

Genetisch kodierte kupferfreie Klick-Chemie**

Tilman Plass, Sigrid Milles, Christine Koehler, Carsten Schultz* und Edward A. Lemke*

Die Möglichkeit der Visualisierung von Biomolekülen in lebenden Objekten durch Fluoreszenzmarkierung ist ein wichtiges Hilfsmittel in der modernen Biotechnologie und Zellbiologie. Genetisch kodierte Fusionsproteine mit vergleichsweise großen fluoreszierenden Proteinen (FPs), wie ursprünglich von den Arbeitsgruppen Chalfie und Tsien entwickelt,^[1] sind dabei die derzeit am häufigsten angewendete Methode. Da synthetische Chromophore oftmals bessere photophysikalische Eigenschaften aufweisen als FPs, wurden alternative Strategien entwickelt, die auf der Kupplung von synthetischen Chromophoren mit genetisch kodierten Markern basieren, beispielsweise dem Halo- und dem SNAP-Tag.^[2] Diese bringen eine höhere Genauigkeit und verbesserte Eigenschaften mit sich, sind aber immer noch relativ groß. Kleine Proteinmarker, wie das Multihistidin^[3] oder das Multicysteinmotiv,^[4] können ebenfalls zur Erkennung kleinerer Fluorophore eingesetzt werden. Allerdings führt ihre Anwendung in der Zelle oftmals zu mangelnder Spezifität, da das jeweils zugrundeliegende Erkennungselement auf natürlichen Aminosäuren basiert. Diese Nachteile und Einschränkungen können durch die Verwendung bioorthogonaler Chemie überwunden werden, die auf der Kupplung von exogenen Molekülen nichtbiologischer Herkunft unter physiologischen Bedingungen beruht. Die (3+2)-Huisgen-Cycloaddition von Aziden mit Alkinen (eine Form der Klick-Chemie^[5]) erfüllt diese Anforderungen besonders gut. Durch Einbautechniken, die auf dem Einsatz von Ergänzungsmethoden beruhen, verknüpften bereits Beatty et al. Azidderivate von Fluorophoren durch Klick-Reaktionen mit Proteinen, in die während der Expression in *E. coli* lineare Alkine eingebaut wurden.^[6]

Diese Azid-Alkin-Cycloaddition erfordert jedoch Kupfer(I) als Katalysator (CuAAC), was die Anwendbarkeit und Biokompatibilität stark einschränkt (siehe jedoch Lit. [7]).

Dieses Problem wurde von Bertozzi und Mitarbeitern gelöst, die zeigen konnten, dass die Klick-Reaktion bei Verwendung stark gespannter Cycloalkine vollständig und schnell abläuft.^[8] Seitdem wurden diese spannungsgetriebenen Azid-Alkin-Cycloadditionen (SPAACs) zunehmend zur Markierung von beispielsweise Kohlenhydraten,^[9] Nukleotiden^[10] und Lipiden^[11] verwendet.

Mit der Optimierung einer Liponsäure-Ligase, die ein kleines, genetisch kodierte Erkennungspeptid an ein Cyclooctin-funktionalisiertes Substrat bindet, erweiterten Ting und Mitarbeiter das Potenzial dieser Technik. Das so eingebaute Cyclooctin fungierte dann in einem zweiten Schritt als spezifische Position zur Markierung in Zellen.^[12]

Die direkte genetische Kodierung von fluoreszierenden nichtnatürlichen Aminosäuren (UASs) hat viele Einschränkungen und Nachteile vorheriger Ansätze überwunden, indem sie ausgezeichnete Spezifität, freie Wahl der Position der Modifikation innerhalb des Proteins und – wenn überhaupt – nur minimale strukturelle Beeinträchtigung mit sich bringt. Dies wurde zuerst von Summerer et al. durch die Weiterentwicklung eines Leucyl-tRNA/RS-Paars (RS = Synthetase) von *E. coli* umgesetzt, das die UAS Dansylalanin genetisch in *Saccharomyces cerevisiae* kodiert.^[13] Anstelle des Amber-Stop-Kodons TAG wurde Dansylalanin von der Translationsmaschinerie des Wirtes selektiv und effizient in Proteine eingebaut. Dieser Ansatz kann mittlerweile dazu verwendet werden, eine ganze Reihe an kleinen Chromophoren genetisch zu kodieren.^[14] Größere Chromophore mit verbesserten photophysikalischen Eigenschaften konnten bislang noch nicht genetisch kodiert werden, da hier erst neue tRNA/RS-Paare entwickelt werden müssen und zudem eine potenzielle Größenbeschränkung bei der Translation besteht.

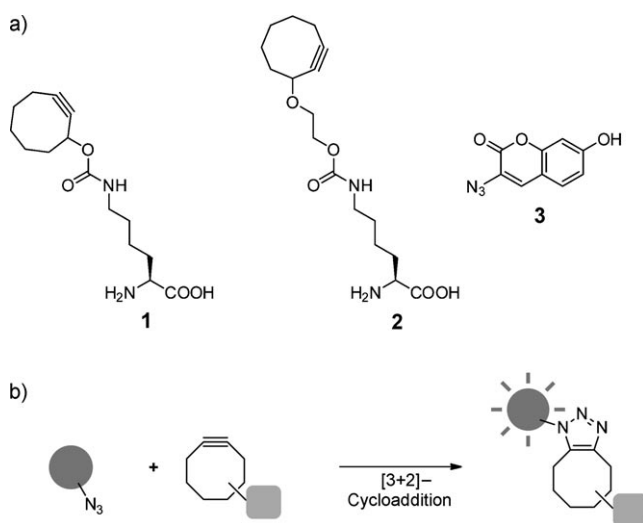
Der gezielte Einbau von UASs sollte es prinzipiell ermöglichen, gespannte Alkin- und Azidfunktionen genetisch einzubauen. In der Tat wurde bereits eine Vielzahl von Aziden mithilfe von beispielsweise optimierten *Methanococcus-jannaschii*-tRNA^{Tyr}/RS-, *E. coli*-tRNA^{Leu}/RS- und *Methanosarcina-bakeri/mazei*-tRNA^{Pyl}/pylRS-Paaren (Tyr = Tyrosyl, Leu = Leucyl, pyl = Pyrrolyl) genetisch kodiert.^[15,16] Bisher gelang es jedoch noch nicht, die komplementäre chemische Funktion, also gespannte Alkine, für metallfreie Klick-Chemie genetisch zu kodieren. Hauptursachen dafür dürften die Größe und der sterische Anspruch der cyclischen Seitenkettengruppe sein. Die direkte genetische Kodierung gespannter Alkine bietet zahlreiche Vorteile gegenüber der Kodierung der Azidfunktion. Viele kommerziell erhältliche Verbindungen, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Fettsäuren oder Kofaktoren, sind nur als Azidderivate erhältlich und daher nicht kompatibel mit der kupferfreien Klick-Reaktion von bereits vorhandenen genetisch kodierten UASs. Ein weiterer großer Vorteil der direkten Kodierung gespannter Alkine ist, dass diese mit Aziden fluorogener

[*] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz, Dr. E. A. Lemke
Structural and Computational Biology Unit und Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-397-536
E-Mail: schultz@embl.de
lemke@embl.de

[**] Wir danken V. Vandelinder, A. Neal und C. Besir für die Hilfe bei dieser Arbeit und P. G. Schultz für Materialien. Die Arbeit wäre ohne die technische Hilfe der EMBL-ALMF-, PEPCF- und PCF-Einrichtungen nicht möglich gewesen. T.P. und S.M. werden durch Stipendien des VCI bzw. BIF gefördert. E.A.L. dankt für die Förderung durch das Emmy Noether-Programm der DFG und C.S. für Mittel aus dem Transregio83 der DFG.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte experimentelle Verfahren und die chemische Synthese der Verbindungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201008178> zu finden.

Chromophore reagieren könnten, bei denen durch die Azidgruppe die Fluoreszenz zunächst weitgehend gelöscht wird und erst mit erfolgreicher Klick-Reaktion die Fluoreszenz stark ansteigt (Schema 1).^[17] Mit einem fluorogenen Cumarinazidderivat wurden z. B. Lipide in lebenden Säugerzellen



Schema 1. a) Strukturen der UASs 1 und 2 und des fluorogenen Chromophors 3. b) Kupferfreie Klick-Reaktion mit fluorogenem Azid.

markiert. Mit diesem Ansatz konnte wegen der stark reduzierten Hintergrundfluoreszenz ein hoher Kontrast erzielt werden.^[11] Der Nutzen fluorogener Marker wurde auch in kürzlich publizierten Arbeiten der Gruppe um Weissleder herausgestellt, die durch eine Diels-Alder-Cycloaddition fluorogene Tetrazine mit ausgezeichnetem Fluoreszenzlöschungsvermögen mit gespannten Dienophilen verknüpften.^[18]

Um die derzeitigen Grenzen der Weiterentwicklung und Optimierung der kupferfreien Klick-Chemie in lebenden Zellen zu überwinden, planten wir die genetische Kodierung gespannter Alkine in *E. coli*. Wir nahmen an, dass die Unterdrückung von Stop-Kodons durch das natürliche tRNA^{pyl}/pyIRS-Paar von *M. maei* dafür ein guter Ausgangspunkt sein könnte, da die Aminosäurebindestelle dieser Synthetase teilweise exponiert ist und damit gegebenenfalls Raum für größere Seitenketten bietet. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass die Carbatbindung der Lysinseitenkette ein wichtiger Diskriminator für den erfolgreichen Einbau von UASs ist.^[16,19,20] Daher synthetisierten wir, wie in Schema S1 (siehe Hintergrundinformationen) dargestellt, das Lysinderivat 1 in sechs Stufen aus kommerziell erhältlichem Cyclohepten. Der letzte Reaktionsschritt, das Abspalten der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe mit 70-proz. Ameisensäure, erforderte besonders milde Reaktionsbedingungen, da Standardmethoden zu einer Spaltung der Carbatbindung und damit zum Verlust der Seitenkettenfunktionalität führten. Die durchschnittliche Ausbeute pro Syntheseschritt lag bei über 80 %, was die komfortable Synthese von Grammengen ermöglichte. Im Anschluss daran testeten wir die Effizienz der Stop-Kodon-Unterdrückung durch das Wildtyp(WT)-System

tRNA^{pyl}/pyIRS^{WT} mithilfe eines GFP-Reporterkonstrukts (GFP = grün fluoreszierendes Protein). Dieses koexprimierte Konstrukt hat eine Amber-TAG-Mutation an der Aminosäureposition 39 (GFP^{TAG}). Folglich wird nur intaktes, und damit fluoreszierendes GFP erhalten, wenn das Stop-Kodon erfolgreich unterdrückt wurde. Anhand von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) und der Fluoreszenz von *E. coli*-Zellsuspensionen (Abbildungen 1 und S1) wurden im Vergleich zu einer Negativkontrolle nur geringe Proteinmengen in Gegenwart von 1 mM 1 exprimiert. Wir spekulierten deshalb, dass die Nähe der sterisch anspruchsvollen Seitenkette zur Carbatbindung eine effiziente Substraterkennung seitens der Synthetase verhindert.

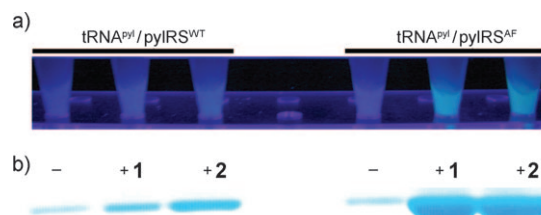


Abbildung 1. a) Fluoreszenzbilder von Zellsuspensionen von *E. coli* in Mikrozentrifugengefäßen, die in Abwesenheit (–) oder in Gegenwart (+) von 1 oder 2 GFP^{TAG} exprimieren. b) Zugehöriges, mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel nach Aufreinigung von GFP^{TAG} mithilfe einer C-terminalen Affinitätsmarkierung.

Aus diesem Grund synthetisierten wir die UAS 2, die sich von 1 durch einen längeren Linker zwischen Carbatbindung und Cyclooctingruppe unterscheidet. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich wird, konnte so die Ausbeute der Proteinexpression in Gegenwart von 1 mM 2 geringfügig verbessert werden. Um die Akzeptanz der RS für die UAS weiter zu verbessern, vergrößerten wir die Substratbindetasche der pyIRS^{WT} durch Einführung der beiden Mutationen Y306A und Y384F, die sich in Arbeiten von Yanagisawa et al. als günstig für die Erkennung sterisch anspruchsvoller Seitenketten erwiesen hatten.^[20] Abbildung 1 zeigt deutlich, dass GFP^{TAG} bei Verwendung dieses mutierten tRNA^{pyl}/pyIRS^{AF}-Paares (AF = Y306A und Y384F) nur in Gegenwart von 1 oder 2 effizient exprimiert wird. Massenspektrometrisch konnte der positionsspezifische Einbau der UAS in das Protein bestätigt werden (Tabelle S1). Da die Synthese von 1 im größeren Labormaßstab einfacher war als jene von 2, konzentrierten wir uns bei allen weiteren Experimenten auf 1. Üblicherweise wurden in Gegenwart von 1 mM 1 mehr als 10 mg GFP^{TAG} aus 1 L *E. coli*-Kultur erhalten, was die hohe Suppressionseffizienz und die Genauigkeit unseres tRNA^{pyl}/pyIRS^{AF}-Konstrukts unterstreicht.

Um das Potenzial von 1 zu ermitteln, wurden Einzelmolekülstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt. Die Messung von resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) an einem Einzelmolekül (sm) ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse der Proteinstruktur und -dynamik. smFRET erfordert üblicherweise eine kovalente, hocheffiziente und seitenspezifische Markierung von Proteinen mit photostabilen Chromophoren, da in Einzelmolekül-

messungen sehr geringe Fluorophorkonzentrationen eingesetzt werden, deren Signale trotzdem das Hintergrundrauschen überwinden müssen. Aus diesem Grund reinigten wir GFP^{TAG→1} auf und kuppelten es an das kommerziell erhältliche Azidderivat von Atto647N unter milden Bedingungen. Gemäß den spektralen Eigenschaften dieses Fluorophors fungierte GFP als Donor (D) und Atto647N als Akzeptor (A) für FRET. Mithilfe konfokaler Detektionsgeometrie beobachteten wir frei diffundierendes GFP^{TAG→1,Atto647N} mit Einzelmolekülauföslung (Abbildung S2).^[21] Emissionspulse einzelner GFP^{TAG→1,Atto647N}-Moleküle wurden hinsichtlich der Stöchiometrie (S) zwischen D und A und hinsichtlich des Auftretens von Energietransfer (E_{FRET}) untersucht. Wie Abbildung 2a zeigt, konnten wir eindeutig eine Population nachweisen, die beide Chromophore, D und A, ($S=0.5$, $E_{\text{FRET}}=1$) enthält. Die hohe FRET-Effizienz dieser Population ist in Einklang mit der Kristallstruktur von GFP,^[22] derzufolge Position 39 weniger als 30 Å vom GFP-Chromophor entfernt liegt.

Wie bereits erwähnt, eignet sich die Cyclooctinfunktion ideal zur hochselektiven Markierung von Biomolekülen in lebenden Zellen. Um die generelle Durchführbarkeit solcher Experimente mit unserer Methode zu bestätigen, exprimier-

ten wir das rot fluoreszierende Protein mCherry^{TAG} in *E. coli* in Gegenwart von 1 mM **1** und tRNA^{pyl}/pylRS^{AF}. Anschließend wurden die Zellen in einer 50 µM Lösung des fluorogenen Cumarinazids **3** inkubiert.^[17] Abbildung 2 zeigt, dass nur Zellen mit mCherry^{TAG→1,3} starke Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm aufweisen. Des Weiteren konnte die In-vivo-Markierung mit fluorogenem Cumarin mit Fluoreszenzspektroskopie an intakten Zellen (Abbildung 2c) und mit SDS-PAGE von Zelllysaten (siehe Abbildungen S3–S5, auch für weitere Mikroskopieexperimente mit anderen Proteinen) bestätigt werden.

Wir haben einen der leistungsfähigsten Vertreter von bioorthogonaler In-vivo-Chemie in *E. coli* genetisch kodiert und die grundsätzliche Nutzbarkeit dieses neuen Ansatzes – sowohl zur In-vivo-Markierung von Proteinen als auch für hochauflösende Einzelmolekülmessungen – nachgewiesen. SPAAC-Reaktionen können damit positionsspezifisch und nichtinvasiv zur Modifizierung von Proteinen in lebenden Zellen genutzt werden. Da das verwendete tRNA^{pyl}/pylRS^{AF}-Paar keine offensichtliche starke Abhängigkeit von der Länge des Linkers zeigt (**1** gegenüber **2**), ist anzunehmen, dass geringfügig abgeänderte Derivate, wie mono- und difluorierte Cyclooctine und eventuell Bicyclonone (REF) auch mit diesem System genutzt werden können.^[23] Andere modifizierte Cyclooctine, wie Dibenzocyclooctine,^[24] könnten hingegen wegen ihrer Größe die Synthetase und/oder die Translationsmaschinerie des Wirtes vor beträchtliche Herausforderungen stellen. Da pylRS von *M. maei* bekanntermaßen auch orthogonal in einer Vielzahl an eukaryotischen Organismen^[19,25] einsetzbar ist, erforschen wir derzeit den genetischen Einbau dieses Systems in Säugerzellen. Dadurch werden nicht nur die Möglichkeiten zur Verfolgung von Proteinen in lebenden Objekten bedeutend erweitert, sondern es wird auch der Einbau anderer Arten von Markierungen/Sonden, z. B. zur Vernetzung von Biomolekülen oder zur Spinmarkierung für NMR-Spektroskopie und Magnetresonanztomographie in lebenden Objekten ermöglicht.

Eingegangen am 25. Dezember 2010,
veränderte Fassung am 3. Februar 2011
Online veröffentlicht am 23. März 2011

Stichwörter: Aminosäuren · Genexpression · Gespannte Moleküle · Klick-Chemie · Proteine

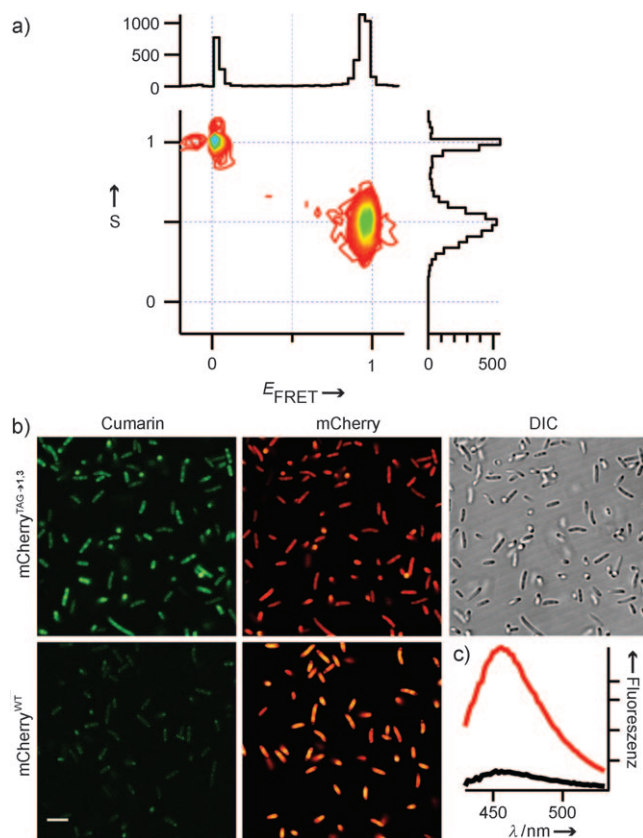


Abbildung 2. a) 2D-Histogramm (S gegen E_{FRET}) von smFRET-Daten von GFP^{TAG→1,Atto647N}-Molekülen. b) tRNA^{pyl}/pylRS^{AF}-Paar mit mCherry^{TAG→1,3} (plus Differentialinterferenzkontrast(DIC)-Bild) oder mCherry^{WT} exprimierenden und mit **3** inkubierten Zellen wurden hinsichtlich der Fluoreszenz von Cumarin und mCherry abgelichtet. c) Emissionsspektrum für Cumarin von *E.-coli*-Zellsuspensionen aus (b); rot: mCherry^{TAG→1,3}, schwarz: mCherry^{WT}. Maßstabsbalken: 5 µm.

- [1] Übersichtsartikel: B. N. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, 312, 217–224.
- [2] a) A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 9955–9959; b) G. V. Los et al., *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373–382.
- [3] V. Roullier, S. Clarke, C. You, F. Pinaud, G. G. Gouzer, D. Schaible, V. Marchi-Artzner, J. Piehler, M. Dahan, *Nano Lett.* **2009**, 9, 1228–1234.
- [4] B. A. Griffin, S. R. Adams, J. Jones, R. Y. Tsien, *Methods Enzymol.* **2000**, 327, 565–578.
- [5] Übersichtsartikel: a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021; b) C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030–10074; c) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem.*

- Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279; d) M. F. Debets, C. W. van der Doelen, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168–1184.
- [6] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150–14151.
- [7] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
- [8] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [9] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826.
- [10] I. Singh, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2010**, DOI: 10.1039/c0cc03985c.
- [11] a) A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526–1529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498–1500.
- [12] C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernandez-Suarez, S. Puthenveetil, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10914–10919.
- [13] D. Summerer, S. Chen, N. Wu, A. Deiters, J. W. Chin, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9785–9789.
- [14] a) J. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738–8739; b) H. S. Lee, J. Guo, E. A. Lemke, R. D. Dimla, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12921–12923.
- [15] a) J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026–9027; b) J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964–967.
- [16] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720–8721.
- [17] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.
- [18] a) N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7147–7150; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013–7016; b) N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872.
- [19] T. Mukai, T. Kobayashi, N. Hino, T. Yanagisawa, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *371*, 818–822.
- [20] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197.
- [21] E. A. Lemke, Y. Gambin, V. Vandelinder, E. M. Brustad, H. W. Liu, P. G. Schultz, A. Groisman, A. A. Deniz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13610–13612.
- [22] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395.
- [23] a) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797; b) J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612–9615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.
- [24] a) X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.
- [25] a) P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4052–4055.