

El EGF murino fue aislado de la glándula submaxilar de ratón por extracción ácida, cromatografía de adsorción sobre Biogel P-10 y cromatografía de intercambio iónico en DEAE- celulosa (Savage y Cohen, 1972); mediante este procedimiento se obtuvieron cantidades de EGF puro, comprobado mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, gel filtración) y electroforesis en gel de policrilamida (PAGE).

El EGF murino fue radioyodado por el método de la cloramina T (Hunter *et al.*, 1972), obteniéndose un producto de actividad específica de 150-200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Líneas celulares

Se cultivaron células KB (carcinoma epidermoide humano) a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, en medio de cultivo Mc Coy's suplementado con 10 % de suero fetal inactivado y antibióticos.

Las células de carcinoma de mama, MDA-MB-231 y MDA-MB-134, fueron cultivadas en medio F12/DMEM en proporciones 1:1, en condiciones similares a las anteriores.

Preparación del conjugado EGF-ADM

La ADM y el EGF fueron unidos a través de sus grupos aminos utilizando el método del glutaraldehído. En un volumen final de 3 ml de Na_2HPO_4 0,2 M, pH = 10, se mezclaron 15 mg de ADM conteniendo 200 000 cpm de ^{14}C -ADM como trazador y 3 mg de EGF.

Después de una preincubación a temperatura ambiente por 5 minutos, se añadió el glutaraldehído (60 μl de una solución de 6,3 mg/ml).

Al cabo de 8 horas la reacción fue detenida por cromatografía en gel filtración en una columna de Biogel P-10 (0,6 x 58 cm) y las fracciones de 3 ml fueron evaluadas para conteo de radioactividad y unión al receptor del EGF.

Citotoxicidad *in vitro*

Las células fueron cultivadas en placas Costar (5×10^4 células/pozo) y se añadió el conjugado EGF-ADM, EGF o ADM libres a diferentes concentraciones en el medio de cultivo. Después de 72 horas a 37°C, se retiró el medio de cultivo y las células fijadas fueron lavadas dos veces con solución salina "bufereada" (PBS) y resuspendidas en NaOH 1 N. La proteína total fue medida por el método de Lowry (Lowry, 1951). Las proteínas totales de cada cultivo fueron relacionadas con las proteínas de los cultivos no tratados, controles (K). La dosis efectiva media (ED_{50}) fue definida como la concentración de la droga que reduce la cantidad de proteína de cada cultivo al 50 %. Cada punto fue realizado por triplicado.

Ensayo de la unión del EGF a su receptor de membrana

Se realizó un ensayo de competencia de la unión del EGF a su receptor de membrana (Macías *et al.*, 1985) usando EGF murino marcado con ^{125}I como trazador y células del tumor ascítico de Ehrlich como fuente de receptor para el EGF. El ensayo contiene de $1-2 \times 10^6$ células, 100 000 cpm de ^{125}I -EGF y 10 μl de cada fracción, en un volumen final de 50 μl de PBS, pH = 7,2 con 0,1 % de BSA. Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se detiene la incubación añadiendo 2 ml de PBS frío con posterior centrifugación a 1 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet fue lavado con PBS frío y se midió la radioactividad.

En cada experimento fue incluida una curva patrón de desplazamiento, con 10 concentraciones diferentes de EGF murino no marcado (desde 0,1 hasta 50 ng/ml). La unión no específica fue estimada en cada experimento, midiendo la unión de ^{125}I -EGF en presencia de 1 000 ng/ml de EGF no marcado.

Los datos experimentales fueron ajustados por regresión lineal entre la relación de la radioactividad enlazada en ausencia del material compitiendo (B/B_0), y el logaritmo de la dilución del EGF para las muestras, en este caso cada fracción.

Después del análisis estadístico, no hubo diferencia entre las pendientes de la curva patrón y la experimental, por lo que se estimó el contenido de EGF equivalente en las muestras interpolando en la curva patrón. Este método detecta cantidades de EGF por debajo de 0,5 ng/ml (concentración final de 80 pm).

Determinación de número de sitios receptores para el EGF

Los receptores de membrana para el EGF fueron medidos a través de la unión específica del ^{125}I -EGF a células KB, MDA-MB-134 y MDA-MB-231. Los detalles de la técnica han sido descritos en artículos anteriores (Pérez *et al.*, 1984; Skoog *et al.*, 1986).

RESULTADOS

Se realizaron ensayos preliminares para lograr buenas condiciones de acoplamiento entre el EGF y la ADM. Se demostró que la relación glutaraldehído:ADM no podía ser mayor que 2:1, para evitar la precipitación de la ADM, y que el pH de la reacción debe encontrarse por encima de 10.

A causa de la adsorción y retención de la ADM a las matrices de filtración en gel en cantidades apreciables, se saturó previamente la columna de Biogel P-10 con un exceso de ADM y se lavó varias veces la columna con el mismo buffer de elución, antes de cada experimento.

La mezcla de acoplamiento fue cromatografiada y mostró dos picos, seguidos por la radioactividad de la ^{14}C -ADM (figura 1). La actividad tipo EGF fue medida por un ensayo de inhibición de la unión del EGF a su receptor y coincidió con el primer pico de radioactividad correspondiente a la ^{14}C -ADM, cerca del volumen libre de la columna. Partiendo de la cantidad de radioactividad del primer pico, estimamos que solo una molécula de ADM se unió a cada molécula de EGF.

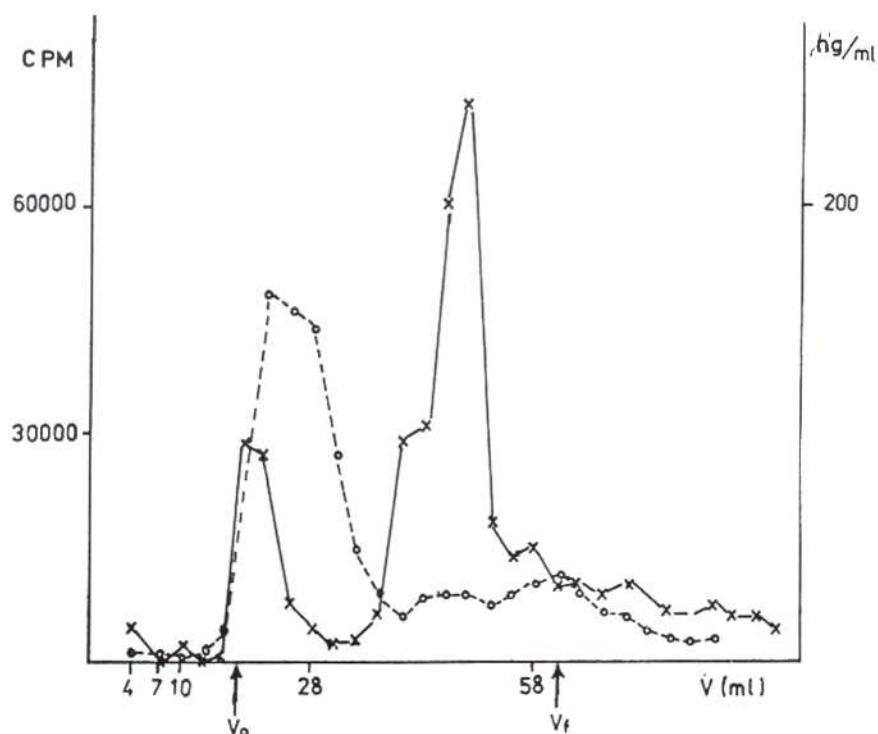


FIG. 1. Cromatografía en gel de filtración de la mezcla de conjugación EGF-ADM.

La mezcla de reacción fue fraccionada por una columna de Biogel P-10 (0,6 x 58 cm) y equilibrada en Na_2HPO_4 0,2 M, pH = 10 y eluida con la misma solución. Se colectaron fracciones de 3 ml y se monitorearon por conteo de radioactividad (^{14}C -ADM; x-x-x) y por un ensayo de inhibición de la unión del EGF a su receptor (o-o-o). La ordenada de la izquierda es la radioactividad de ^{14}C -ADM en cpm y la ordenada de la derecha es actividad tipo EGF medida por el ensayo de inhibición en ng/ml. La abscisa es el volumen de elución en mililitro. Las flechas indican el volumen muerto (V_0) y el volumen total (V_t) de la columna.

Se realizó un ensayo de inhibición de la unión del EGF a su receptor en células del tumor ascítico de Ehrlich para medir la actividad tipo EGF, y el conjugado EGF-ADM mostró curvas de desplazamiento paralelas a la del EGF libre, lo cual indica que el conjugado se enlaza a la membrana de las células que tienen receptores de EGF con la misma afinidad que el EGF libre (figura 2). Para ver el efecto citotóxico del conjugado, utilizamos tres líneas celulares diferentes: las células KB, MDA-MB-231 y MDA-MB-134 que tienen 10^5 , 10^4 y 0 sitios de unión específicos para el EGF por célula, respectivamente.

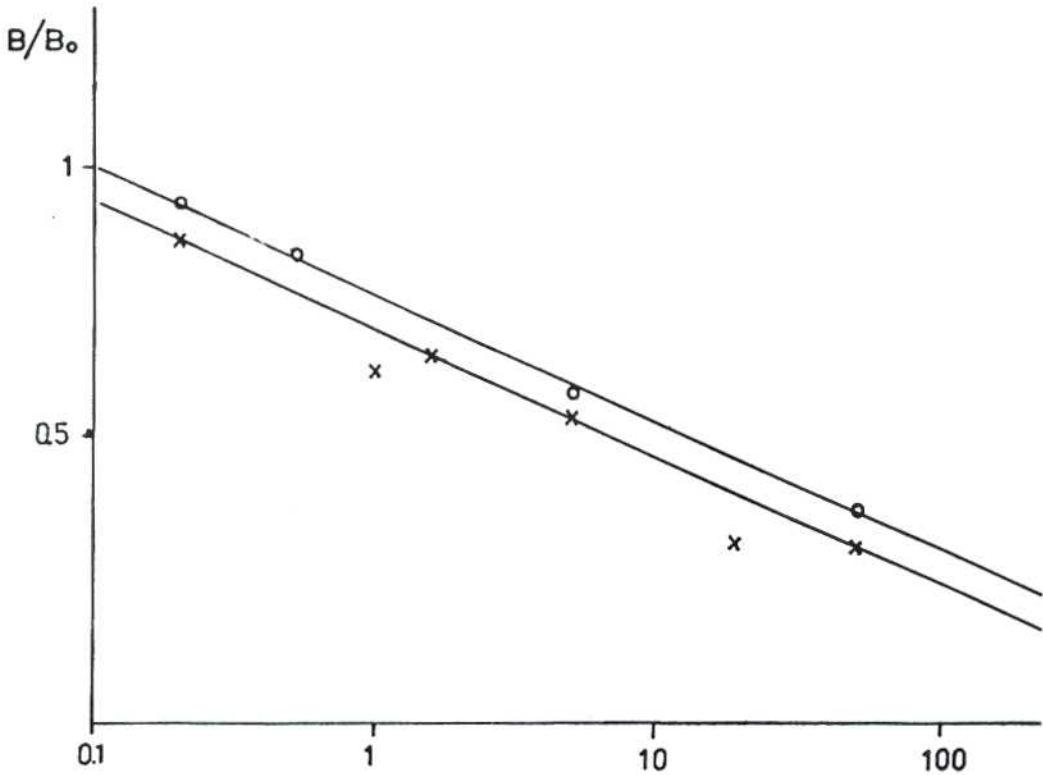


FIG. 2. Unión del conjugado EGF-ADM a receptores de EGF en la membrana celular. Esta figura muestra la inhibición de la unión del ^{125}I -EGF a células del tumor ascítico de Ehrlich, por cantidades crecientes de EGF murino no marcado (o-o-o) y por diluciones decrecientes del conjugado EGF-ADM (x-x-x). La ordenada es la radioactividad enlazada a las células, expresada como la relación de la radioactividad enlazada en ausencia del ligando competitivo (B/B_0). La abscisa es la concentración de EGF murino no marcado (ng/ml) en escala logarítmica.

El conjugado EGF-ADM mostró efectos citotóxicos *in vitro* sobre células KB (figura 3). La concentración requerida para inhibir la proliferación celular al 50 % en 72 horas de exposición a ADM libre fue de $1,72 \times 10^{-9}$ M, y para el conjugado EGF-ADM fue de $8,96 \times 10^{-9}$ M. Nótese en la figura 3 que en exceso de 50 veces de EGF libre protege a las células KB del efecto tóxico del conjugado, pero no del efecto tóxico de la ADM libre.

Nosotros verificamos que la toxicidad del conjugado EGF-ADM fue dependiente de la presencia del receptor de EGF en las células. En la figura 4, células de mama MDA-MB-231 (con 10^4 sitios de unión de EGF/célula) fueron más sensibles al efecto tóxico del conjugado, mientras que las células MDA-MB-134 que no presentan receptores para el EGF fueron resistentes a este efecto. Ambas células fueron igualmente sensibles al efecto tóxico de la ADM libre.

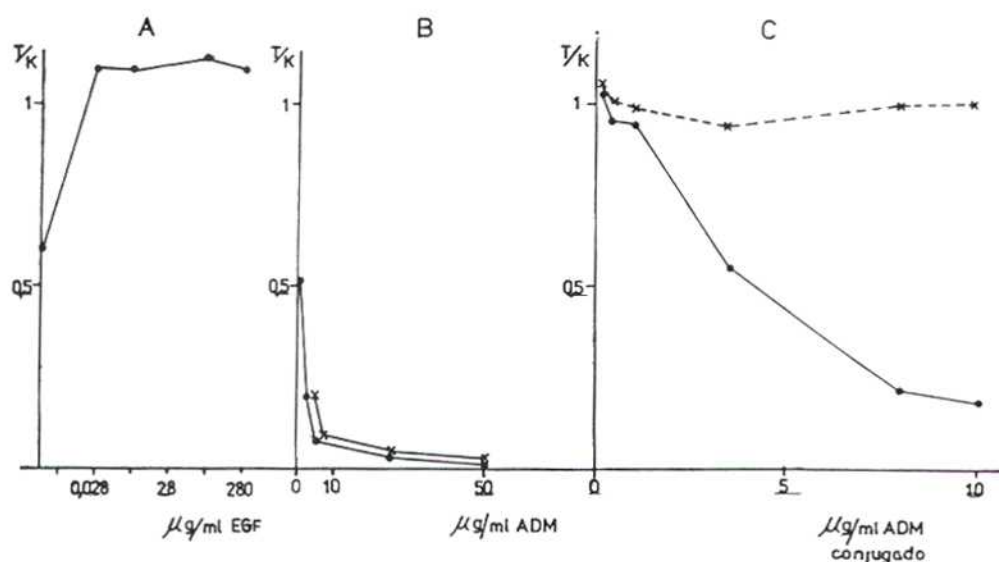


FIG. 3. Citotoxicidad *in vitro* en células KB.

La figura muestra el contenido de proteínas de los cultivos celulares en presencia de diferentes concentraciones de EGF, ADM o el conjugado EGF-ADM. La ordenada es la proteína total de cada cultivo (T), relacionada con la proteína total de los cultivos no tratados, controles (K). La abscisa es la concentración en $\mu\text{g/ml}$: a) efecto de la adición de EGF libre a los cultivos; b) efecto de la adición de ADM libre (o-o-o) y ADM en presencia de un exceso de 50 veces de EGF (x-x-x); c) efecto de la adición del conjugado EGF-ADM (o-o-o) y del conjugado en presencia de un exceso de 50 veces de EGF (x-x-x).

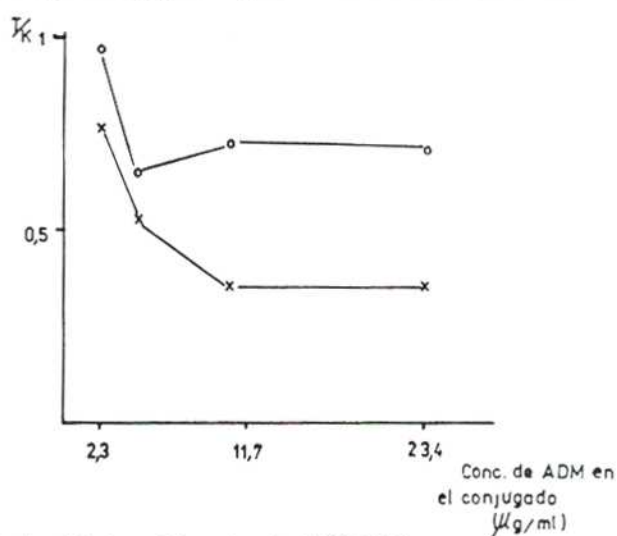


FIG. 4. Citotoxicidad selectiva del efecto del conjugado EGF-ADM.

Se incubaron 5×10^4 células MDA-MB-231 (x-x-x) y MDA-MB-134 (o-o-o) por pozo durante 72 horas a 37°C en presencia del conjugado EGF-ADM. La capa de células fue lavada dos veces y resuspendida en NaOH 1N, y se determinó el contenido de proteína total. La ordenada indica la proteína total de cada cultivo (T), relacionada con la proteína total de los cultivos controles no tratados (K). La abscisa es la concentración de ADM en el conjugado.

DISCUSION

La unión de agentes tóxicos a macromoléculas para lograr la unión específica de estas drogas o toxinas a células cancerosas ha sido evaluada por varios laboratorios (Page *et al.*, 1984).

La mayoría de los esfuerzos han sido concentrados en la conjugación de anticuerpos monoclonales a drogas anticáncer (Kanellos *et al.*, 1985; Annon *et al.*, 1979) o a toxinas de plantas (Sundan *et al.*, 1982; Thorpe *et al.*, 1982). Nosotros utilizamos recientemente una toxina hemolítica con este propósito (Avila *et al.*, 1987, aceptada en *International Journal of Cancer*).

Creemos, además, que es teóricamente posible utilizar el EGF como componente de especificidad, partiendo de resultados de nuestro laboratorio (Pérez *et al.*, 1984; Skood *et al.*, 1986), así como de otros (Fitzpatrick *et al.*, 1984), que demuestran cuáles células de carcinoma humano contienen receptores de EGF y que la cantidad de receptores de EGF es incrementada en los tumores menos diferenciados.

Sabemos también que la presencia de receptores para el EGF en tumores es un marcador de mal pronóstico (Macías *et al.*, 1987). Conociendo esto, creemos que drogas unidas al EGF, serían moléculas con relativa especificidad hacia los carcinomas menos diferenciados, que son la mayoría de las neoplasias malignas en la práctica clínica.

Teniendo en cuenta un estudio realizado por nosotros de biodistribución del EGF (Mateo de Acosta *et al.*, 1987), que demuestra que aun en animales portadores de tumores de alta expresión de receptores de EGF, se acumulan cantidades significativas de EGF en el hígado, excluye el uso de isótopos y toxinas (Cowley *et al.*, 1980), como elementos tóxicos para el uso del EGF *in vivo*. Por tanto, el uso del EGF en ensayos de este tipo puede hacerse uniendo esta molécula a drogas ciclo-dependientes. Creemos especialmente atractiva la ADM, ya que uno de los principales blancos de su acción tóxica son el corazón y la médula ósea y ninguno de estos dos órganos presentan receptores para el EGF.

De acuerdo con esto, preparamos una molécula híbrida entre el EGF y la ADM por el método de glutaraldehído. El hecho de que sólo una molécula de ADM por molécula de EGF fuera acoplada significa, probablemente, que solo el amino-terminal del EGF, que es el más reactivo de esta molécula, está involucrado en la reacción.

En el conjugado, el EGF retiene su habilidad para reconocer los receptores sin perder afinidad y la ADM retiene su toxicidad, aunque con cierta pérdida de la misma (la ED₅₀ del conjugado es 5 veces más alta que la de la ADM libre).

La toxicidad del conjugado pudo ser revertida por un exceso de EGF libre y fue dependiente de la densidad del receptor en la superficie celular. Ambos hechos indican que el mecanismo del efecto tóxico del conjugado involucra su unión a los receptores de EGF.

La pérdida parcial de la actividad de la mitad tóxica en el conjugado, comparado con la de la droga o toxina libre, es un hecho general de este tipo de moléculas híbridas (Youle, 1980; Bjorn, 1985; Olsnes, 1982).

El hecho de que la relación EGF:ADM fuera solamente de 1:1, puede ser una desventaja de nuestro conjugado para el tratamiento de tumores *in vivo*; usualmente en las moléculas híbridas construidas utilizando anticuerpos monoclonales como componente de especificidad, pueden ser unidas más de dos moléculas de drogas o toxinas por molécula de anticuerpo monoclonal (Bjorn, 1985; Tsukasaki, 1985).

En estos momentos nosotros evaluamos el efecto *in vivo* de este conjugado y tenemos en perspectiva hacerle modificaciones químicas al EGF con vistas a aumentar la cantidad de moléculas de ADM acopladas a la molécula del EGF.

REFERENCIAS

- ANNON, R. (1979). "Antitumor antibodies as carriers for anticancer drugs", en: *Tumor-associated antigens and their specific immune response*. Eds. F. Spreafico y R. Arnon, p. 287. Academic Press, New York.
- AVILA, A.D.; C.M. MATEO DE ACOSTA y A. LAGE (1987). *A new immunotoxin built by linking haemolytic toxin to monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes* (aceptado por International Journal of Cancer, 42, 568-571).
- BJORN, M.J.; D. RING y A. FRANKEL (1985). *Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer*. Cancer Research, 45: 1214-1221.
- BLYTHMAN, H.E.; P. CASELLAS y D. GROSS (1983). *Immunotoxins, hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells*. Nature 93: 280.
- CASELLAS, H.; H.E. BLYTHMAN y J.P. BROWN (1981). *Specific killing of human and mouse tumor cells by immunotoxins*. Protides of the biological fluids 29: 927.
- COWLEY, D.B. y H.R. HERCHMAN (1980). *Epidermal Growth Factor-toxin. A chain conjugate: EGF-ricin A is a potent toxin while EGF-Diphtheria fragment A is non toxic*, Cell 22: 563-570.
- DAVIES, D.A.L. y G.O. O'NEILL (1976). *Specific cancer therapy by drugs attached to tumor specific antibodies*. Ahm. New York. Acad. Sci., 277: 670.
- FITZPATRICK, S.; J. BRIGHTWELL; J. WITLIF; G. BARROWS y G. SCHULTZ (1984). *EGF binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen and progesterin receptor*. Cancer Research 44: 3448-3453.
- GHOSE, T.L.; S.T. NORWELL; A. GUCLU; D. CANERON; A. BADWITHA y A.S. MCDONALD (1972). *Immunotherapy of cancer with chlorambucil-carrying antibody*. Brit. Med. J., 3: 495.
- GHOSE, T.L.; H. BLAIR y P.N. KULKARNI (1983). *Preparation of antibody linked cytotoxic agents*. Methods in Enzymology 93: 280.
- HUNTER, W.M. y F.C. GREENWOOD (1972). *Preparation of iodine-¹³¹I labelled human growth hormone of high specific activity*. Nature 194: 495-496.
- KANELLOS, B.; G.A. PIETERZ y F.C. MC KENZIE (1985). *Studies of methotrexate monoclonal antibody conjugates for immunotherapy*. J.N.C.I., 75, No. 2.
- KURACHI, H. y S.O.T. OKAMOTO (1983). *Evidence for the involvement of the sub-maxillary gland EGF in mouse mammary tumorigenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 5940-5943.
- LOWRY, D.H.; N.H. ROSEBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 191: 175-195.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985). *Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico. II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares*. Interferón y Biotecnología 2: 115-127.
- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; T. HAGERATROM; C. KLINTEMBERG; R. PEREZ y L. SKOOG (1987). *Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinomas*. Anticancer Research (Aceptado en marzo 12, 1987).
- MATEO DE ACOSTA, C.M.; E. JUSTIZ; L. SKOOG y A. LAGE (1987). *The biodistribution of radioactive EGF in normal and tumor bearing mice*. (Anticancer Research, aceptado).
- MOOLTEN, F.L. (1975). *Antitumor effect of antibody diphtheria toxin conjugates. Immunotherapy with conjugates directed against tumor antigens induced by simian virus 40*. J. Nat. Cancer, 55: 473.
- OLSNES, S. y A. PIHL (1982). *Toxic lectins and related proteins in molecular action of toxins and viruses*. P. Cohen y S. Van Heyningen, eds., Elsevier Biomedical Press. New York, 51: 106.
- PAGE, M.; F. DELORME; F. LAFONTAINE y L. DUMAS (1984). *Chemotherapy with Daunorubicin anti CEA conjugates in human colon adenocarcinoma*. Seminary in Oncology 11, N° 4 suppl. 3, December.
- PEREZ, R.; M.R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *EGF-receptor in human breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment 4: 189-193.
- ROWLAND, G.F.; G.J.O. O'NEILL y D.A.L. DAVIES (1985). *Suppression of tumor growth in mice by a drug antibody conjugate using a novel approach to linkage*. Nature 255: 487.
- SAVAGE, R. y S. COHEN (1972). *Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization*. J. Biol. Chem. 24: 7609-7612.

- SKOOG, L.; A. MACIAS; E. AZAVEDO; J. LOMBARDEO y C. KLINTEMBERG (1986). *Receptors for EGF and estradiol and thymidine-kinase activity in different histological subgroups of human mammary carcinomas*. *J. Cancer* **54**: 271-276.
- SUNDAN, A.; S. OLSNES; K. SANDVIGN y A. PIHL (1982). *Preparation and properties of chimeric toxins prepared from the constituent polypeptides of Diphtheria toxin and ricin*. *Journal of Biological Chemistry* **116**: 9793-9799.
- THORPE, P.E.; D.C. EDWARDS y A.J.S. DAVIES (1982). *Monoclonal antibody toxin conjugates: antibodies in clinical medicine*. London, Academic Press, pp. 167-201.
- TODARO, G.J. y C. FRYLING (1980). *Tumor growth factor produced by certain human tumor cells. Polypeptides that interact with EGF-receptor*. *Proc. Acad. Sci.*, **72**: 5258-5262.
- TSUKAZOKI, K.; E.G. HAYMAN y E. RUOSLAHTI (1985). *Effects of ricin A chain conjugates of monoclonal antibodies to human α -fetus protein and placental alkaline phosphatase on antigen-producing tumor cells in culture*. *Cancer Research* **45**: 1834-1838.
- YOULE, R.J. y D.M. NEVILLE (1980). *Anti-Thy 1.2 monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins*. *Cancer Research* **45**: 1214-1221.