

Selektive Beobachtung der enzymatischen Aktivität des Tumorsuppressors Fhit**

Stephan M. Hacker, Franziska Mortensen, Martin Scheffner und Andreas Marx*

Abstract: Krebs ist eine der Haupttodesursachen weltweit. Die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressoren, hauptsächlich durch Mutationen in den entsprechenden Genen, ist ein Schlüsselereignis in der Krebsentstehung. Das „fragile histidine triade protein“ (Fhit) ist ein Tumorsuppressor, der in verschiedenen Krebsarten verändert ist. Fhit hat Diadenosintriphosphat-Hydrolase-Aktivität, aber obwohl die Reduktion dieser enzymatischen Aktivität wichtig für seine Tumorsuppressor-Aktivität zu sein scheint, ist deren Regulation unzureichend verstanden. In dieser Arbeit stellen wir eine neuartige fluorogene Sonde vor, die geeignet ist, die enzymatische Aktivität von Fhit in Extraktten humaner Zelllinien zu untersuchen. Diese neue Methode wird es ermöglichen, tiefgreifende Einblicke in die Mechanismen, die an der Regulation von Fhit beteiligt sind, zu erhalten und somit seine Rolle in der Krebsentstehung besser zu verstehen.

Krebs ist in der heutigen Zeit eine der häufigsten Todesursachen weltweit.^[1] Während der Entstehung von Krebs („Karzinogenese“) akkumulieren Mutationen in regulatorischen Genen, die Zellen vereinfacht gesehen mit karzinogenen Eigenschaften, wie Unsterblichkeit, unkontrollierter Zellteilung und Gewebsinvasivität ausstattet.^[2] Die Inaktivierung so genannter Tumorsuppressoren, die normalerweise das Zellwachstum begrenzen, ist ein Schlüsselprozess während dieses Vorgangs.^[3] Das „fragile histidine triad protein“ (Fhit), kodiert im fragilen FRA3B-Locus, ist einer dieser Tumorsuppressoren^[4] und ist oft in den frühen Stadien der Entwicklung verschiedener Krebsarten dereguliert;^[5] nichtsdestotrotz ist nicht bekannt, wie diese Deregulierung zur Krebsentwicklung beiträgt.

Fhit bildet Homodimere und hat Diadenosintriphosphat-Hydrolase-Aktivität (Ap_3Aase), mit der es Diadenosintriphosphat (Ap_3A) zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosindiphosphat (ADP) spaltet (Abbildung 1a).^[7] Ex-

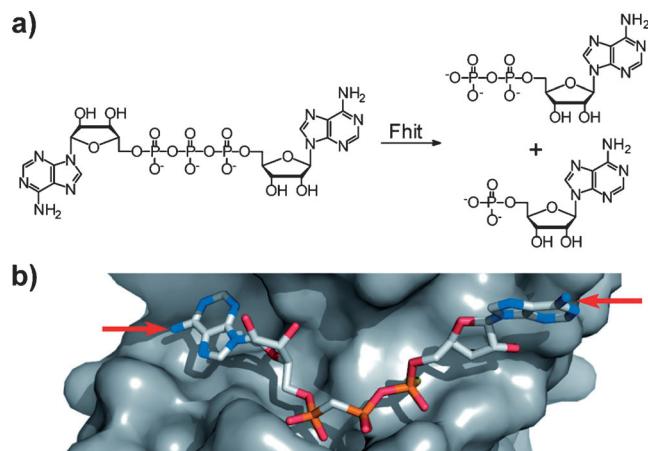


Abbildung 1. a) Enzymatische Aktivität von Fhit, das Ap_3A zu ADP und AMP spaltet. b) Nahansicht der Kristallstruktur von Fhit (PDB 1FHI, Connolly-Oberfläche) mit einem gebundenen, nichthydrolysierbaren Ap_3A -Analog.^[6] Die roten Pfeile zeigen die beiden N6-Positionen an, die in dieser Arbeit modifiziert wurden.

perimentelle Daten zeigen, dass diese hydrolytische Aktivität von Fhit nicht für seine Funktion als Tumorsuppressor benötigt wird,^[4] wohingegen die Bindung an Ap_3A essentiell ist.^[8] Als Antwort auf Zellstress steigt der Ap_3A -Spiegel, wodurch die Tumorsuppressor-Aktivität von Fhit durch Bindung an Ap_3A induziert wird.^[5] Durch die intrinsische Ap_3Aase -Aktivität von Fhit hätte dieser tumorsuppressive Komplex allerdings eine sehr kurze Lebensdauer. Daher wird angenommen, dass die hydrolytische Aktivität als Reaktion auf Zellstress zusätzlich reduziert wird.^[9] Tatsächlich konnte in Überexpressionsexperimenten sowie mit rekombinantem Fhit gezeigt werden, dass die Ap_3Aase -Aktivität teilweise durch Phosphorylierung durch die Src-Kinase reguliert sein könnte.^[9,10] Nichtsdestotrotz ist das tatsächliche Regulationsnetzwerk von Fhit unbekannt. Da der Ap_3A -Spiegel in humanen Zellen ein direktes Maß für die An- oder Abwesenheit von Fhit ist,^[11] wären fluorogene Ap_3A -Analoga wertvolle Werkzeuge, um die enzymatische Aktivität von Fhit in komplexen biologischen Systemen, zum Beispiel in Zellextrakten, zu untersuchen.

Fluorogene Substrate für Fhit, über die bisher berichtet wurde, waren zum einen eine Ap_3A -basierte Sonde mit fluoreszierenden Adenin-Analoga, die bei kurzen Wellenlängen fluoreszieren, was für viele Anwendungen unvorteilhaft ist.^[12] Des Weiteren wurde ein GTP-Analog verwendet;^[13] es ist jedoch fraglich, ob GTP-Analoga generell geeignet sind, Ap_3Aase -Aktivität selektiv zu detektieren. Keine der berichteten Methoden ermöglicht es, die enzymatische

[*] Dr. S. M. Hacker, Dipl.-Nat. F. Mortensen, Prof. Dr. M. Scheffner, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie und Fachbereich Biologie
Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Wir bedanken uns bei der DFG (SFB 969) und der Konstanz Research School Chemical Biology für finanzielle Unterstützung. S.M.H. dankt der Konstanz Research School Chemical Biology, der Studienstiftung des deutschen Volkes und dem Zukunftskolleg der Universität Konstanz für ein Stipendium. Wir bedanken uns bei J. Zwacka-Pankau (Universität Gdańsk) für die freundliche Überlassung des Expressionskonstrukts für Fhit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405259> zu finden.

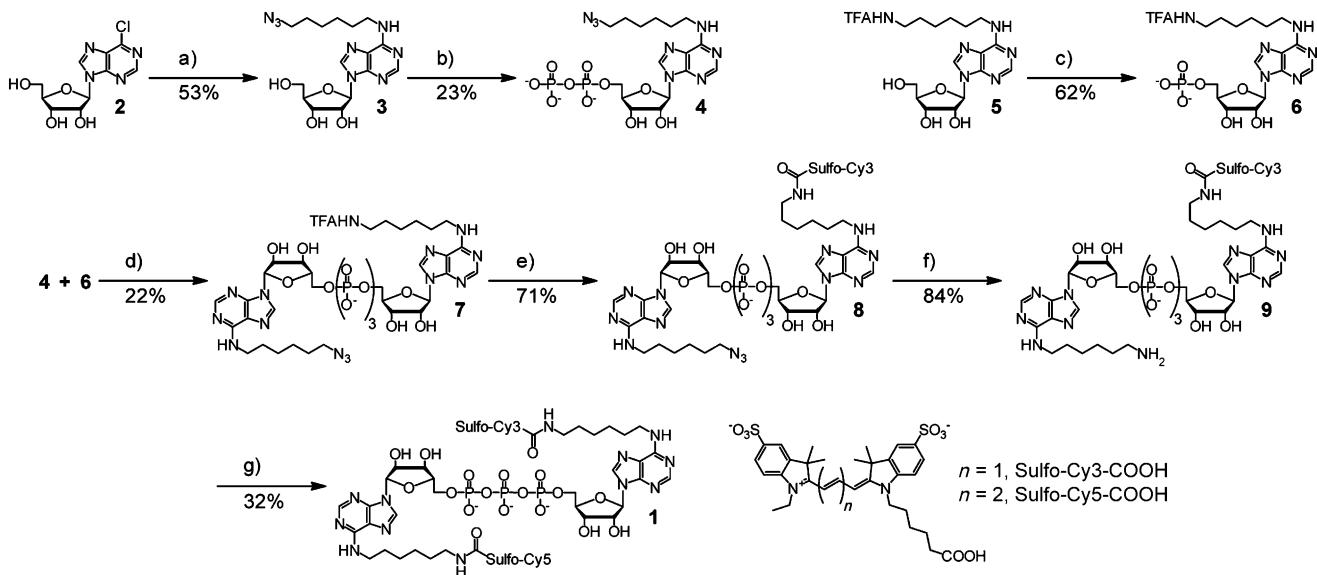
Aktivität von endogenem Fhit z.B. in Extrakten von Zellen oder Zelllinien zu untersuchen.

Daher wollten wir ein Ap₃A-Analog als fluorogenes Substrat für Fhit entwickeln, das mit zwei synthetischen Farbstoffen modifiziert ist, die in der Lage sind, einen Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) einzugehen. Dieses Analog sollte mit hoher Effizienz ausschließlich von Fhit gespalten werden und während der Spaltung eine große Veränderung seiner Fluoreszenzeigenschaften zeigen. Weiterhin sollte diese Messung bei langen Wellenlängen möglich sein, die geeignet sind, um Fhit in komplexen biologischen Systemen zu untersuchen. Durch Betrachtung der Kristallstruktur von Fhit mit einem gebundenen, nicht hydrolysierbaren Ap₃A-Analog (Abbildung 1b)^[6] haben wir festgestellt, dass beide N6-Positionen von Ap₃A zugänglich sind und daher modifizierbar sein sollten, ohne die Akzeptanz durch Fhit signifikant zu stören. Wir haben daher Sonde **1** (Schema 1) als fluorogenes Substrat entworfen, um die enzymatische Aktivität von Fhit zu untersuchen. Als Farbstoffe haben wir Sulfo-Cy3 und Sulfo-Cy5 verwendet, da diese bereits erfolgreich angewendet wurden, um Nukleotidspaltung zu untersuchen.^[14]

Die Synthese von Sonde **1** begann mit 6-Chlor-9-(β-D-ribofuranosyl)purin **2** (Schema 1), das mit 6-Azidohexylamin^[16] behandelt wurde, um Verbindung **3** in 53 % Ausbeute zu erhalten. Umsatz mit Phosphoroxychlorid und anschließende Behandlung mit Bis(tributylammonium)phosphat ergab Verbindung **4** in 23 % Ausbeute. Für die Synthese des orthogonal geschützten zweiten N6-modifizierten Nukleotids wurde Verbindung **5**^[17] an der O5'-Position phosphoryliert, um **6** in 62 % Ausbeute zu erhalten. Die beiden Nukleotide wurden analog zu einer publizierten Vorschrift gekoppelt,^[18] um das Ap₃A-Analog **7** in 22 % Ausbeute zu erhalten. Der erste Farbstoff wurde angebracht, indem das Trifluoracetamid

mit Natriumhydroxid entschützt wurde und das entstandene freie Amin mit dem Sulfo-Cy3-N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester gekoppelt wurde, um Verbindung **8** in 71 % Ausbeute zu erhalten. Das Azid wurde über eine Staudinger-Reaktion reduziert, und Verbindung **9** wurde in 84 % Ausbeute erhalten. Die Synthese wurde durch Kupplung des Sulfo-Cy5-NHS-Esters abgeschlossen, wodurch Sonde **1** in 32 % Ausbeute erhalten wurde.

Als nächstes haben wir getestet, ob Sonde **1** als fluorogenes Substrat von Fhit akzeptiert wird. Während Sonde **1** in Abwesenheit des Enzyms stabil ist, wurde per RP-HPLC quantitative Spaltung von Sonde **1** durch rekombinantes Fhit detektiert (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Fluoresenzspektren der gespaltenen und nichtgespaltenen Sonde **1** (Abbildung S2) zeigen einen 86-fachen Unterschied im Verhältnis der Fluoreszenzintensität des Donors und des Akzeptors. Nach quantitativer Spaltung ist nur minimale Fluoreszenz des Akzeptors Sulfo-Cy5 detektierbar, die von direkter Anregung dieses Farbstoffs herührt. Anschließend haben wir den Zeitverlauf der enzymatischen Reaktion von Fhit mit Sonde **1** untersucht (Abbildung 2a). Die Fluoresenzspektren von Sonde **1** in Anwesenheit von Fhit zeigen einen Abfall der Akzeptorfluoreszenz und einen Anstieg der Donorfluoreszenz mit der Zeit. Dies wurde in der Abwesenheit von Fhit nicht beobachtet (Abbildung S3). Durch Verwendung der Donorfluoreszenzintensität als Maß für die Spaltung von Sonde **1** kann die Umsatzrate von Sonde **1** durch Fhit berechnet werden (Abbildung 2b und Abbildung S4). Diese Rate ist über mindestens zwei Größenordnungen linear von der Konzentration vom Fhit-Wildtyp abhängig und enzymatische Aktivität konnte auch bei sub-nanomolaren Konzentrationen von Fhit detektiert werden. Für die katalytisch inaktive H96N-Mutante von Fhit^[7] konnte über den kompletten Konzentrationsbereich



Schema 1. Synthese von Sonde **1**. Bedingungen: a) 6-Azidohexylamin, Ethanol, 3 h, Rückfluss; b) 1. POCl₃, Trimethylphosphat, 1 h, 0°C; 2. (Bu₃NH⁺)₂HPO₄⁻, Bu₃N, DMF, 30 min, RT; 3. 0.1 M TEAB, 30 min, RT; c) 1. POCl₃, Trimethylphosphat, 1 h, 0°C; 2. 0.1 M TEAB, 30 min, RT; d) 1. 6, Et₃N, TFAA, AcCN, 10 min, RT; 2. N-Methylimidazol, Et₃N, 10 min, 0°C; 3. 4, 4-Å-Molekularsieb, DMF, 2 h, RT; 4. 0.1 M TEAB, 30 min, RT; e) 1. 0.1 M NaOH, 3 h, RT; 2. Sulfo-Cy3-NHS-Ester, 0.1 M NaHCO₃, DMF, 12 h, RT; f) TCEP-HCl, Wasser, Methanol, Et₃N, 12 h, RT; g) Sulfo-Cy5-NHS-Ester, 0.1 M NaHCO₃, DMF, 12 h, RT.

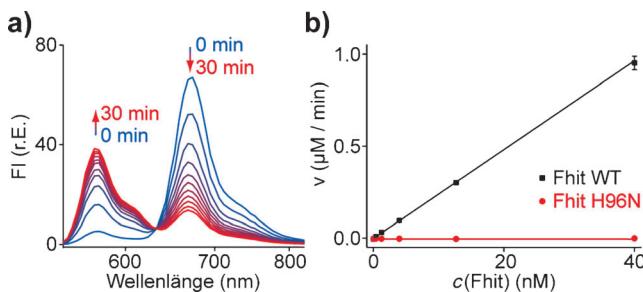


Abbildung 2. a) Veränderung der Fluoreszenzspektren von Sonde **1**, angeregt bei 490 nm, in der Anwesenheit von Fhit mit der Zeit. FI: Fluoreszenzintensität; r.E.: relative Einheiten. b) Abhängigkeit der Umsatzrate (v) von Sonde **1** durch rekombinanten Fhit-Wildtyp (Fhit WT) oder die H96N-Mutante von Fhit. Daten zeigen Mittelwert \pm Standardfehler von Triplikaten. Experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

keine enzymatische Aktivität detektiert werden. Durchführung des Experiments mit dem Fhit-Wildtyp bei verschiedenen Konzentrationen von Sonde **1** (Abbildung S5) ergab $K_m = (2.39 \pm 0.08)$ µM. Dieser ist in derselben Größenordnung wie der K_m -Wert für das natürliche Substrat,^[10] was die gute Akzeptanz der Sonde **1** durch Fhit zeigt. Um die Anwendbarkeit von Sonde **1** zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Fhit weitergehend zu prüfen, haben wir zwei bekannte Inhibitoren von Fhit getestet (Abbildung S6).^[12] Suramin und Zinkchlorid inhibieren Fhit mit IC₅₀-Werten von (1.10 ± 0.17) µM bzw. (43.7 ± 9.2) µM.^[12] Dies ist in guter Übereinstimmung mit den berichteten IC₅₀-Werten im nichtmodifizierten System. Weiterhin wird Sonde **1** nicht durch die Lewis-Säure Zinkchlorid alleine gespalten.

Als nächstes haben wir untersucht, ob die enzymatische Aktivität von Fhit auch in Lysaten von humanen Zellen detektiert werden kann. Zu diesem Zweck haben wir zunächst die H1299-Lungenkrebszelllinie verwendet, von der bereits gezeigt wurde, dass sie kein Fhit exprimiert (Abbildung 3a,b und Abbildung S7).^[19] Wir haben diese Zellen mit Expressionskonstrukten für den Fhit-Wildtyp, die katalytisch inaktive H96N-Mutante von Fhit oder einem Vektor ohne insertiertes Fhit-Gen (leerer Vektor) als Kontrolle transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Extrakte der Zellen angefertigt und die Fhit-Aktivität gemessen. Die Entstehung eines Fluoreszenzsignals konnte ausschließlich detektiert werden, wenn **1** in der Gegenwart von Zellextrakt, der den Fhit-Wildtyp enthält, inkubiert wurde. In allen anderen Fällen konnte kein signifikantes Signal beobachtet werden. Dies zeigt, dass Sonde **1** ein selektives Substrat für Fhit ist und dass sie in Zellextrakten stabil ist (d.h. sie erzeugt kein Hintergrundsignal).

Um die Funktionen von Fhit in einem biologisch relevanten System zu untersuchen, wäre es wichtig endogenes Fhit untersuchen zu können. Daher haben wir als nächstes die embryonale, humane Nierenzelllinie HEK 293T verwendet, die endogenes Fhit exprimiert (Abbildung 3c,d und Abbildung S8).^[20] Wir beobachteten, dass Sonde **1** in HEK 293T-Extrakten umgesetzt wird, während sie in H1299-Lysaten, die kein Fhit enthalten, stabil ist. Dies zeigt, dass Ap₃A tatsächlich in humanen Zellen vorwiegend von Fhit umgesetzt

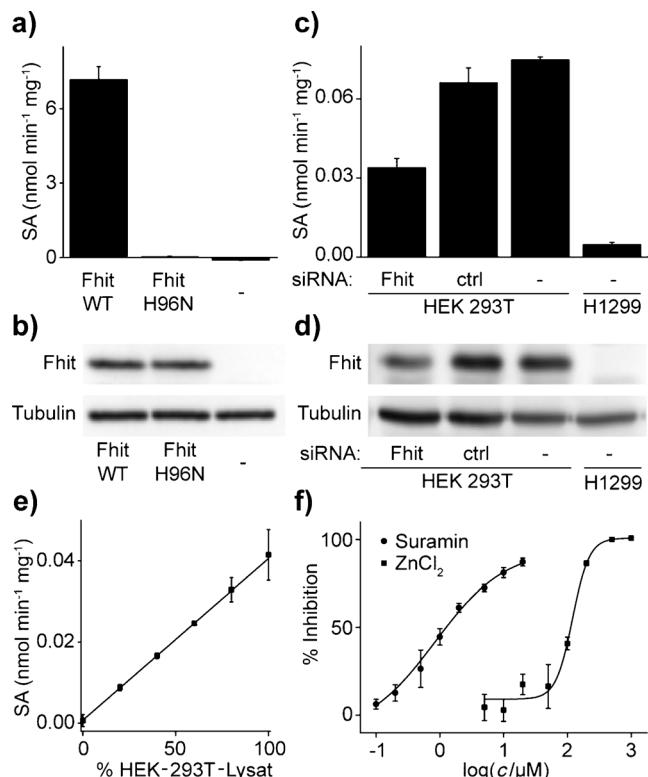


Abbildung 3. a) Spezifische Aktivität (SA) des Umsatzes von Sonde **1** in Zelllysaten von Fhit-negativen H1299-Zellen,^[19] die mit Expressionskonstrukten für den Fhit-Wildtyp (Fhit WT), die katalytisch inaktive H96N-Mutante von Fhit oder einem leeren Vektor transfiziert wurden. Die Fhit-Varianten wurden als HA-markierte Konstrukte exprimiert. b) Western-Blot von den Zelllysaten, die in a) verwendet wurden unter Verwendung von Tubulin als Ladekontrolle und α -HA-Antikörpern zur Detektion der HA-Fhit-Varianten. c) Spezifische Aktivität (SA) des Umsatzes von Sonde **1** in Lysaten von Fhit-positiven HEK-293T-Zellen^[20] behandelt mit siRNA gegen Fhit, Kontroll-siRNA (ctrl) oder ohne Transfektion, im Vergleich zu Fhit-negativen H1299-Zellen. d) Western-Blot der Zelllysate, die in c) verwendet wurden unter Verwendung von Tubulin als Ladekontrolle und α -Fhit-Antikörpern zur Detektion von endogenem Fhit. e) Spezifische Aktivität (SA) des Umsatzes von Sonde **1** in Mischungen von Zelllysaten von Fhit-positiven HEK-293T-Zellen und Fhit-negativen H1299-Zellen bei einer konstanten Gesamtprotein-Konzentration. f) Konzentrationsabhängige Inhibition der enzymatischen Aktivität von Fhit durch zwei bekannte Inhibitoren. Daten zeigen Mittelwert \pm Standardfehler von Triplikaten. Experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

wird^[11] und dass diese Spezifität mit Sonde **1** erhalten bleibt. Um weiterhin zu zeigen, dass diese Aktivität von endogenem Fhit herrührt, haben wir ein siRNA-Experiment durchgeführt. Das HEK-293T-Zelllysat, das mit siRNA gegen die mRNA von Fhit behandelt wurde, zeigte eine etwa halb so hohe enzymatische Aktivität von Fhit im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden oder die nicht behandelt wurden. Da dies mit der reduzierten Konzentration von Fhit korreliert (Abbildung 3d), können wir schließen, dass die Spaltung von Sonde **1** in HEK-293T-Zellextrakten durch endogenes Fhit verursacht wird.

Um weiter zu zeigen, dass die Methode geeignet ist, um Effektoren der enzymatischen Aktivität von endogenem Fhit zu untersuchen, haben wir als nächstes die Linearität der

Methode gegenüber verschiedenen Konzentrationen an endogenem Fhit untersucht (Abbildung 3e und Abbildung S9). Zu diesem Zweck haben wir verschiedene Verhältnisse von Fhit-positivem HEK-293T-Zelllysat mit Fhit-negativem H1299-Zelllysat gemischt, um eine konstante Gesamtproteininkonzentration während der Messung sicherzustellen. Tatsächlich steigt die Menge von gespaltener Sonde **1** linear mit dem Anteil an HEK-293T-Lysat, und die Ap₃Aase-Aktivität hängt daher auch in Zelllysaten linear von der Fhit-Konzentration ab.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sonde **1** geeignet ist, die Effekte von Fhit-Inhibitoren in HEK-293T-Zellextrakten quantitativ zu bestimmen (Abbildung 3f und Abbildung S10). Suramin^[12] inhibiert endogenes Fhit in Zellextrakten mit einem IC₅₀ von (0.84 ± 0.22) μM, was vergleichbar mit dem mit rekombinanten Enzym gemessenen Wert ist. Auch Zinkchlorid^[12] inhibiert endogenes Fhit in Zelllysaten; allerdings mit einem erhöhten IC₅₀ von (121 ± 5) μM. Dies könnte durch die Anwesenheit von anderen Zink-bindenden Komponenten in Zelllysaten erklärt werden, die die freie Konzentration von Zink-Ionen reduzieren.

Zusammenfassend präsentieren wir einen neuartigen Ansatz, um die enzymatische Aktivität des Tumorsuppressors Fhit zu messen. Zu diesem Zweck haben wir ein Ap₃A-Analog entwickelt, das mit zwei Fluorophoren modifiziert ist, die FRET eingehen, und das vergleichbar gut wie das natürliche Substrat von Fhit akzeptiert wird. Die große Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften bei der Spaltung dieses Analogs ermöglicht es, die enzymatische Aktivität von Fhit robust und selektiv zu detektieren. Die Messung der Fhit-Aktivität mit dieser Methode ist sogar bei physiologisch relevanten Konzentrationen von Fhit, wie sie in Zellextrakten von humanen Zelllinien auftreten, möglich. Die präsentierte Methode wird daher ein wichtiges Werkzeug sein, um die Regulation von Fhit unter physiologischen Bedingungen zu analysieren und so Einblicke in seine Rolle in den frühen Stadien der Krebsentstehung zu erhalten. Weiterhin wird sie anwendbar sein, um positive sowie negative Effektoren von Fhit zu identifizieren und zu charakterisieren.

Eingegangen am 14. Mai 2014,
veränderte Fassung am 25. Juni 2014
Online veröffentlicht am 5. August 2014

Stichwörter: Diadenosintriphosphat ·
fragile histidine triade protein · FRET · Krebs · Nukleotide

- [1] *World Cancer Report 2014*, Bd. 3 (Hrsg.: B. W. Stewart, C. P. Wild), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2014.
- [2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646.
- [3] R. A. Weinberg, *Science* **1991**, *254*, 1138.
- [4] Z. Siprashvili, G. Sozzi, L. D. Barnes, P. McCue, A. K. Robinson, V. Eryomin, L. Sard, E. Tagliabue, A. Greco, L. Fusetti, G. Schwartz, M. A. Perotti, C. M. Croce, K. Huebner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13771.
- [5] J. C. Saldivar, H. Shibata, K. Huebner, *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109*, 858.
- [6] H. C. Pace, P. N. Garrison, A. K. Robinson, L. D. Barnes, A. Draganescu, A. Rösler, G. M. Blackburn, Z. Siprashvili, C. M. Croce, L. Huebner, C. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5484.
- [7] L. D. Barnes, P. N. Garrison, Z. Siprashvili, A. Guranowski, A. K. Robinson, S. W. Ingram, C. M. Croce, M. Ohta, K. Huebner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11529.
- [8] F. Trapasso, A. Krakowiak, R. Cesari, J. Arkles, S. Yendumuri, H. Ishii, A. Vecchione, T. Kuroki, P. Bieganski, H. C. Pace, K. Huebner, C. M. Croce, C. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1592.
- [9] Y. Pekarsky, P. N. Garrison, A. Palamarchuk, N. Zanesi, R. I. Aqueilan, K. Huebner, L. D. Barnes, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3775.
- [10] P. N. Garrison, A. K. Robinson, Y. Pekarsky, C. M. Croce, L. D. Barnes, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6286.
- [11] G. A. Murphy, D. Halliday, A. G. McLennan, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2342.
- [12] A. C. Asensio, S. Oaknin, P. Rotllan, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, *1432*, 396.
- [13] A. Draganescu, S. C. Hodawadekar, K. R. Gee, C. Brenner, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4555.
- [14] a) S. M. Hacker, D. Pagliarini, T. Tischer, N. Hardt, D. Schneider, M. Mex, T. U. Mayer, M. Scheffner, A. Marx, *Angew. Chem. 2013*, *125*, 12133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11916; b) N. Hardt, S. M. Hacker, A. Marx, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8298.
- [15] H. Zhao, A. R. Pagano, W. Wang, A. Shallol, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7832.
- [16] C. Romuald, E. Busseron, F. Coutrot, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6516.
- [17] S. M. Hacker, N. Hardt, A. Buntru, D. Pagliarini, M. Möckel, T. U. Mayer, M. Scheffner, C. R. Hauck, A. Marx, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1588.
- [18] S. Mohamady, S. D. Taylor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6344.
- [19] A. Joannes, A. Bonnomet, S. Bindels, M. Polette, C. Gilles, H. Burlet, J. Cutrona, L.-M. Zahm, P. Birembaut, B. Nawrocki-Raby, *Oncogene* **2010**, *29*, 1203.
- [20] J. C. Saldivar, S. Miuma, J. Bene, S. A. Hosseini, H. Shibata, J. Sun, L. J. Wheeler, C. K. Mathews, K. Huebner, *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1003077.