

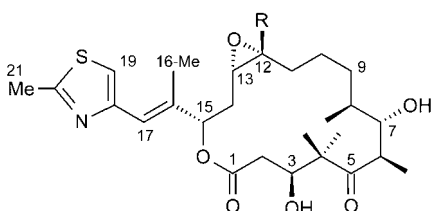
Lange gesucht – die bioaktive Konformation von Epothilon und seine Bindung im Tubulin

Dirk W. Heinz,* Wolf-Dieter Schubert und Gerhard Höfle*

Stichwörter:

Elektronenkrystallographie · Konformationsanalyse · Makrocyclen · Molecular Modeling · Naturstoffe

Vor knapp zehn Jahren entdeckten Bollag et al., dass die Cytotoxizität der Epothilone auf einer Hemmung der intrinsischen Dynamik des Tubulinsys-



Epothilon A: R = H
B: R = CH₃

tems beruht.^[1] Diese Schlüsselarbeit löste eine intensive chemische und biologische Bearbeitung der bis dahin wenig beachteten Substanzklasse aus, die bis heute anhält.^[2] Die Epothilone waren neben Taxol die ersten Naturstoffe, die Microtubuli stabilisieren. Diese Stabilisierung führt in den betroffenen Zellen zu einer weitgehenden Polymerisation des $\alpha\beta$ -Tubulins und löst dadurch einen apoptotischen Zelltod aus.^[1,3] Dieser für die klinisch sehr erfolgreichen Cytosta-

tika Taxol und Taxotere angenommene Wirkungsmechanismus^[4] sollte somit auch für die Epothilone gelten. Doch damit nicht genug: Die um mehr als eine Größenordnung höhere Aktivität und vor allem die unverminderte Wirkung auf multiresistente Tumorzellen^[1,3,5] weckten die Hoffnung, Epothilone könnten in Zukunft sogar die Taxane ersetzen – dies umso mehr, als die Epothilone aus Kulturen des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* in nahezu unbegrenzter Menge gewonnen werden können.^[6] Zurzeit werden mehrere natürliche, semi- und totalsynthetische Epothilone klinisch geprüft; von diesen ist das Epothilon-B-Lactam^[7] (Ixabepilone) am weitesten entwickelt (Phase III).^[8] Bis vor kurzem gab es jedoch zur Bindungssituation der Epothilone im Tubulin zwar zahlreiche spekulative Arbeiten, aber keine gesicherten Erkenntnisse. Dies hat sich mit der elektronenkrystallographisch ermittelten Struktur des Epothilon-A-Tubulin-Komplexes, die im Zentrum dieses Highlights steht, schlagartig geändert.^[9]

Bereits die frühe Beobachtung, dass Epothilon Tubulin-gebundenes Taxol verdrängen kann,^[1] legte eine gemeinsame Bindungsstelle oder zumindest überlappende Bindungsstellen im Protein nahe. Strukturelle Ähnlichkeiten, wie Epoxid- und Oxetanring, geminale Dimethylgruppen und bewegliche aromatische Seitenketten, beflügelten die Phantasie, und bald gab es eine Reihe von Modellen für einen den beiden Verbindungsgruppen gemeinsamen Pharmakophor. Basis für solche Überlegungen bildeten die bereits 1995 bekannte Festkörperstruktur von Epothilon B aus Dichlormethan^[10] und später die von Epothilon A und B aus Metha-

nol/Wasser (Abbildung 1 a).^[11] Während sich diese Strukturen im Makrolidteil außerordentlich ähnlich sind, nimmt die abgewinkelte Thiazolyl-Seitenkette, be-

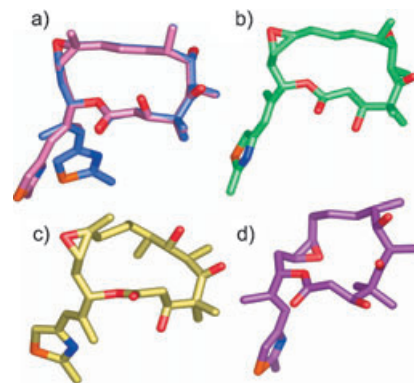


Abbildung 1. Raumstrukturen verschiedener Epothilone in unterschiedlichen physikalischen Umgebungen: a) röntgenographisch ermittelte Molekülstruktur von Epothilon B aus Dichlormethan/Petrolether^[10] (rosa), überlagert mit Epothilon A aus Methanol/Wasser^[11] (blau); b) NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur von Epothilon A in Gegenwart von Tubulin in wässrigem Medium;^[22] c) Konformation von Epothilon B im Komplex mit Cytochrom P450epoK;^[26] d) Konformation von Epothilon A im Komplex mit α -Tubulin in Zn²⁺-stabilisierten Schichten.^[9] Abbildung mit Pymol erstellt (<http://pymol.sourceforge.net>).

dingt durch ihre hohe Rotationsfreiheit, sehr unterschiedliche Konformationen ein; dies ließ sich in DMSO/Wasser NMR-spektroskopisch nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich, dass die bevorzugte Konformation des Makrocyclus in organischen Lösungsmitteln der im Kristall entspricht.^[10] Eine verfeinerte Analyse und das Molekülmodell von Taylor und Zajicek^[12] ergaben eine zweite, untergeordnete Konformation für das Ringsegment C3–C9, in der 7-

[*] Prof. Dr. D. W. Heinz, Dr. W.-D. Schubert
Division of Structural Biology
Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung (GBF)
38124 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-618-763
E-mail: dih@gbf.de
Prof. Dr. G. Höfle
Department of Natural Product Chemistry
Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung (GBF)
38124 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-618-1515
E-mail: g.hofle@gbf.de

OH und 8-Methyl axial vorliegen und 3-OH eine äquatoriale Position einnimmt.

Bei der Suche nach einem gemeinsamen Pharmakophor durch Modellierungsversuche wurde die Thiazolyl-Seitenkette des Epothilons meist mit einem der drei Phenylreste oder sogar dem 10-Acetylrest von Taxol überlagert.^[13–16] Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die C13-Seitenkette von Taxol für die Tubulinbindung nicht absolut notwendig ist, konnten die zahlreichen Varianten auf eine Homologie von Thiazolyl- und 2-Benzoylrest sowie von Taxangerüst und Makrolidring eingeengt werden.^[17] Entscheidende Hinweise auf gemeinsame Bindungsstellen im Tubulin lieferten kreuzresistente Tubulinmutanten, besonders von Thr274, Arg282, Gln292 und Ala231.^[18–20] Trotz dieser Informationen und der inzwischen bekannten Struktur des Taxol-Tubulin-Komplexes^[21] war es offenbar nicht möglich, die Konformation und Bindung von Epothilon im Tubulin eindeutig zu modellieren.

In einem alternativen Ansatz versuchten kürzlich Carlomagno et al.^[22] aus NMR-spektroskopischen Messungen in Gegenwart von Tubulin zunächst die Konformation des gebundenen Epothilons zu bestimmen. Unter der Annahme eines raschen Austausches von freiem und gebundenem Epothilon wurden Transfer-Kern-Overhauser-Effekte (Transfer-NOEs) und Torsionswinkel über eine Transfer-kreuzkorrelierte Relaxation ermittelt und als Basis für eine Kraftfeld-Rechnung verwendet. Die so für den gebundenen Zustand postulierte Konformation entspricht im Makrolidring bis auf das C2,C3-Segment den Festkörperstrukturen des freien Epothilons. Lediglich die 3-OH-Gruppe befindet sich in äquatorialer Lage, wie von Taylor et al.^[12] postuliert und in der Festkörperstruktur von Epothilon-A-N-oxid beobachtet.^[23] In der Seitenkette sind H-19/16-Me entsprechend der Festkörperstruktur aus Methanol/Wasser (Abbildung 1) *syn*-orientiert und im Einklang mit Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an Pyridin- und Benzimidazol-Analoga. Dass die beschriebenen NMR-Effekte tatsächlich auf Protein-gebundenes Epothilon A zurückgehen, belegen die Autoren mit einem Kontrollexperiment, bei dem zugesetztes Epothilon B wegen seiner etwa um den

Faktor 2 höheren Affinität zu Tubulin die Bindungsstellen dauerhaft besetzt und die für Epothilon A beobachteten Effekte aufhebt. Allerdings ist schwer zu verstehen, dass die vergleichsweise geringen Mengen Epothilon B in der Lösung^[24] dafür ausreichen und dass selbst ein 100-facher Überschuss von Epothilon A nicht zur Polymerisation des Tubulins führt. Gleichwohl haben wir es hier mit einer Konformation zu tun, die Epothilon A in Gegenwart von „Tubulinprotein“ einnimmt, und nicht mit der Konformation von freiem Epothilon A in Lösung.

Recht verschieden von den bisher diskutierten Strukturen präsentieren sich auch die Konformationen der Epothilone B (Abbildung 1 c) und D in den entsprechenden Komplexen mit Cytochrom P450_{epoK}, das für den letzten Schritt in der Biosynthese von Epothilon A und B zuständig ist. Diese Strukturen sind durch Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 1.9 bzw. 2.7 Å aufgeklärt worden.^[25] Abgesehen von der beweglichen Thiazolyl-Seitenkette besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von Taylor und Zajicek postulierten „minor conformer B“.^[12a] Auch diese im Komplex mit Cytochrom P450 vorgefundenen Epothilon-Konformationen ließen sich nicht in die Tubulin-bindetasche einpassen.

Nettles et al. konnten nun kürzlich das Rätsel der bioaktiven Konformation von Epothilon im Komplex mit $\alpha\beta$ -Tubulin mithilfe der Elektronenkristallographie lösen.^[9] Ähnlich wie schon bei der Strukturaufklärung des Taxol- $\alpha\beta$ -Tubulin-Komplexes^[21] wurden zweidimensionale Kristalle des Tubulinheterodimers (in Gegenwart eines Überschusses an Epothilon A) durch die Zugabe von Zn^{2+} erhalten. Die Zn^{2+} -induzierten Tubulinschichten, in denen die Protofilamente im Gegensatz zu den Mikrotubuli antiparallel angeordnet sind, beugten Elektronen entlang der Kristallebene bis zu einer Auflösung von 2.9 Å, während für die Diffraktion senkrecht zur Kristallebene erwartungsgemäß eine deutlich geringere Auflösung von 4.2 Å erreicht wurde. Wegen der limitierten Auflösung musste die Struktur des Epothilon-A-Tubulin-Komplexes wie schon beim Taxol-Tubulin-Komplex mithilfe kristallographischer Verfeinerungsmethoden unter Einbeziehung

NMR-generierter Strukturenssembles und molekulardynamischer Modellierungsverfahren bestimmt werden. Mit der Strukturaufklärung des Epothilon-A-Tubulin-Komplexes ist ein wichtiger Durchbruch gelungen, da es nun erstmals möglich wird, die Wechselwirkungen von Epothilon A mit β -Tubulin im Detail zu beschreiben. Die Struktur des Komplexes lieferte ad hoc Antworten auf eine Reihe wichtiger Fragen: Wie lassen sich bekannte Resistenzmutationen im β -Tubulin erklären? Wie wirken sich Strukturmodifikationen des Epothilons auf die Wechselwirkung mit β -Tubulin aus? Wie sieht der Vergleich mit der konkurrierenden Taxolbindung aus?

Wie erwartet findet man Epothilon in einer Tasche auf der Oberfläche von β -Tubulin (Abbildung 2), an deren Bildung unter anderem auch der so genannte M-Loop beteiligt ist. Dieser ist in den Zn^{2+} -induzierten Tubulinschichten

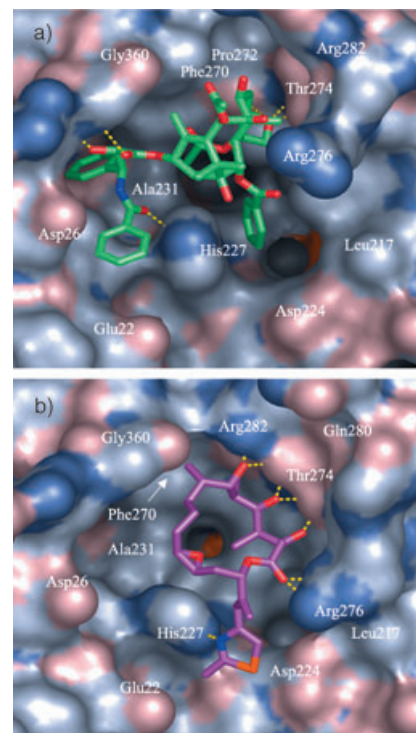


Abbildung 2. Die Taxol-/Epothilon-Bindungs-tasche des β -Tubulins aus den jeweiligen elektronenkristallographisch erhaltenen Strukturen mit gebundenem a) Taxol und b) Epothilon. Von β -Tubulin ist die Moleküloberfläche dargestellt (C grau, O dunkelrosa, N graublau). Taxol (C grün, O rot, N blau) und Epothilon A (C violett, O rot, N blau) sind als Stabmodelle dargestellt. Abbildung mit Pymol erstellt (<http://pymol.sourceforge.net>).

und in Microtubuli (Nogales et al., 1999) auch stark in laterale Kontakte zwischen den Protofilamenten einbezogen. Die Stabilisierung des M-Loops und damit der lateralen Kontakte zwischen den Protofilamenten führt letztlich zur Stabilisierung der wachsenden Microtubuli und verhindert ihren Zerfall, sobald sie einmal gebildet sind. Nettles et al. konnten anhand der Struktur des Komplexes durch Modellierungsstudien auf elegante Weise nachvollziehen, wie Modifikationen des Epothilons die Wechselwirkung mit β -Tubulin beeinflussen. So ist leicht ersichtlich, warum auch größere Substituenten an C12 und eine 9,10-*trans*-Doppelbindung toleriert werden. Ungewöhnlich ist die *endo*-Orientierung des Epoxids, die größere C12-Substituenten in eine hydrophobe Vertiefung platziert, in der auch die *N*-Acylreste von Aziridin-Analoga noch Platz finden. Warum Epothilone der B-Reihe, mit einem Methylsubstituenten an C12, generell aktiver sind als die der A-Reihe, kann das Modell dagegen nicht erklären. Schwer zu verstehen ist auch, wie es zu der energiereichen *syn*-Pentan-Orientierung der C6- und C8-Methylgruppen kommt und warum gerade die Entfernung der C8-Methylgruppe zu einem Wirkungsabfall um den Faktor 200 führt.^[26] Nicht nachvollziehbar ist auch die Diskussion des Einflusses zusätzlicher Methylgruppen an C10 und C14, zumal die angenommene und in Abbildung 4B, Lit. [9], gezeigte Konfiguration des biologisch aktiven C14-Methyl-Analogons^[27] falsch wiedergegeben ist. Ähnlich konnte die Struktur des Komplexes mit einigen, aber nicht mit allen bekannten Resistenzmutationen in β -Tubulin in Einklang gebracht werden. Wie erwartet sind zumeist Aminosäuren betroffen, die direkt oder indirekt mit Epothilon wechselwirken.

Besonders interessant ist der direkte Vergleich der Epothilonbindung mit der Taxolbindung (Abbildung 2). Nicht überraschend füllt das kleinere Epothilon nur ca. die Hälfte der Taxolbindungstasche im β -Tubulin aus. Dabei fällt auf, dass sich die Bindungstasche über die Reorientierung von Aminosäureseitenketten an das gebundene Substrat anpasst und so die Wechselwirkungen mit Epothilon und Taxol optimiert werden („induced fit“). Die Taxol- β -

Tubulin-Wechselwirkungen unterscheiden sich fundamental von denen im Epothilon-A-Tubulin-Komplex, sodass Hypothesen über einen gemeinsamen Pharmakophor nun endgültig verworfen werden können. So gibt es mit Ausnahme der H-Brücke von 7-OH zu Arg 282 keinerlei Wechselwirkungen strukturell homologer Gruppen in Taxol und Epothilon mit β -Tubulin. Darüber hinaus sind die Aminosäuren in der Bindungstasche an gänzlich unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den Naturstoffen beteiligt. Die überaus anpassungsfähige Bindungstasche von β -Tubulin kann außer Taxanen und Epothilonen bekanntermaßen auch andere Cytostatika aufnehmen, z.B. Eleutherobin/Sarcodictyin, die untereinander und auch mit Taxanen und Epothilon strukturell nur wenig verwandt sind.

Wie passt nun die von Carlomagno et al. NMR-spektroskopisch ermittelte Konformation von Epothilon A in Gegenwart von Tubulin (Abbildung 1 b) in dieses Bild? Offensichtlich unterscheiden sich die beiden Konformationen so signifikant, dass ein Kompromiss, der beiden zumindest in Teilbereichen gerecht wird, nicht denkbar ist. Wahrscheinlicher ist dagegen, dass jede der beiden Konformationen für die spezifische Proteinumgebung steht, in der sie untersucht wurde. Sowohl Zn^{2+} -stabilisierte Tubulinschichten als auch die undefinierte Tubulinstruktur, die bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen vorlag, sind künstliche Systeme – daher könnten sich die biologisch relevante Konformation und Bindungssituation der Epothilone von den beiden Vorschlägen noch deutlich unterscheiden.

Was ist nun zu tun? Wegen der eher durchschnittlichen Auflösung der Struktur des Epothilon-Tubulin-Komplexes ist es notwendig, die vorgeschlagene Konformation und Orientierung von Epothilon in der Tubulinbindungsstelle mit unabhängigen Methoden zu untermauern. Naheliegend ist eine Photoaffinitätsmarkierung mit Epothilonderivaten, die photolabile Substituenten in der Methylgruppe des Thiazolylrests oder – im Fall von Aziridin-Analoga – am Aziridin-Stickstoffatom tragen. Beide Positionen können modifiziert werden, ohne dass die Bindung am Tubulin beeinträchtigt wird.^[28,29] Denkbar ist auch

die Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchung (MAS-NMR) von Microtubuli, die mit ^{13}C - und ^{19}F -markierten Epothilonen beladen sind; dies würde Aussagen über die Konformation des gebundenen Moleküls und Abstandsmessungen (REDOR-NMR) ermöglichen.

Natürlich wird man auch versuchen, neuartige Epothilone zu entwickeln, die nicht nur die postulierte Struktur stützen, sondern auch eine höhere Affinität zu Tubulin und damit möglicherweise eine höhere Cytotoxizität haben. Dass in diese Richtung optimierte Epothilone von therapeutischem Nutzen sind, ist allerdings eher unwahrscheinlich – für die klinische Anwendung müssen vielmehr die pharmakologischen Eigenschaften hin zu einer höheren Selektivität und Unempfindlichkeit gegen die Bildung von Resistenzen optimiert werden, um auf diese Weise eine höhere Effizienz und Verträglichkeit zu erreichen.

- [1] D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Z. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, 55, 2325–2333.
- [2] a) K. C. Nicolaou, F. Roschangar, D. Vourloumis, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2120–2153; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2014–2045; b) R. M. Borzilleri, G. D. Vite, *Drugs Future* **2002**, 27, 1149–1163; c) K.-H. Altmann, *Med. Chem.* **2003**, 3, 149–158.
- [3] R. J. Kowalski, P. Giannakakou, E. Hamel, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2534–2541.
- [4] a) P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature* **1979**, 277, 665–667; b) P. B. Schiff, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1981**, 20, 3247–3252.
- [5] A. Wolff, A. Technau, G. Brandner, *Int. J. Oncol.* **1997**, 11, 123–126.
- [6] a) K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 560–563; b) K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, 106, 233–253.
- [7] R. M. Borzilleri, X. Zheng, R. J. Schmidt, J. A. Johnson, S.-H. Kim, J. D. DiMarco, C. R. Fairchild, J. Z. Gougoutas, F. Y. F. Lee, B. H. Long, G. D. Vite, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8890–8897.
- [8] S. Goodin, M. P. Kane, E. H. Rubin, *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22, 2015–2025.
- [9] J. H. Nettles, H. Li, B. Cornett, J. M. Krahn, J. P. Snyder, K. H. Downing, *Science* **2004**, 305, 866–869.

- [10] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671–1673; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1567–1569. Die Kristallstrukturdaten sind ab Oktober 1995 interessierten Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt worden.
- [11] H.-J. Hecht, G. Höfle, unveröffentlichte Ergebnisse; CCDC-241333 und CCDC-241334 enthalten die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ; Fax: (+44)1223-336-033; oder deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [12] a) R. E. Taylor, J. Zajicek, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7224–7228; b) R. E. Taylor, Y. Chen, G. M. Galvin, P. K. Pabba, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 127–132.
- [13] J. D. Winkler, P. H. Axelsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2963–2966.
- [14] I. Ojima, S. Chakravarty, T. Inoue, S. Lin, L. He, S. B. Horwitz, S. D. Kuduk, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4256–4261.
- [15] M. Wang, X. Xia, Y. Kim, D. Hwang, J. M. Jansen, M. Botta, D. C. Liotta, J. P. Snyder, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 43–46.
- [16] F. Manetti, S. Forli, L. Maccari, F. Correlli, M. Botta, *Il Farmaco* **2003**, *58*, 357–361.
- [17] L. He, P. G. Jagtap, D. G. I. Kingston, H.-J. Shen, G. A. Orr, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3972–3978.
- [18] P. Giannakakou, R. Gussio, E. Nogales, K. H. Downing, D. Zaharevitz, B. Bollbuck, G. Poy, D. Sackett, K. C. Nicolaou, T. Fojo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2904–2909.
- [19] N. M. Verrills, C. L. Flemming, M. Liu, M. T. Ivery, G. S. Cobon, M. D. Norris, M. Haber, M. Kavallaris, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 597–607.
- [20] L. He, C.-P. H. Yang, S. B. Horwitz, *Mol. Cancer Ther.* **2001**, *1*, 3–10.
- [21] a) E. Nogales, S. G. Wolf, K. H. Downing, *Nature* **1998**, *391*, 199–203; b) J. Löwe, H. Li, K. H. Downing, E. Nogales, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045–1057; c) J. P. Snyder, J. H. Nettles, B. Cornett, K. H. Downing, E. Nogales, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5312–5316.
- [22] T. Carlomagno, M. J. J. Blommers, J. Meiler, W. Jahnke, T. Schupp, F. Petersen, D. Schinzer, K.-H. Altmann, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2615–2619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2511–2515.
- [23] G. Höfle, N. Glaser, M. Kiffe, H.-J. Hecht, F. Sasse, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2090–2093; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1971–1974.
- [24] Eine bei Raumtemperatur gesättigte Lösung in D₂O enthält nach HPLC-Analyse 0.5 mgmL⁻¹ Epothilon A und 0.06 mgmL⁻¹ Epothilon B; G. Höfle, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [25] S. Nagano, H. Li, H. Shimizu, C. Nishida, H. Ogura, P. R. Ortiz de Montellano, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44886–44893.
- [26] A. Balog, P. Bertinato, D.-S. Su, D. Meng, E. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4529–4532.
- [27] R. E. Taylor, Y. Chen, A. Beatty, D. C. Myles, Y. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 26–27.
- [28] N. Glaser, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, **2001**.
- [29] A. Regueiro-Ren, R. M. Borzilleri, X. Zheng, S.-H. Kim, J. A. Johnson, C. R. Fairchild, F. Y. F. Lee, B. H. Long, G. D. Vite, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2693–2696.