

Ein Konformationsschalter ist für die Funktionsweise der Protease ClpP verantwortlich**

Sebastian R. Geiger, Thomas Böttcher, Stephan A. Sieber* und Patrick Cramer*

Die fassartig geformte Serinprotease ClpP baut falsch gefaltete, beschädigte und regulatorische Proteine ab. Die Substratproteine gelangen über zwei axiale Poren in den Innenraum von ClpP, jedoch war bisher unklar, wie die Peptidprodukte diesen wieder verlassen können. Hier wird die Struktur von ClpP aus *Staphylococcus aureus* beschrieben, wobei erstmals ein komprimierter Zustand der fassartig geformten Protease ClpP beobachtet wurde. Ein Umschalten der Konformation in einer „Henkelregion“ des aktiven Zentrums führt zu einem Verschluss des aktiven Zentrums und zur Öffnung äquatorialer Poren. Konservierte Reste in der Henkelregion sind für das Umschalten der Konformation verantwortlich und von essentieller funktioneller Bedeutung, obwohl sie nicht Teil des aktiven Zentrums sind. Diese Er-

gebnisse sind in Einklang mit einem prozessiven Kreislauf, dem Übergang von ClpP aus einem gestreckten Zustand mit offenen aktiven Zentren und geschlossenen äquatorialen Poren in einen komprimierten Zustand mit geschlossenem aktiven Zentrum und offenen Poren, durch die Produkte freigesetzt werden können.

Energieabhängige Proteasen kontrollieren die Qualität und Quantität der zellulären Proteine, indem sie falsch gefaltete, beschädigte oder regulatorische und damit kurzlebige Proteine abbauen.^[1] Zur Familie dieser Proteasen gehören das eukaryotische 26S-Proteasom und die Caseinolytische Protease (Clp) in Bakterien.^[2a,b] Clp-Enzyme bestehen aus der fassartig geformten Serinprotease ClpP, die Substratproteine abbaut, sowie einer AAA + ATPase wie ClpX oder ClpA, die das Substrat erkennt, entfaltet und über die axialen Poren in das ClpP-Fass einführt.^[3a,b] ClpP spaltet die eingeführten Polypeptide prozessiv in kleinere Peptidfragmente mit einer Länge von 6–8 Aminosäuren.^[4] Die Kristallstrukturen von ClpP aus verschiedenen Spezies ähneln sich stark und weisen stets zwei aufeinandergesetzte heptamere Ringe auf, die eine großräumige innere Kammer mit 14 aktiven Zentren begrenzen.^[5] Bei ClpP handelt es sich um eine Serinprotease mit kanonischen katalytischen Triaden, von denen jede aus einem Serin-, einem Histidin- und einem Aspartatrest besteht. Verschiedene Strukturen von ClpP mit gebundenem Inhibitor^[6] oder einem Peptid^[7] zeigen, dass die Region des aktiven Zentrums flexibel ist und von einer funktionell bedeutsamen mobilen „Henkelregion“ flankiert wird.^[8,9]

Die zentrale offene Frage des ClpP-Mechanismus ist, wie die Peptidprodukte aus dem aktiven Zentrum freigesetzt werden und wie sie die Kammer des ClpP-Fasses verlassen können. Ein Modell schlägt vor, dass die Peptide ebenfalls durch die axialen Poren austreten, durch die die Substrate eingeführt werden,^[10a,b] aber dieses Modell ist nicht konsistent mit publizierten Daten^[9] und postuliert eine partielle Dissoziation der ATPasen von ClpP, die mit einer prozessiven Funktion inkompatibel sein dürfte.^[11] Ein zweites Modell geht davon aus, dass sich die heptameren Ringe vorübergehend trennen, jedoch gibt es hierfür keine Anhaltspunkte. In einem dritten Modell wird vorgeschlagen, dass die Peptide durch äquatoriale Poren freigesetzt werden, die sich temporär an der Seite der Fassstruktur bilden.^[8,9,12] Derartige Poren wurden bisher jedoch nicht beobachtet, und ihre Bildung würde größere Konformationsänderungen erfordern, was ohne Dissoziation der Fassstruktur schwierig erscheint. Wir stellen hier die Kristallstruktur von ClpP aus *Staphylococcus aureus* (SaClpP) vor, die erstmals die vorhergesagten äquatorialen Poren und die Konformationsänderungen auf-

[*] Dr. S. R. Geiger,^{[#][+]} Prof. Dr. P. Cramer
Gene Center and Department of Biochemistry
Center for Integrated Protein Science CIPSM
Ludwig-Maximilians-Universität München
Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 218076999
E-Mail: cramer@LMB.uni-muenchen.de

Dr. T. Böttcher^[+]
AVIRU, EXIST Forschungstransfer Projekt, OC II
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

Prof. Dr. S. A. Sieber
Department Chemie, Center for Integrated Protein Science CIPSM,
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 8928913210
E-Mail: stephan.sieber@tum.de

[#] Aktuelle Adresse: Lawrence Berkeley National Laboratory, Life Science Division, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720 (USA)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken Alan Cheung, Dirk Kostrewa und den anderen Mitgliedern des Arbeitsgruppe Cramer für ihre Unterstützung. S.G. wurde durch das Graduiertenprogramm NanoBioTechnology des Elitenetzwerks Bayern gefördert. P.C. wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB646, SFB TR5, NIM, der Jung-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. T.B. wurde durch die Studienstiftung des deutschen Volkes und durch einen EXIST-Forschungstransfer des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) gefördert, S.A.S. erhielt Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy Noether-Programm), SFB749 und CIPSM. Wir bedanken uns auch bei J. Basquin und K. Saldaña von der Kristallisationsanlage des MPI für Biochemie, Martinsried, und bei Malte Gersch für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde unter Nutzung des PXI-Strahlengangs der Swiss Light Source am Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz, durchgeführt. Wir danken des Weiteren der Protein Structure Factory am BESSY, Berlin.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100666> zu finden.

weist, die für deren Bildung ohne Dissoziation des Fasses nötig sind.

SaClpP wurde aufgereinigt und kristallisiert, und seine Struktur wurde mithilfe von „Molecular Replacement“ unter Verwendung der ClpP-Struktur von *Streptococcus pneumoniae* (*SpClpP*, 1Y7O)^[8] als Suchmodell gelöst (siehe Tabelle 1 und die Hintergrundinformationen). Wie ClpP aus anderen

Tabelle 1: Diffraktionsdaten und Statistiken der Strukturverfeinerung für *SaClpP*.

Datensammlung	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2
Elementarzellenachsen [Å]	172.1, 178.0, 100.3
Wellenlänge [Å]	1.0000
Auflösungsbereich [Å]	100–2.55 (2.65–2.55) ^[a]
Einzigartige Reflexe	100 837 (10 859)
Vollständigkeit [%]	99.9 (99.9)
Redundanz	10.4 (10.9)
Mosaikzität [°]	0.17
R_{sym} [%]	6.8 (78.0)
$I/\sigma(I)$	25.5 (4.9)
Strukturverfeinerung	
Nichtwasserstoffatome	20 407
RMSD ^[b] Bindungen [Å]	0.010
RMSD ^[b] Winkel [°]	1.15
R_{Krist} [%]	20.8
R_{frei} [%]	22.6
Bevorzugte Reste ^[c] [%]	96.4
Erlaubte Reste ^[c] [%]	3.6

[a] Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Mittlere quadratische Abweichung. [c] Ramachandran-Diagramm-Statistik von PROCHECK.^[14]

Spezies^[5] besteht auch *SaClpP* aus zwei heptameren Ringen, die ein tetradekameres Fass bilden (Abbildung 1). Im Unterschied zu allen anderen bekannten ClpP-Strukturen ist das Fass jedoch um etwa 10 Å in axialer Richtung komprimiert, und die Kontaktfläche der beiden Ringe enthält 14 äquato-

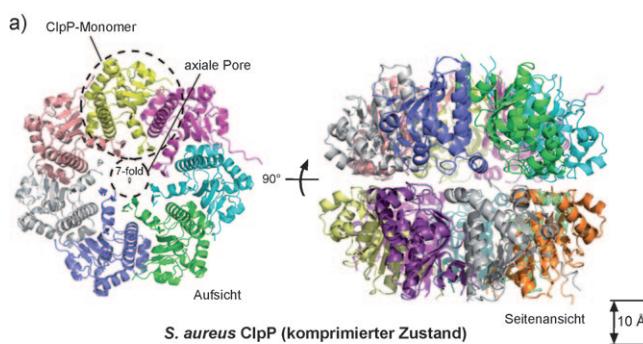


Abbildung 1. *S. aureus* ClpP nimmt einen komprimierten Zustand an. a) Zwei Ansichten im Bändermodell der Kristallstruktur von *S. aureus* ClpP (*SaClpP*) im bisher nicht beobachteten komprimierten Zustand. Das Enzym besteht aus zwei heptameren Ringen (nur einer ist in der Aufsicht dargestellt) mit einer siebenfachen Symmetriechen im Zentrum der axialen Pore. b) Gestreckter Zustand von ClpP, wie er in früheren Studien beobachtet wurde. Dargestellt ist hier die *E. coli*-ClpP-Struktur (*EcClpP*, PDB-Code 2FZS), die etwa 10 Å entlang der axialen Richtung gestreckt ist.

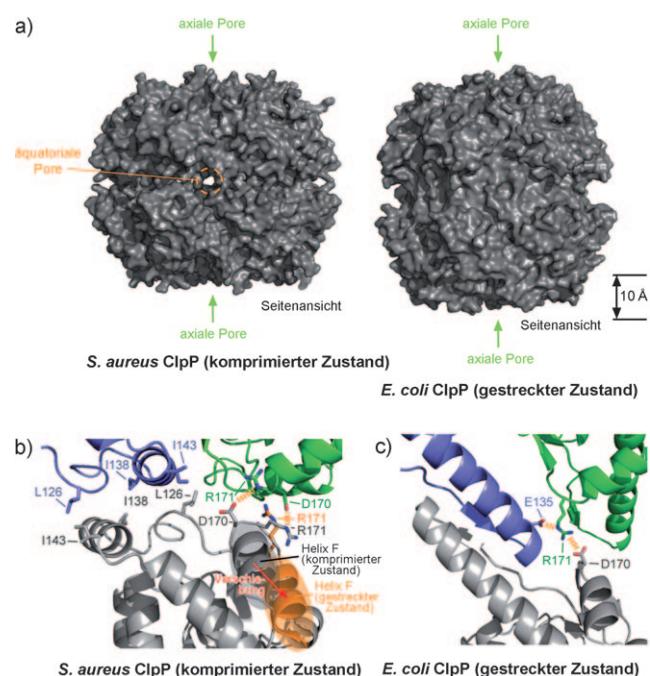


Abbildung 2. Übergang in der Kontaktfläche der beiden ClpP-Ringe und Bildung der äquatorialen Poren. a) Darstellung der Oberfläche von *SaClpP* (komprimierter Zustand mit gekennzeichneten äquatorialen Poren, links) und *EcClpP* (gestreckter Zustand ohne äquatoriale Poren, rechts). b) Nahansicht der Kontaktfläche beider Ringe im komprimierten Zustand von *SaClpP*. Stabilisierende hydrophobe Reste und Salzbrücken zwischen D170 und R171 der angrenzenden Untereinheiten sind angegeben. Die alternative Lage der Helix F im gestreckten Zustand ist hervorgehoben (orange). c) Umorganisierte Salzbrücken an der Kontaktfläche der beiden ClpP-Ringe im gestreckten Zustand (vergleiche Bildteil b).

riale Seitenporen, deren Durchmesser, je nach Konformation der Seitenketten, bis zu 6 Å betragen kann (Abbildung 2). Die Seitenporen sind durch konservierte hydrophobe Reste begrenzt und stellen offensichtlich den lange gesuchten Ausgang für die Peptidprodukte aus der Fasskammer von ClpP dar.^[8,9] Da die Primärstruktur von *SaClpP* zu 73 % identisch mit *SpClpP* ist und das Protein in allen Spezies hoch konserviert ist, repräsentiert das komprimierte Fass nicht eine speziespezifische Faltung, sondern einen anderen Konformationszustand.

Die Struktur des ClpP-Monomers ist bis auf einen entscheidenden Unterschied in der Henkelregion (Abbildung 3) sehr ähnlich zu anderen ClpP-Strukturen. Während die Henkelregion in allen bekannten Strukturen aus einer ausgestreckten oder teilweise ungeordneten α -E-Helix und einem sich daran anschließenden β -6-

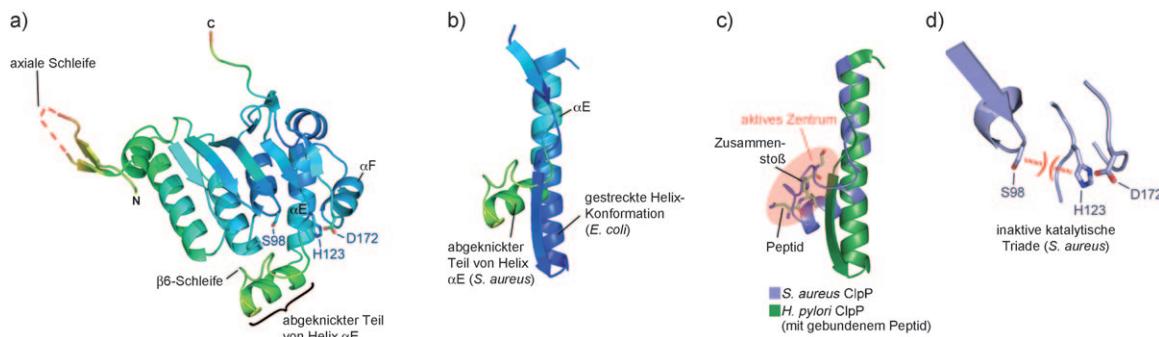


Abbildung 3. Die aktiven Zentren sind im komprimierten Zustand geschlossen. a) Das *SaClpP*-Monomer ist angelehnt an seine kristallographischen B-Faktoren in Regenbogenfarben von blau (niedrig) bis rot (hoch) dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente, die axiale Schleife, die Henkeldomäne und die Reste der katalytischen Triade sind markiert. b) Überlagerung der abgeknickten α E-Helix im komprimierten Zustand (*SaClpP*, PDB-Code 2FZS, dunkelblau) und der ausgestreckten α E-Helix im gestreckten Zustand (*EcClpP*, PDB-Code 2FZS, dunkelblau). c) Die abgeknickte Helix α E schließt das aktive Zentrum im komprimierten Zustand (*SaClpP*) ab. Der abgeknickte Teil der Helix α E in *SaClpP* (hellblau) ergibt einen Zusammenstoß mit einem gebundenem Peptid im aktiven Zentrum von *HpClpP*, das sich im gestreckten Zustand befindet (grün, 2ZL2). d) *SaClpP* weist eine inaktive Konformation der katalytischen Triade auf. Die Reste der Triade S98, H123 und D172 sind gekennzeichnet.

Faltblatt besteht, ist in der *SaClpP*-Struktur α E abgeknickt und β 6 ungeordnet (Abbildung 3b). Dieser große Strukturunterschied ist für die Kompression des ClpP-Fasses und die Öffnung der Seitenporen verantwortlich. Eine Überlagerung der *SaClpP*-Struktur mit dem *H. pylori*-ClpP-Substratkomplex (*HpClpP*, 2ZL2) ergab einen Zusammenstoß der abgeknickten Henkelhelix mit dem Substrat (Abbildung 3c), was zeigt, dass es sich bei der abgeknickten ClpP-Struktur um einen inaktiven Zustand handelt. Die katalytische Triade befindet sich ebenfalls in einer nichtfunktionalen Konfiguration (Abbildung 3d). Die abgeknickte Helix zeigt hohe kristallographische B-Faktoren (Abbildung 3a), was mit einer erhöhten Mobilität und unterschiedlichen Konformationen aus NMR-spektroskopischen Beobachtungen^[9] und Vorhersagen aus biochemischen Daten und Berechnungen^[12] übereinstimmt. Dies lässt vermuten, dass ein Konformationsschalter existiert, welcher den bisher beobachteten ClpP-Zustand in den neuen, hier vorgestellten komprimierten Zustand überführt. Der komprimierte Zustand unterscheidet sich von einem zuvor beschriebenen „kompakten Zustand“ von ClpP^[8,12] der dem gestreckten Zustand ähnelt, der keinen Knick in der Helix α E und nur eine geringe Verschiebung der Helix α F aufweist (Abbildung 4). Der kompakte Zustand könnte jedoch ein intermediärer Zustand am Beginn des Übergangs vom gestreckten in den komprimierten Zustand sein.

Strukturvergleiche lassen vermuten, dass konservierte Reste ein „Scharnier“ bilden, das die Basis für den funktionell entscheidenden Schalter in der Henkelregion darstellt. Um diese Vermutung zu testen, mutierten wir die Scharnierreste, die nicht Teil des katalytischen Zentrums sind, und analysierten den Effekt dieser Mutationen auf die Peptidasefunktion von ClpP bei der Spaltung eines Modellsubstrats (siehe

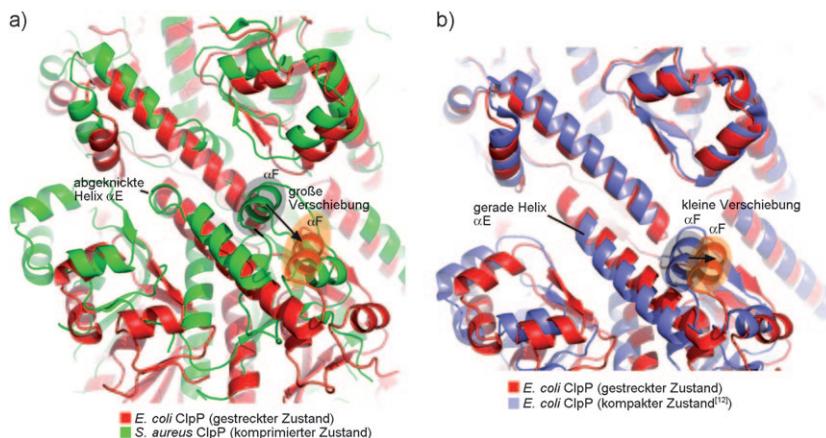


Abbildung 4. Der komprimierte Zustand von ClpP unterscheidet sich vom zuvor beschriebenen kompakten Zustand. a) Die Überlagerung von *SaClpP* (komprimierter Zustand) mit *EcClpP* im gestreckten Zustand (2FZS) zeigt das Abknicken der Helix α E und die große Verschiebung der Helix α F. b) Durch die Überlagerung von *SaClpP* (komprimierter Zustand) mit *EcClpP* im kompakten Zustand (3HLN)^[12] erkennt man kein Abknicken der Helix α E und nur eine geringe Verschiebung der Helix α F.

die Hintergrundinformationen). In diesen Untersuchungen war Wildtyp-ClpP aktiv ($K_m = 580 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.093 \text{ s}^{-1}$) während die Alanin-Mutation des katalytischen Rests S98 keine Aktivität aufwies (Abbildung 5); somit standen eine Positiv- und eine Negativkontrolle zur Verfügung. Zwei invariante Glycinreste, G127 und G131, sowie der Glycinrest G128 bilden einen Teil des Scharniers, und ihre Mutation zu Alanin führte zur Inaktivierung der Peptidase (Abbildung 5b). Der Rest E135 bildet eine Salzbrücke zu R171 wenn die Henkelhelix ausgestreckt ist, jedoch nicht wenn sie abgeknickt ist (Abbildung 5a). Dies lässt vermuten, dass die Salzbrücke den aktiven offenen Zustand stabilisiert. In Konsistenz mit diesem Modell führte die Mutation von E135 zu Alanin oder Arginin zum Verlust der Aktivität (Abbildung 5b). In ähnlicher Weise nimmt L144 verschiedene Positionen in beiden Zuständen ein und bildet Kontakte, die offensichtlich den abgeknickten Zustand stabilisieren (Abbildung 5a). Diese Vermutung

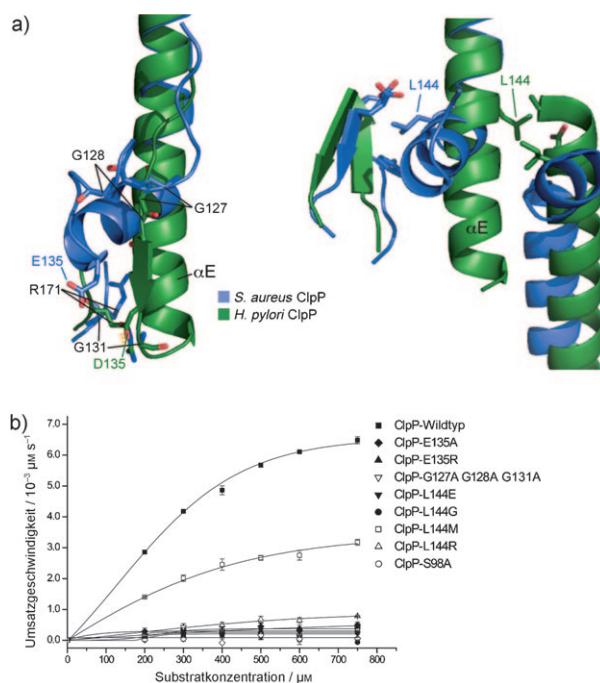


Abbildung 5. Ein Konformationsschalter ist für die Funktion von ClpP entscheidend. a) Positionen der ClpP-Aminosäurereste, die am Umschalten der Konformation in der Henkelregion beteiligt sind. Die Reste G127, G128 und G131 sind im komprimierten *SaClpP* (blau) und im gestreckten *HpClpP* (grün, 2ZL2) gekennzeichnet. Die Reste R171 und E135 bilden eine Salzbrücke im gestreckten, jedoch nicht im komprimierten Zustand. Der Rest L144 bildet Kontakte zu verschiedenen Resten in beiden Zuständen. b) Michaelis-Menten-Kinetik von ClpP-Mutanten. Der ClpP-Wildtyp ist als positive Kontrolle, die ClpP-Variante S98A als negative Kontrolle gegeben.

wurde durch die Mutationen von L144 zum isosteren hydrophoben Methioninrest mit teilweiser Aufrechterhaltung der Aktivität ($L144M, K_m = 523 \mu\text{M}, k_{cat} = 0,003 \text{ s}^{-1}$) und Mutation zu Glycin, Glutamat oder Arginin unter Verlust der Aktivität, bestätigt (Abbildung 5b). Diese Resultate sind in Einklang mit einem funktionell essenziellen Schalter, der die beiden beobachteten ClpP-Konformationen ineinander überführt.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, wie solche großräumigen Konformationsänderungen ohne Dissoziation der Ringe gewährleistet werden können, insbesondere da die beiden heptameren Ringe um acht Grad in axialer Richtung gegeneinander gedreht werden. Eine detaillierte Analyse der Änderungen in der Kontaktfläche zwischen den Ringen ergab, dass die Helix αF um 9 Å nach oben verschoben wird und die Reste D170 und R171 in einer zu dieser Helix benachbarten Schleife Salzbrücken zu ihren auf dem jeweils anderen Ring gegenüberliegenden entsprechenden Partnern eingehen (Abbildung 2b). Die Salzbrücken werden im aktiven, gestreckten Zustand von ClpP umorganisiert, bleiben jedoch erhalten (Abbildung 2c)^[6] und sind essenziell für die Stabilisierung der Kontaktfläche beider Ringe.^[8] Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beiden Kontakte nahe der αF -Helices beider Ringe den Zusammenhalt der Ringe stabilisieren. Im Einklang mit diesen Resultaten führt die Unterbrechung der Henkeldomäne nicht zur Dissoziation der

Ringe,^[8] und ein intaktes ClpP-Tetradekamer mit teilweise ungeordneter Henkeldomäne wurde für ClpP von *M. tuberculosis* beobachtet.^[13]

Unsere Ergebnisse und publizierte Daten führen zu einem dynamischen Modell der prozessiven ClpP-Proteasefunktion mit zwei Zuständen. Nach diesem Modell findet der Clp-vermittelte Abbau von Proteinen in sich wiederholenden Zyklen mit drei Schritten statt. Zuerst entfaltet eine ClpX-ATPase das Zielprotein und führt es über die axialen Poren in die Fasskammer von ClpP ein. Anschließend wird die Proteinkette von den aktiven Zentren der Protease ClpP in kleinere Peptidfragmente zerschnitten. Im dritten Schritt führt ein Umschalten der Konformation in der Henkelregion zusammen mit einer axialen Rotation der Ringe zum Verschluss der aktiven Zentren und zur Öffnung der äquatorialen Poren, was die Freisetzung und den Austritt der Produkte ermöglicht. Dieser Reaktionszyklus erklärt den prozessiven Charakter des Proteinabbaus durch ClpP, ohne Dissoziation der beiden ClpP-Ringe oder des Protease-ATPase-Komplexes. Um die Schlüsselschritte der Umwandlung des bereits bekannten gestreckten Zustands des ClpP-Fasses^[7] in den hier für *SaClpP* beschriebenen komprimierten Zustand zu verdeutlichen, haben wir eine Animation beigelegt (siehe die Hintergrundinformationen).

Experimentelles

Details für die Produktion und Aufreinigung von rekombinantem Protein sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt. Kurz gefasst wurden die *E. coli*-BL21-Zellen nach der Produktion von rekombinantem *S. aureus* ClpP lysiert, das Lysat mit 0.1% Polyethylenimin (pH 8.0) behandelt und der Überstand mit Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP, GE Healthcare) gereinigt. Reines ClpP wurde durch anschließende Aufreinigung an StrepTactin-Superflow-Kügelchen (IBA) erhalten. Die Kristallisation erfolgte in Hängetropfen bei 20°C mit einer Reservoirlösung von 1.8 M Ammoniumsulfat und 100 mM Natriumacetat bei pH 4.5. Die Struktur wurde durch „Molecular Replacement“ mit AMORE gelöst.

Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange-II-Kit für ortsgesuchte Mutagenese (Stratagene) durchgeführt. Die Michaelis-Menten-Kinetiken der verschiedenen ClpP-Varianten wurden durch die Spaltung des fluorogenen Modellsubstrats *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcumarin (SLY-AMC) und die daraus resultierende Freisetzung von AMC gemessen.

Die Koordinaten und Strukturfaktoren für die *S. aureus*-ClpP-Struktur wurden in der Protein Data Bank abgelegt (Zugangscode 3QWD).

Eingegangen am 26. Januar 2011
Online veröffentlicht am 4. Mai 2011

Stichwörter: ClpP-Hitzeschockprotein · Konformationsschalter · Proteasekomplex · Proteinstrukturen · Virulenzregulation

- [1] R. T. Sauer, D. N. Bolon, B. M. Burton, R. E. Burton, J. M. Flynn, R. A. Grant, G. L. Hersch, S. A. Joshi, J. A. Kenniston, I. Levchenko, S. B. Neher, E. S. Oakes, S. M. Siddiqui, D. A. Wah, T. A. Baker, *Cell* **2004**, *119*, 9–18.
[2] a) F. Striebel, W. Kress, E. Weber-Ban, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 209–217; b) S. Wickner, M. R. Maurizi, S. Gottesman, *Science* **1999**, *286*, 1888–1893.

- [3] a) S. Gottesman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19*, 565–587; b) T. A. Baker, R. T. Sauer, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 647–653.
- [4] K. H. Choi, S. Licht, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13921–13931.
- [5] A. Y. Yu, W. A. Houry, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3749–3757.
- [6] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 165–174.
- [7] D. Y. Kim, K. K. Kim, *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 760–771.
- [8] A. Gribun, M. S. Kimber, R. Ching, R. Sprangers, K. M. Fiebig, W. A. Houry, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16185–16196.
- [9] R. Sprangers, A. Gribun, P. M. Hwang, W. A. Houry, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16678–16683.
- [10] a) J. Wang, J. A. Hartling, J. M. Flanagan, *Cell* **1997**, *91*, 447–456; b) Y. I. Kim, R. E. Burton, B. M. Burton, R. T. Sauer, T. A. Baker, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 639–648.
- [11] L. D. Jennings, D. S. Lun, M. Medard, S. Licht, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11536–11546.
- [12] M. S. Kimber, A. Y. Yu, M. Borg, E. Leung, H. S. Chan, W. A. Houry, *Structure* **2010**, *18*, 798–808.
- [13] H. Ingvarsson, M. J. Mate, M. Hogbom, D. Portnoi, N. Benaroudj, P. M. Alzari, M. Ortiz-Lombardia, T. Unge, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2007**, *63*, 249–259.
- [14] R. A. Laskowski, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 1049–1067.