

# PROFIL DIFERENSIASI SEL Th-1 PADA PENDERITA TUBERKULOSIS

Nurul Hidayah<sup>1</sup> dan Sofia Fajarwati<sup>2</sup>

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya<sup>1</sup>  
Program Studi Imunologi, Program Pascasarjana, Universitas Airlangga Surabaya<sup>2</sup>

## ABSTRAK

Penyakit tuberkulosis (TB) disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Resiko penularan setiap tahun (*Annual Risk of Tuberculosis Infection = ARTI*) di Indonesia dianggap cukup tinggi dan bervariasi antara 1-2%. Pada daerah dengan ARTI 1%, maka diantara 100.000 penduduk, rata-rata terjadi 100 penderita tuberkulosis setiap tahun, dimana 50% penderita adalah BTA positif. Walaupun vaksin telah ada, namun prevalensi TB belum berkurang

*Mycobacterium tuberculosis* terhirup dalam bentuk aerosol droplet nuclei dan mencapai sekmen distant dari bronchoalveolar tree, terutama pada bagian bawah paru-paru. *M. tuberculosis* difagosit oleh makrofag alveolar. Makrofag ini mempunyai dua fungsi yaitu sebagai efektor antimikroba dan untuk respon sitokin proinflamatori.

Sel Th1 berasal dari sel T CD4+. Sel TCD4+ dapat berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Pemilihan jalur perkembangan ditentukan oleh sinyal dari sitokin yang diterima. *M. tuberculosis* merupakan bakteri intraselular. Pengenalan makrofag terhadap *M. tuberculosis* bisa melalui TLR-2, yang pada akhirnya akan menghasilkan molekul sitokin IL-12. Stimulasi dari sel NK juga didapatkan yaitu berupa IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  ini juga menstimulasi makrofag untuk menghasilkan IL-12. IL-12 adalah sitokin kunci untuk mengubah Th0 menjadi Th1 dan menginduksi *celluler mediated immunity* (CMI)

CMI sangat dibutuhkan untuk mengeradikasi bakteri. Hal ini dikarenakan antibodi akan sulit menjangkau *M. tuberculosis* yang sudah berada dalam sel. Oleh karena itu, Th1 yang mengawali induksi CMI lebih diperlukan dari pada Th2. Sehingga berbagai sel dan molekul yang dibutuhkan untuk diferensiasi Th0 menjadi Th1 juga sama pentingnya. LAM adalah salah satu komponen dinding sel *M. tuberculosis*. Karena berada dipermukaan, LAM sangat mungkin menjadi bagian yang pertama dikenali oleh sistem imun hospes. Dari beberapa penelitian LAM diketahui dapat meningkatkan diferensiasi sel T menjadi Th1.

Kata kunci : *Mycobacterium tuberculosis*, Th1, CMI, LAM

## PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) adalah disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Diperkirakan sekitar sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi oleh bakteri ini. Sekitar 75% pasien TB adalah kelompok usia yang paling produktif secara ekonomis (15-50 tahun). Di Indonesia, TB merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Jumlah pasien TB di Indonesia merupakan ke-3 terbanyak di dunia setelah India dan Cina dengan jumlah pasien sekitar 10% dari total jumlah pasien TB di dunia.

Resiko penularan setiap tahun (*Annual Risk of Tuberculosis Infection* = ARTI) di Indonesia dianggap cukup tinggi dan bervariasi antara 1-2%. Pada daerah dengan ARTI sebesar 1%, berarti setiap tahun diantara 1000 penduduk, 10 orang akan terinfeksi. Sebagian besar dari orang yang terinfeksi tidak akan menjadi penderita TB. Hanya 10% dari yang terinfeksi yang akan menjadi penderita TB. Dari keterangan tersebut diatas, dapat diperkirakan bahwa daerah dengan ARTI 1%, maka diantara 100.000 penduduk, rata-rata terjadi 100 penderita tuberkulosis setiap tahun, dimana 50% penderita adalah BTA positif. Walaupun vaksin telah ada, namun prevalensi TB belum berkurang.

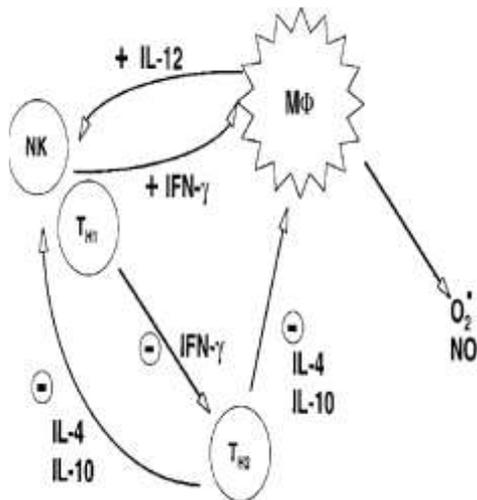
### Patogenesis tuberkulosis (TB)

*Mycobacterium tuberculosis* terhirup dalam bentuk aerosol droplet nuclei dan mencapai sekmen distant dari bronchoalveolar tree, terutama pada bagian bawah paru-paru. *M. tuberculosis* difagosit oleh makrofag alveolar. Makrofag ini mempunyai dua fungsi yaitu sebagai efektor antimikroba dan untuk respon sitokin proinflamatori. Neutrofil berakumulasi terlebih dahulu di daerah infeksi, tapi tidak mampu membunuh *M. tuberculosis* secara langsung. Makrofag dan neutrofil yang mati melepaskan butiran-butiran yang mengandung antigen *M. tuberculosis* atau mengeluarkan *M. tuberculosis*. Kedua bentuk tersebut dapat diambil oleh sel dendritik alveolar yang kemudian bermigrasi ke nodus limpa

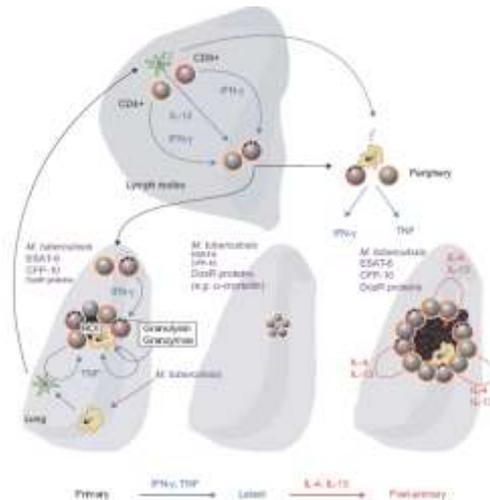
regional terdekat. Di sana mereka mempresentasikan antigen *M. tuberculosis* ke sel CD8+ T dan CD4+ T. Di nodus limpa, sel CD4+ dan CD8+ yang terstimulasi berdiferensiasi menjadi menjadi sel Th1 yang mensekresi IFN- $\gamma$  dan sel T sitotoksik. Granula-granula CD8+ akan mengakumulasi molekul seperti granzim dan granulin (Chan and Flynn, 2004). Pada saat yang bersamaan, sel B berdiferensiasi menjadi sel pensекреksi antibodi yang spesifik terhadap antigen *M. tuberculosis*. Akhir-akhir ini, sel T17 (yang mensekresi IL-17, IL-21, dan IL-22) serta sel T regulator (yang mensekresi IL-10 dan TGF- $\beta$ ) mempunyai andil dalam mengarahkan dan menyeimbangkan kekuatan penggerak respon imun seluler awal ini (Khader and Cooper, 2008; Kursar et.al., 2007). Sel-sel efektor spesifik terhadap *M. tuberculosis* memasuki peredaran darah dan dapat menuju daerah inflamasi seperti paru-paru. Pada tahap ini, respon *delayed tipe hypersensitivity* (DTH) di kulit atau darah mungkin positif (melalui tes kulit tuberkulin) dan nekrosis intragranulomatus mungkin terjadi. Kombinasi ini disebut kombinasi Ghon.

### Perkembangan Th1

Sel Th1 berasal dari sel T CD4+. Sel TCD4+ dapat berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Pemilihan jalur perkembangan ditentukan oleh sinyal dari sitokin yang diterima. *M. tuberculosis* merupakan bakteri intraselular. Pengenalan makrofag terhadap *M. tuberculosis* bisa melalui TLR-2, yang pada akhirnya akan menghasilkan molekul sitokin IL-12. Stimulasi dari sel NK juga didapatkan yaitu berupa IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  ini juga menstimulasi makrofag untuk menghasilkan IL-12. IL-12 adalah sitokin kunci untuk mengubah Th0 menjadi Th1 dan menginduksi *cellular mediated immunity* (CMI) (Abbas,2007).



Gambar 1: Jaringan sinyal sitokin dalam pembentukan Th1 dan Th2



Gambar 2: Mekanisme yang terjadi pada TB

Untuk menginduksi fase efektor CMI, Th1 harus bersentuhan langsung dengan fagosit atau sel yang terinfeksi. Oleh karena itu, Th1 akan bermigrasi ke alveolus, tempat *M. tuberculosis* menginfeksi. Migrasi ke daerah infeksi dapat dilakukan karena adanya molekul adesi yaitu endotelial selektin dan integrin pada daerah sekitar infeksi. Melokel adesi tersebut pembentukannya diinduksi oleh TNF- $\alpha$  dan IL-1. Th2 tidak mempunyai reseptor yang fungsional untuk mengikat molekul adesi tersebut (Abbas, 2007).

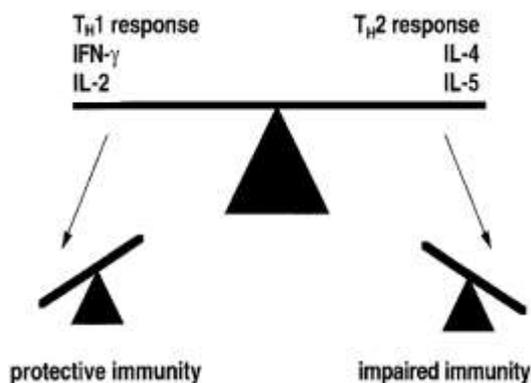
Keberadaan sel Th1 teraktivasi di daerah masuknya *M. tuberculosis* merubah perembesan secara mencolok. Th1 akan lebih banyak memproduksi sitokin dan kemokin yang mengakibatkan migrasi leukosit yang lebih besar. Migrasi ini membawa serta sel T efektor yang tidak spesifik terhadap *M. tuberculosis*. Sel T yang spesifik mengenal antigen *M. tuberculosis* akan meningkat afinitasnya terhadap molekul adesi dan akan tinggal untuk melakukan tugasnya, sedangkan yang tidak spesifik akan kembali ke nodus limpa (Abbas, 2007).

Sel-sel monosit tertarik dan berkumpul secara sangat spesifik dan membentuk granuloma, yaitu makrofag yang mengandung mycobacteria yang secara morfologi berubah menjadi sel 'epiteloid' dikelilingi oleh limfosit (Ehlers and Holscher, 2004). Hal ini memerlukan aktivasi makrofag yang efektif, mayoritas lewat IFN- $\gamma$ , dan molekul efektor antimikrobal. Hal ini termasuk ROI dan RNI yang dikirim ke fagolisosom.

CTL mengirimkan granulin dan molekul mycobakterisidal lainnya dalam tahap yang bergantung pada perforin ke makrofag. Respon sel T ini akan menyebabkan penurunan pertumbuhan, bahkan membunuh *M. tuberculosis*. Granuloma adalah jejas dinamis di mana sel terus diganti dan sel-sel baru masuk. Ketika sel dicegah masuk (misalnya dengan memblokir pembentukan molekul adesi atau dengan terapi yang menargetkan TNF- $\alpha$ ), struktur geanulomatus terpecah sehingga menyebabkan isinya tersebar, dalam granuloma, diasumsikan terdapat keseimbangan antara *M. tuberculosis* yang aktif membelah dan *M. tuberculosis* yang beradaptasi dengan stresor yang dibentuk dalam makrofag teraktivasi, yang tidak sepenuhnya menghancurkan *M. tuberculosis* tapi membatasi pertumbuhannya. Jadi *M. tuberculosis* diperkirakan memasuki tahap tidak bereplikasi (Gomez and McKinney, 2004). Karena tidak ada manifestasi klinis, kondisi

ini disebut 'laten'. Mycobacteria dihalangi tapi tetap ada dan hidup.

Studi oleh Lienhardt et.al. (2002) menunjukkan pasien yang menderita tuberkulosis memiliki kadar Th1 yang sangat rendah dibandingkan orang sehat, sedangkan kadar Th2nya lebih tinggi. Setelah diberi terapi selama 2-3 bulan, kadar Th1 meningkat sebanyak 4 kali lipat, sedangkan Th2 menurun menjadi 2/3 dari kadar awal. Hal ini menunjukkan efektor Th1 lebih dibutuhkan untuk membasmi *M. tuberculosis* dari pada Th2.



Gambar 3: Perbedaan peran Th1 dan Th2 pada TB

Mycobacteria telah berevolusi untuk mampu melakukan infeksi dan bertahan dalam sel hospes spesifik. Interaksi hospes-pathogen diperantarai oleh molekul spesifik pada dinding sel. Dinding sel Mycobacteria tersusun atas beragam komponen lipofilik seperti glikolipid mikoloil, lipomannan (LM)/lipoarabinomannan (LAM), lipopeptida, dan fosfatidilinositol manosida (PIMs) atau kardiolipin.

Akhir-akhir ini ada ketertarikan besar pada LAM. LAM adalah molekul amfifatik utama di komponen dinding sel mycobacteria dan dianggap sebagai yang berperan dalam efek imunoregulator dan anti-inflamatorinya yang luas, yang dapat mendukung mycobacteria untuk bertahan di dalam hospes. LAM berpengaruh sangat besar pada efek fisiologis.

Efek tersebut dimediasi dengan menekan produksi IFN- $\gamma$  sehingga akhirnya menghambat ekspresi gen yang diinduksi oleh IFN- $\gamma$ , termasuk penghambatan aktivasi makrofag, proliferasi sel T yang

diinduksi antigen, dan memangsa radikal bebas turunan oksigen. LAM berperan sebagai faktor virulensi yang bertanggung jawab untuk deaktivasi makrofag dengan *down-regulation* reseptor manosa dan berpengaruh juga pada fagositosis mycobacteria. Selain itu, PIM (yang dianggap sebagai prekursor LM dan LAM) diperkirakan merekrut sel NKT, yang berperan dalam respon awal granulomatus pada infeksi mycobacteria. (Ito et.al, 2008)

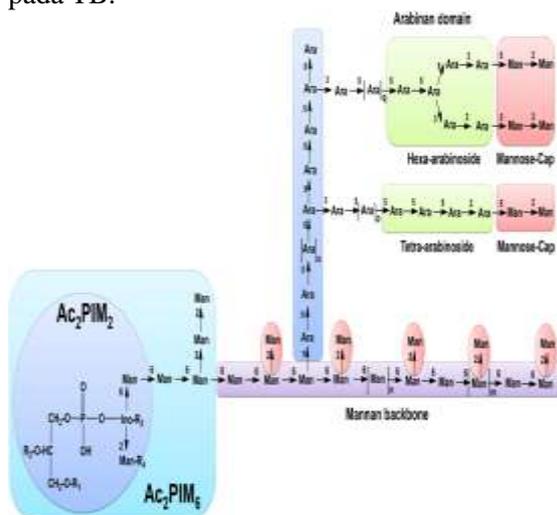
### Struktur LAM

LAM adalah sebuah kompleks lipoglikan yang tersusun dari D-mannan dan D-arabinan yang melekat pada fosfatidil inositol (PI) yang tertanam di membran sitoplasma pada selubung sel mycobacteria. Inti mannan adalah sebuah *backbone*  $\alpha 1 \rightarrow 6$  yang terhubung, yang tersubstitusi dengan sebuah residu  $\alpha$ -Man pada posisi 2, dan secara langsung melekat pada posisi 6 myo-inositol dari jangkang PI. (Ito et.al, 2008)

Porsi jangkang PI tidak dapat dipisahkan dari fosfatidilinositol terdimanosilasi (PIM<sub>2</sub>). Rantai asam lemak yang dominan adalah palmitat (C16:0) dan 10-metiloktadekanoat (tuberkulostearat, C19), dengan sejumlah kecil C14:0, C17:0, metil-C17:0 dan C18:0. PIM<sub>2</sub> dan fosfatidilinositol manosida lainnya (PIMs) diketahui membawa 4 rantai asam lemak, dengan tambahan asilasi pada manosa (Brennan and Ballou, 1967; Khoo et al., 1995a). LAM *M. tuberculosis* mempunyai 2 sampai 4 rantai asil pada daerah interaksi hidrofobik mereka (Leopold and Fischer, 1993). PIM<sub>2</sub> (atau mungkin PIM<sub>3</sub> dan PIM<sub>4</sub>) dapat diperpanjang menjadi sebuah  $\alpha 1-6$  mannan linier dengan panjang rantai sekitar 16 residu, dengan cara transfer berurutan residu  $\alpha$ -mannose dari manosa-GDP ke PI melalui enzim tertentu (Besra et al., 1997). Inti mannan LAM dari *M.tuberculosis* Erdman (Chatterjee et al., 1993) dan *M.bovis* BCG (Venisse et al., 1995) diduga bercabang banyak dan diperkirakan total terdapat sekitar 20 residu manosa, dengan keragaman panjang sebenarnya dan derajat percabangan.

Sementara inti mannan PI mungkin sepenuhnya terbenam dalam dinding sel,

arabinan dari LAM terekspos di permukaan dan secara langsung berhubungan dengan imunopatogenesis leprosi dan tuberkulosis (Brennan *et al.*, 1990). Rantai asil asam lemak pada semua mycobacteria sama, namun struktur rantai karbohidrat LAM berbeda-beda bergantung spesies. LAM dari *M.tuberculosis* strain Erdman, H37Rv, dan H37Ra, serta strain vaksin *M.bovis* BCG, tercap manosa dengan perpanjangan bervariasi antara 40–70% (Venisse *et al.*, 1993; Khoo *et al.*, 1995b). Cap manosa terdiri atas mono-, di-, dan trimer  $\alpha$ -D-mannosa (Man $\alpha$ 1" [2Man $\alpha$ 1]<sub>0,1,2</sub> ") secara langsung terhubung ke C-5 terminal  $\beta$ -D-Araf. Cap ini memungkinkan *M.tuberculosis* berikatan dengan reseptor manosa pada makrofag. LAM juga dapat berikatan dengan TLR dan secara fisik menyisipkan diri ke membran plasma, menginduksi peristiwa transduksi sinyal yang penting dalam respon imun hospes pada TB.



Gambar 4: struktur Man-LAM

### Pengenalan LAM oleh sel T

Pengenalan ManLAM oleh sel T tidak diperantarai molekul MHC tetapi oleh molekul CD1b. Molekul CD1 mempresentasikan glikolipid. Pada infeksi mycobacteria, CD1 memastikan presentasi glikolipid milik dinding sel micobacteria yang unik akan mengaktifkan sel T yang CD1-restricted (Barral & Brenner, 2007).

Molekul CD1 manusia diekspresikan oleh bermacam-macam antigen presenting cell (APC) dan dapat

dibagi ke dalam 3 kelompok yaitu: kelompok 1 adalah CD1a, CD1b, dan CD1c; kelompok 2 adalah CD1d; dan kelompok 3 adalah CD1e. CD1 kelompok 1 mempresentasikan lipid kepada populasi sel T tertentu. Ekspresi kelompok 1 pada APC myeloid manusia yang diisolasi agak sulit dideteksi, namun ekspresinya ditingkatkan setelah beberapa hari terinfeksi *M.tuberculosis* (Roura-Mir *et al.*, 2005). Hal ini menunjukkan peran presentasi antigen oleh CD1 kelompok 1 dalam ekspansi klonal sel T dan meningkatkan respon imun adaptif terhadap infeksi mycobacteria.

CD1b mengikat lipid termasuk PIM2 dan Man-LAM (Ernst *et al.*, 1998). Struktur molekul CD1 mirip dengan molekul MHC kelas I. Molekul CD1 menangkap bagian jangkar lipid (relatif non-spesifik), sedangkan molekul TCR mengenali bagian ujung karbohidrat hidrofilik antigen (spesifitas tinggi) (Moody *et al.*, 1997)

Pada percobaan yang dilakukan Ito *et al.* (2008), diperlihatkan bahwa LAM bersama dengan LM (LAM/LM) dari *M.bovis* BCG meningkatkan diferensiasi Th1 dengan 2 macam cara yaitu: a) berpengaruh langsung pada CD4+ naif (di bawah kondisi kultur Th1); dan b) berpengaruh secara tidak langsung melalui sel dendritik dengan menginduksi polarisasi Th1 dari Th2 (di bawah kondisi kultur Th2). Sepertinya LAM/LM menstimulasi sel dendritik melalui TLR2 dan memodifikasi keseimbangan diferensiasi Th1/Th2. Sepertinya LAM/LM memberikan efek pada CD4+ yang baru teraktivasi dan pada Th1 yang sedang berkembang (secara *in vitro*). LAM/LM mungkin langsung berikatan dengan TLR (2,5, dan 7/8) pada CD4+ dan menginduksi polarisasi ke arah Th1. Pada penelitian ini, baik LAM dan LM menunjukkan kemampuan untuk meningkatkan diferensiasi menjadi Th1.

### Kesimpulan

Karena *M.tuberculosis* adalah bakteri intraseluler, CMI sangat dibutuhkan untuk mengeradikasi bakteri tersebut. Hal ini dikarenakan antibodi akan sulit menjangkau *M.tuberculosis* yang sudah berada dalam sel. Oleh karena itu, Th1 yang

mengawali induksi CMI lebih diperlukan dari pada Th2. Sehingga berbagai sel dan molekul yang dibutuhkan untuk diferensiasi Th0 menjadi Th1 juga sama pentingnya.

LAM adalah salah satu komponen dinding sel *M. tuberculosis*. Karena berada dipermukaan, LAM sangat mungkin menjadi bagian yang pertama dikenali oleh sistem imun hospes. Dari beberapa penelitian LAM diketahui dapat meningkatkan diferensiasi sel T menjadi Th1.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S., 2007, *Cellular and Molecular Immunology*, 6<sup>th</sup> Ed., Philadelphia: Elsevier Inc.
- Barral, D.C. and Brenner, M.B., 2007, "CD1 antigen presentation: how it works", *Nat Rev Immunol*, 7: 929–941.
- Besra, G.S., Morehouse, C.B., Rittner, C.M., Waechter, C.J. and Brennan, P.J., 1997, "Early steps in the biosynthesis of LAM". *J. Biol. Chem.*, 272, 18460–18466
- Brennan, P.J. and Ballou, C.E., 1967, "The biosynthesis of mannophosphoinositides by *Mycobacterium phlei*". 242, 3046–3056.
- Brennan, P.J., Hunter, S.W., McNeil, M., Chatterjee, D. and Daffe, M., 1990, Reappraisal of the chemistry of mycobacterial cell walls, with a view to understanding the roles of individual entities in disease processes. In Ayoub, E.M., Cassell, G.H., Branche, W.C., Jr. and Henry, T.J. (eds.) *Microbial Determinants of Virulence and Host Response*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 55–75.
- Chan, J., and Flynn J., 2004, "The Immunological Aspects of Latency in Tuberculosis", *Clinical Immunology*, 110:2-12
- Chatterjee, D., Khoo, K.-H., McNeil, M.R., Dell, A., Morris, H.R. and Brennan, P.J., 1993, "Structural definition of the non-reducing termini of mannose-capped LAM from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry". *Glycobiology*, 3, 497–506.
- Ehlers, S. and Holscher, C., 2004. *DTH-associated pathology*. In: Kaufmann SH, Steward M, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Edn (Immunology volume). London, Arnold Publishers, pp. 705–730
- Ernst WA, Maher J, Cho S et al., 1998, "Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens". *Immunity* 8: 331–340.
- Gomez, J. E., McKinney, J. D., 2004, "M. tuberculosis Persistence, Latency, and Drug Tolerance", *Tuberculosis (Edinb)* 84: 29-44
- Ito, T., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Yamashita, M., Motohashi, S., Naka, T., Okamoto, Y., Fujita, Y., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I., and Nakayama, T., 2008, "Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172", *International Immunology*, 20:849–860
- Khader, S. A., Cooper, A. M., 2008, "IL-23 and IL-27 in Tuberculosis", *Cytokines*, 41:79-83
- Khoo, K.-H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J. and Chatterjee, D., 1995a, "Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan". *Glycobiology*, 5, 117–127.
- Khoo, K.-H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J. and Chatterjee, D., 1995b, "Inositol phosphate capping of the non-reducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. Mapping of the non-reducing termini of LAMs". *J. Biol. Chem.*, 270,

- 12380–12389.
- Kursar, M., Koch, M., Mittercrucker, H. W., et al., 2007, “Cutting Edge: Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of *Mycobacterium tuberculosis*”, *Journal of Immunology*, 178:2661-2665.
- Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, et al., 2002, “Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*”. *Eur J Immunol*, 32:1605-1613.
- Leopold, K. and Fischer, W., 1993, “Molecular analysis of the lipoglycans of *Mycobacterium tuberculosis*”. *Anal. Biochem.*, 208, 57–64.
- Moody DB, Reinhold BB, Guy MR et al., 1997, “Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells”. *Science* 278: 283–286.
- Roura-Mir C, Wang L, Cheng TY, Matsunaga I, Dascher CC, Peng SL, Fenton MJ, Kirschning C & Moody DB, 2005, “*Mycobacterium tuberculosis* regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2”, *J Immunol*, 175: 1758–1766.
- Venisse, A., Berjeaud, J.-M., Chaurand, P., Gilleron, M. and Puzo, G., 1993, “Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry”. *J. Biol. Chem.*, 268, 12401–12411.
- Venisse, A., Rivière, M., Vercauteren, J. and Puzo, G., 1995, “Structural analysis of the mannan region of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Heterogeneity in phosphorylation state”. *J. Biol. Chem.*, 270, 15012–15021.