

Milena Kowalewska-Celejewska<sup>1</sup>,  
Maria Skrzypkowska<sup>2</sup>,  
Jolanta Myśliwska<sup>2</sup>,  
Janusz Siebert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Międzyuczelniane Uniwersyteckie Centrum Kardiologii, Katedra Medycyny Rodzinnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Gdański Uniwersytet Medyczny

# Angiogenina i czynniki proangiogenne jako marker i cel terapii nowotworowych

## Angiogenin and proangiogenic factors as a marker and target of anticancer therapy

### STRESZCZENIE

Angiogeneza jest procesem, w którym komórki śródbłonna migrują, proliferują i tworzą nowe naczynia krwionośne. Wiele czynników stymulujących angiogenezę zostało zidentyfikowanych, a ich ekspresję i rozmieszczenie powiązano z licznymi chorobami. Angiogenina jest jednym z najistotniejszych białek zaangażowanych w proces angiogenezy. Jej stężenie w tkankach czy krwi zmienia się w fizjologicznych i patologicznych procesach. Wyniki uzyskane z badań angiogeniny wskazują na jej znaczenie prognostyczne w chorobach nowotworowych. Istotna rola angiogeniny w proliferacji i migracji śródbłonna sugeruje, iż białko to jest dobrym celem molekularnym do tworzenia nowych terapii.

Forum Medycyny Rodzinnej 2012, tom 6, nr 2, 68–73

słowa kluczowe: angiogenina, angiogeneza, nowotwór, endothelium

### ABSTRACT

Angiogenesis is a process in which endothelial cells migrate, proliferate and form new blood vessels. Numerous angiogenic stimulators have been identified and their expression and distribution have been associated with numerous diseases. Angiogenin is one of the most important proteins involved in a process of angiogenesis. It's tissue and blood levels alter during various physiological and pathological conditions. The most studied pathological state, in regard to angiogenin, concern malignant diseases. Many researches indicate high prognostic value of this protein. The essential role of angiogenin in mediating endothelium's proliferation, migration suggests that protein is also good molecular target for drug development.

Forum Medycyny Rodzinnej 2012, vol 6, no 2, 68–73

key words: angiogenin, factor, angiogenesis, cancer, endothelium

#### Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Janusz Siebert  
Międzyuczelniane Uniwersyteckie Centrum Kardiologii, Katedra Medycyny Rodzinnej, Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 2, 80–211 Gdańsk  
tel.: (058) 349–15–75  
e-mail: jsiebert@gumed.edu.pl

**A**ngiogeneza to proces polegający na powstawaniu naczyń krwionośnych na bazie już istniejących. W stanach niepatologicznych rzadko dochodzi do tworzenia nowych naczyń — przykładem fizjologicznej angiogenezy jest proces tworzenia naczyń podczas gojenia się ran czy regeneracji naczyń śluzówki macicy podczas cyklu menstruacyjnego. Neowaskularyzacja ma również miejsce w wielu stanach patologicznych. W chorobach nienowotworowych jest odpowiedzią naczyniową na niedotlenienie i zapalenie — przykładem takiego stanu mogą być astma czy przewlekłe zapalenie przewodu pokarmowego [1–3].

Angiogeneza ma jednak szczególne znaczenie przede wszystkim w procesach nowotworowych. Uważa się, że wzrost guza nie jest możliwy bez angiogenezy, gdyż nowe naczynia krwionośne dostarczają substancji odżywczych i tlenu pierwotnym guzom nowotworowym, jak i guzom przerzutowym [3].

Proces angiogenezy jest modulowany przez wiele czynników. Szczególnie istotną rolę przypisuje się czynnikom proangiogennym, takim jak: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), zasadowy i kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF/aFGF, *acid/basic fibroblast growth factor*), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *platelet-derived growth factor*), metaloproteinazy oraz angiogenina [2, 4].

Proces angiogenezy jest wieloetapowy. Rozpoczyna się on od pobudzenia komórek śródbłonka i wazodylatacji naczyń. Na tym etapie kluczową rolę odgrywa VEGF. Kolejnym procesem jest destabilizacja naczyń i degradacja błony podstawnej — oba procesy są zależne między innymi od metaloproteinaz. Następnie dochodzi do proliferacji, migracji w kierunku chemoatraktantów i adhezji komórek endotelialnych w przestrzeni okołonaczyniowej. Za proliferację komórek odpowiadają: VEGF, angiopoetyny, angiogenina, FGF. Ostatnim etapem jest tworzenie i stabilizacja nowego naczynia,

utworzonego przez komórki śródbłonka, otaczające komórki mezenchymalne oraz komórki mięśniówki gładkiej. W regulacji ostatniego etapu angiogenezy biorą udział: VEGF, integryny, angiopoetyny oraz receptory kinazy tyrozynowej — są one niezbędne do utworzenia stabilnych połączeń śródbłonka z komórkami otaczającymi [2].

### ANGIOGENINA

Jednym z czynników biorących udział we wczesnym etapie angiogenezy jest angiogenina. Angiogenina (RNaza 5) jest rozpuszczalnym białkiem o masie 14 kDa, złożonym z 123 aminokwasów. Należąc do nadrodziny rybonukleaz (RNaz), wykazuje aktywność względem podjednostek 18S i 28S rRNA, choć warto zaznaczyć, iż aktywność katalityczna angiogeniny jest niewielka. Syntetyzowana jest głównie przez komórki wątroby, ale także fibroblasty, monocyty oraz nabłonek jelita grubego. Przyjmuje się, że główną funkcją fizjologiczną białka jest neowaskularyzacja podczas gojenia ran [2, 5, 6].

Angiogenina jest wykrywalna w stosunkowo wysokim stężeniu w surowicy osób zdrowych — jej stężenie waha się od 250 do 360 ng/ml [2]. Najistotniejszą różnicą w strukturze RNazy 5, względem pozostałych przedstawicieli nadrodziny RNaz, jest brak czterech mostków disulfidowych. Zmiana ta ma bardzo istotne konsekwencje fizjologiczne — dzięki niej białko wykazuje zdolność do pobudzania śródbłonka do tworzenia nowych naczyń. Co ciekawe, działanie to wymaga obecności substratu w odległej strukturalnie kieszeni katalitycznej [2, 7]. Niezbędna dla aktywności proangiogennej białka obecność RNA w osoczu wynika z apoptotycznej lub nekrotycznej śmierci innych komórek [8].

Stymulacja proliferacji komórek śródbłonka przez angiogeninę wynika z bezpośredniego wiązania białka do receptora powierzchniowego. Wiązaniu temu towarzyszy zmiana konformacji białka, pozwalająca na wiązanie substratu — RNA. Powstający



**Angiogeneza to proces polegający na powstawaniu naczyń krwionośnych na bazie już istniejących**



**Jednym z czynników biorących udział we wczesnym etapie angiogenezy jest angiogenina. Angiogenina (RNaza 5) jest rozpuszczalnym białkiem o masie 14 kDa, złożonym z 123 aminokwasów. Należy do nadrodziny rybonukleaz (RNaz)**



**Stymulacja proliferacji komórek śródbłonna przez angiogenezę wynika z bezpośredniego wiązania białka do receptora powierzchniowego**



**Stymulacja proliferacji komórek śródbłonna i komórek mięśniówki gładkiej naczyń przez angiogenezę, wynika z aktywacji różnych szlaków sygnałowych**



**Istnieją także dowody, że angiogenezę reguluje angiogenezę poprzez bezpośredni wpływ na organizację cytoszkieletu**

kompleks angiogenina–receptor ulega internalizacji i translokacji do jądra. Kompleks ten jest akumulowany w jąderku, gdzie reguluje między innymi transkrypcję rRNA czy biogenezę rybosomów. Oba procesy mają kluczowe znaczenie dla zwiększonej syntezy białek podczas intensywnej proliferacji śródbłonna [9].

Angiogenina reguluje funkcjonowanie komórek również na ścieżce zewnątrzkomórkowej, aktywując szlaki odmiennych kinaz, w zależności od rodzaju komórek — na przykład ERK1/2 (*signal-related kinase 1/2*) w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępkowej (HUVEC, *human umbilical vein endothelium cells*) czy SAPK/JNK (*stress-associated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*) w ludzkich komórkach mięśniówki gładkiej aorty (HuASMC, *human umbilical artery smooth muscle cells*). Warto więc zwrócić uwagę na fakt, że stymulacja proliferacji komórek śródbłonna i komórek mięśniówki gładkiej naczyń przez angiogenezę, wynika z aktywacji różnych szlaków sygnałowych [2].

Angiogenina reguluje proces neowaskularyzacji także poprzez bezpośredni wpływ na migrację komórek śródbłonna. Jej działanie wynika z wiązania wydzielonego białka do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *extracellular matrix*), co ułatwia adhezję i rozsiew komórek śródbłonna. Z drugiej strony, łącząc się z aktyną na powierzchni śródbłonna i ulegając dysocjacji jako kompleks aktyna–angiogenina, białko stymuluje tkankowy aktywator plazminogenu (tPA, *tissue plasminogen activator*) do produkcji plazminy. Ta z kolei degraduje lamininę i fibronektynę błony podstawnej naczyń. Cały proces promuje inwazję i migrację śródbłonna. Istnieją także dowody, że angiogenina reguluje angiogenezę poprzez bezpośredni wpływ na organizację cytoszkieletu [10].

Angiogenina może także potencjalnie regulować ekspresję genów, jako że wykazuje zdolność bezpośredniego wiązania do DNA [11].

Obecnie istnieje stosunkowo niewiele publikacji dotyczących angiogeniny. Wiedza o tym białku może przynieść olbrzymią korzyść zarówno pacjentom leczonym z powodu choroby niedokrwiennej serca, w której to istotne jest tworzenie, z udziałem czynników proangiogennych, krążenia obocznego, jak i pacjentom z rozpoznaną chorobą nowotworową.

### ANGIOGENINA A NOWOTWORY

Dużo badań dotyczących angiogeniny koncentruje się na udziale tego białka w rozwoju i rozsiewie nowotworów, jako że oba te procesy są ściśle uzależnione od angiogenezy — odpowiednie ukrwienie guza jest warunkiem koniecznym dla jego rozwoju oraz późniejszego rozsiewu [3].

Istnieją badania wskazujące wręcz na produkcję angiogeniny przez komórki nowotworowe [2].

Podwyższone stężenie białka zaobserwowano w wielu typach nowotworów: raku piersi, jelita grubego, nerki czy czerniaku złośliwym, co może sugerować ścisły związek angiogeniny z rozwojem nowotworu. Co więcej, wykazano, iż stężenie RNazy 5 może korelować ze stopniem agresywności nowotworu [2, 3, 12].

Istnieją liczne prace sugerujące dużą wartość prognostyczną stężenia angiogeniny. Co więcej, w przypadku wielu typów nowotworów oznaczenie stężenia RNazy 5 może służyć do monitorowania skuteczności terapii. Warto jednak podkreślić, iż wyniki prowadzonych badań nie są jednoznaczne — rokowania pacjentów są lepsze w grupach o wyższym lub niższym stężeniu białka, w zależności od typu nowotworu; część prac wskazuje na brak powiązania między zawartością angiogeniny w surowicy, osoczu czy tkance nowotworowej a przeżywalnością chorych. Rezultaty niektórych analiz wydają się wręcz sprzeczne.

Montero i wsp. sugerują, iż u pacjentek z pierwotnym rakiem piersi niższe stężenia białka w cytozolu wiążą się z gorszym rokowa-

niem [13]. Z kolei późniejsze badania wykonane przez grupę Sheen-Chena wskazują na tendencję mniejszej przeżywalności u osób z wysokim stężeniem RNazy 5 [14]. Różnice te mogą wynikać z odmiennej liczby pacjentów w analizowanych grupach, przeprowadzenia oznaczeń na innym materiale biologicznym czy różnym czasie prowadzenia obserwacji.

Analiza uzyskiwanych wyników jest również trudniejsza, ze względu wielokierunkowe działanie angiogeniny. Dużą rolę w utrzymaniu homeostazy procesów neowaskularyzacji odgrywają hormony steroidowe. W przypadku wcześniej przytoczonego nowotworu piersi, Nilsson i wsp. wykazali korelację stężenia estradiolu (E2) z zawartością RNazy 5 w zdrowej tkance w warunkach *in vivo*. W testach *in vitro* E2 regulował stężenie zewnątrzkomórkowej formy białka. Badacze ci zaobserwowali także znaczący wzrost *in vivo* angiogeniny w tkankach zmienionych nowotworowo. Fakt ten może mieć ogromny wpływ na wybór metody leczenia [15].

Część badań sugeruje duże znaczenie prognostyczne stężenia angiogeniny w połączeniu z innymi czynnikami — VEGF czy bFGF [2, 12].

Gessner i wsp. zaproponowali oznaczenie czynników proangiogennych VEGF, angiogeniny oraz bFGF w wydychanym powietrzu w celu wczesnej oraz przesiewowej diagnostyki niedrobnokomórkowego raka płuc. W badaniach tych wykazano, że stężenia wszystkich trzech białek w próbkach są istotnie wyższe u nowozdiagnozowanych pacjentów w porównaniu z grupami kontrolnymi. We wcześniejsze badania z udziałem pacjentów z nowotworem płuc wskazują na gorsze rokowania dla osób z wyższym stężeniem tych czynników [16].

### **ANGIOGENINA W CHOROBYCH NIENOWOTWOROWYCH**

RNaza 5 może odgrywać znaczącą rolę również w innych jednostkach chorobowych niż nowotwory. Różnice w stężeniu białka ob-

serwuje się u osób z otyłością, reumatoidalnym zapaleniem stawów czy retinopatią cukrzycową [2]. Zmiany stężenia angiogeniny są stwierdzane w zależności od stopnia wyrównania i zaawansowania cukrzycy typu 2 określanej stężeniem hemoglobiny A1C [17]. U chorych z retinopatią cukrzycową wykazano różnice stężenia angiogeniny w surowicy i w cieple szklistym, również w porównaniu ze stężeniem angiogeniny w surowicy osób zdrowych oraz osób z cukrzycą bez powikłań [18].

Angiogeninę łączy się również z rozwojem neurodegeneracji — choroby Parkinsona czy stwardnienia bocznego zanikowego. Z tą grupą chorób powiązane są mutacje genu kodującego angiogeninę [19].

### **TERAPIA ANTY-ANGIOGENNA**

Proces angiogenezy nie jest do końca poznany, ale prowadzone badania sugerują, iż może on stanowić podstawę do rozwinięcia nowych metod leczenia we współczesnej onkologii. Antyangiogenna terapia celowana może stać się jedną z metod walki z rozwojem nowotworu. Zahamowanie procesu unaczynienia guza może odbywać się na wielu etapach — począwszy od zahamowania proliferacji śródbłonna, poprzez blokowanie degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej, skończywszy na hamowaniu aktywności molekuł adhezyjnych. Najnowsze badania sugerują jednak, iż najważniejszą rolę terapeutyczną może odgrywać hamowanie początkowych etapów procesu.

Już na początku lat 90. XX wieku przeprowadzono testy na modelu mysim, badające możliwość zahamowania wzrostu guzów nowotworowych poprzez blokowanie aktywności angiogeniny. Badania prowadzono zarówno z wykorzystaniem inhibitorów rybonukleazy oraz przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko angiogeninie. Rezultaty owych badań są różnorodne — od redukcji neowaskularyzacji guza, spowolnienia jego wzrostu, do zmniej-



**Zmiany stężenia angiogeniny są stwierdzane w zależności od stopnia wyrównania i zaawansowania cukrzycy typu 2 określanej stężeniem hemoglobiny A1C**

szczenia liczby ognisk przerzutów. Większość analiz dotyczących wykorzystania antagonistów angiogeniny koncentruje się na raku piersi, prostaty oraz jelita grubego [2].

Warto w tym miejscu wspomnieć o specyficznym inhibitorze angiogeniny — ludzkim łożyskowym inhibitorze rybonukleazy (hRI, *human ribonuclease inhibitor*) — który jest obecny praktycznie we wszystkich tkankach. Wykazuje on silne działanie hamujące zarówno aktywność katalityczną, jak i proangiogenną angiogeniny. Należący do rodziny bogatych w leucynę białek cytoplazmatycznych, hRI jest jednak, mimo dużej efektywności w hamowaniu działania RNazy 5, pozbawiony znaczącego potencjału w testach *in vivo*. Natywne białko, składające się z 460 reszt aminokwasowych, jest zbyt duże i mało stabilne, by mogło być wykorzystane w celach terapeutycznych [2].

Stosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów angiogeniny zdaje się obiecującym narzędziem terapeutycznym. Transkrypcja rRNA, niezbędna do proliferacji i wzrostu komórek śródbłonna, podczas stymulacji różnymi czynnikami, jest bezpośrednio zależna od angiogeniny — udowodniono wiązanie białka do regionu promotorowego rybosomalnego DNA. Co więcej, ta mediowana przez nukleazę transkrypcja jest niezbędna do zapoczątkowania procesu angiogenezy indukowanej także czynnikami innymi niż sama angiogenina. Dlatego też białko to jest przez niektórych badaczy uznawane za nadrzędne w angiogenezie, a działanie inhibitorów rybonukleazy 5 ma hamować wzrost naczyń niezależne od źródła stymulacji [5, 20].

Najnowsze terapie przeciwnowotworowe, celujące w angiogeninę, koncentrują się na blokowaniu translokacji białka do jądra i wynikającym z tego hamowaniu transkrypcji rDNA. Terapia taka niesie ze sobą stosunkowo niskie ryzyko ciężkich skutków ubocznych, jako że translokacja angiogeniny dotyczy jedynie proliferujących komórek śródbłonna i komórek nowotworowych [5].

Tamoksyfen — antagonistą receptora estrogenowego — obniża stężenie wydzielonej angiogeniny w komórkach ER-pozytywnych (*estrogen receptor*) raka piersi. Mechanizm regulacji sekrecji RNazy 5 wynika w tym przypadku właśnie z blokady translokacji białka do jądra [15].

### INNE CZYNNIKI PROANGIOGENNE W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Oznaczenie stężenia innych niż angiogenina czynników regulujących proces neowaskularyzacji może również dostarczyć ważnych informacji prognostycznych. Co więcej, sugeruje się, iż znajomość zawartości tych czynników w wybranym materiale biologicznym może pomóc w wyborze optymalnej dla danego pacjenta terapii [3].

Czynniki proangiogenne stanowią obiecujący cel terapeutyczny. Przykładowo — terapia z wykorzystaniem przeciwciała anty-VEGF, w połączeniu ze standardową terapią, może przedłużać życie pacjentów z guzami złośliwymi [21] czy nowotworem jelita grubego [22].

To właśnie VEGF stanowi szczególnie interesujący cel terapii anty-angiogennej ze względu na aktywność już w pierwszych etapach procesu neowaskularyzacji.

### ■ Konkluzja

Dostępne dane wskazują na istnienie zależności między nowotworzeniem naczyń guza a rokowaniem chorego. Jednakże nadal brakuje badań prospektywnych, do których włączani byłiby pacjenci z rozpoznaną chorobą nowotworową. Istnieje potrzeba prowadzenia badań klinicznych, które oceniałyby stężenie czynników proangiogennych przed planowanym zabiegiem operacyjnym, chemio i/lub radioterapią. Fakt, iż większość czynników proangiogennych jest rozpuszczalnymi białkami, których stężenia można oznaczać w sposób nieinwazyjny, sprawia, iż badania takie stają się bardziej dostępne dla badaczy i mniej obciążające pacjenta.

## PIŚMIENNICTWO

1. Hoshino M., Takahashi M., Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 295–301.
2. Tello-Montoliu A., Patel J., Lip G. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 1864–1874.
3. Rykała J., Przybyłowska K., Majsterek I. i wsp. Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathol. Oncol. Res.* 2011; 17: 809–817.
4. Huang Z., Bao S. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 463–470.
5. Chen L., Hu G. Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010; 46: 648–653.
6. Marioni G., Marino F., Blandamura S. i wsp. Neo-angiogenesis in laryngeal carcinoma: angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. *Histopath.* 2010; 57: 535–543.
7. Bond M., Vallee B. Isolation and sequencing of mouse angiogenin DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 171: 988–995.
8. Houge G., Doskeland S.O. Divergence towards a dead end? Cleavage of the divergent domains of ribosomal RNA in apoptosis. *Experientia* 1996; 52: 963–967.
9. Moroianu J., Riordan J.F. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cell is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1677–1681.
10. Wei S., Gao X., Du J., Su J., Xu Z. Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics. *PLoS ONE* 2011; 6: e28797.
11. Hu G., Xu C., Riordan J.F. Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J. Cell. Biochem.* 2000; 76: 452–462.
12. Fang S., Repo H., Joensuu H., Orpana A., Salven P. High serum angiogenin at diagnosis predicts for failure on long-term treatment response and for poor overall survival in non-Hodgkin lymphoma. *Eur. J. Cancer* 2011; 47: 1708–1716.
13. Montero S., Guzman C., Cortes-Funes H., Colomer R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 2161–2168.
14. Sheen-Chen S., Eng H., Chen W., Chou F., Chen H. Serum level of angiogenin in breast cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 4769–4771.
15. Nilsson U., Abrahamsson A., Dabrosin C. Angiogenin regulation by estradiol in breast tissue: tamoxifen inhibits angiogenin nuclear translocation and antiangiogenin therapy reduces breast cancer growth in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3659–3669.
16. Gessner C., Rechner B., Hammerschmidt S. i wsp. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 68: 177–184.
17. Siebert J., Reiwer-Gostomska M., Myśliwska J. i wsp. Glycemic control influences serum angiogenin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33: 1829–1830.
18. Marek N., Raczyńska K., Siebert J. i wsp. Decreased angiogenin concentration in vitreous and serum in proliferative diabetic retinopathy. *Microvasc. Res.* 2011; 82: 1–5.
19. Steidinger T., Standaert D., Yacoubian T. A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2011; 116: 334–341.
20. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T. i wsp. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 445–456.
21. Norden A., Drappatz J., Wen P. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 1152–1160.
22. Ferrara N., Hillan K., Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 333: 328–335.