



FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
BRESCIA

LATTE DI ASINA

produzione, caratteristiche e gestione dell'azienda asinina

Eugenio Milonis
Paolo Polidori

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA

82

STATO DELL'ARTE SULLA CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA E GENOMICA DELLE PROTEINE DEL LATTE DI ASINA

L. RAMUNNO¹, L. CHIANESE², P. DI GREGORIO³, A. RANDO³, D. MARLETTA⁴,
L. MAURIELLO², M. QUARTO², D. GALLO¹, A. PAUCIULLO¹, G. COSENZA¹, A. NARDONE⁵

¹ Dipartimento di Scienza del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali,
Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Portici, Napoli (Italia)

² Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli 'Federico II',
Portici, Napoli (Italia)

³ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli Studi della Basilicata,
Potenza (Italia)

⁴ Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali,
Università degli Studi di Catania (Italia)

⁵ Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo (Italia)

Il latte di asina, oltre che per la formulazione di prodotti quali saponi e creme le cui proprietà terapeutiche ed estetiche sono note fin dall'antichità, recentemente assume una particolare importanza anche per l'alimentazione umana, in particolar modo per quella neonatale nei casi, sempre più diffusi, di allergie multiple. Tuttavia, attualmente gli studi sugli aspetti quantitativi e qualitativi del latte di asina sono limitati, se comparati a quelli condotti sul latte di altre specie. Solo recentemente il mondo della ricerca ha mostrato una particolare attenzione alla caratterizzazione sia a livello proteomico che genomico delle proteine del latte di tale specie. In particolare, a partire dal 2007 si è dato avvio ad un rilevante progetto nazionale di durata triennale denominato SelMol, acronimo di Selezione Molecolare, finalizzato al miglioramento genetico di specie animali di interesse zootecnico tra le quali quella asinina.

PROTEOMICA

L'utilizzo del latte di asina quale succedaneo del latte di donna trova un supporto obbiettivo nel suo livello quantitativo in macronutrienti, in particolare proteine e glucidi, più vicino al latte umano che non a quello bovino.

Per quanto attiene la componente lipidica questa si caratterizza per alti livelli di acido linoleico (circa 8,15 % di acidi grassi totali) e linolenico (circa 6,32 %).

Simile al latte di donna sono il contenuto di lattosio (5,8–7,4 vs 6,3–7,0 g/100g), il livello delle proteine totali (1,8 asina contro 1,5 donna) così come il rapporto caseine e sieroproteine (Figura 1, 2 e 3).

Particolarmente investigate nella specie asinina sono le siero proteine: lattoferrina (contenuto % 4,48), sieroalbumina (6,18%), α -lattoglobulina (29,85%), lisozima (21,03%) e β -lattoglobulina I e II (22,56%). In particolare, la quantità di β -lattoglobulina è simile a quella del latte di cavalla, ma più bassa di quello di vacca il che, associato al basso contenuto caseinico, potrebbe dar conto della maggiore tollerabilità del latte di asina rispetto a quello dei ruminanti. Inoltre, la concentrazione di lisozima è notevolmente più alta rispetto a quella presente nel latte altre specie. Tale enzima, insieme ad altri fattori quali immunoglobuline, lattoferrina e lattoperossidasi può ridurre l'incidenza di infezioni gastrointestinali negli infanti.

Attualmente si dispone della sequenza completa del lisozima la quale è lunga 129 amino acidi ed evidenzia il 50% di omologia con il corrispettivo umano. Analogamente, è stata determinata la struttura primaria completa della β -lattoglobulina I (162 aa) e β -lattoglobulina II (163 aa).

Nella specie asinina si conosce solo una variante della α -lattoalbumina, anche se questa proteina sembra mostrare un certo grado di eterogeneità elettroforetica. Grazie all'uso combinato della mappatura di massa peptidica sequenziamento mediante spettrometria di massa in

tandem (MS/MS) è stato possibile identificare e caratterizzare una variante del lisozima, una della β -lattoglobulina I e tre della β -lattoglobulina II. La variante del lisozima (B, Mr 14.631 Da) si caratterizza per tre sostituzioni aminoacidiche ($N^{49} \rightarrow D$, $Y^{52} \rightarrow S$ e $S^{61} \rightarrow N$). Allo stesso modo la variante della β -lattoglobulina I (B, Mr 18.510 Da) si caratterizza per tre sostituzioni aminoacidiche ($E^{36} \rightarrow S$, $S^{97} \rightarrow T$ e $V^{150} \rightarrow I$), mentre le tre varianti della β -lattoglobulina di tipo II (B, C e D) si caratterizzano rispettivamente per due ($C^{110} \rightarrow P$ e $M^{118} \rightarrow T$), tre ($D^{96} \rightarrow E$, $C^{110} \rightarrow P$ e $M^{118} \rightarrow T$) e due ($P^{110} \rightarrow C$ e $N^{162} \rightarrow G$) sostituzioni aminoacidiche.

Recentemente, le nostre ricerche hanno messo in evidenza pattern elettroforetici di latte di asina Ragusana caratterizzati dall'apparente assenza di β -lattoglobulina di tipo II e l'identificazione e caratterizzazione anche di tutte e quattro frazioni caseiniche: α_{s1} , β , α_{s2} e κ . Inoltre, è stata messa in evidenza la loro eterogeneità compositiva dovuta a processi postraduzionali come la fosforilazione (α_{s1} , b e α_{s2}) e la glicosilazione (κ), a forme non alleliche conseguenti all'incorretto splicing del trascritto primario in mRNA (α_{s1} e β) e al polimorfismo genetico (presenza di una o più varianti genetiche) (Figura 4, 5 e 6).

Nello specifico, l' α_{s1} di asina è costituita da almeno 4 componenti di cui due principali costituiti dalla α_{s1} lunga 202 aa nei due stati di fosforilazione 5P e 6P e due secondari, con gli stessi gradi di fosforilazione, costituiti da una proteina più corta del peptide α_{s1} (f 34-38). Per mezzo di cromatografia RP-HPLC sono stati identificati due fenotipi di α_{s1} e, mediante focalizzazione isoelettrica un fenotipo apparentemente nullo.

La caseina β esibisce una carica netta negativa ed un punto isoelettrico molto simili a quelli dell'omologa bovina. Anch'essa è risultata eterogenea per la presenza di tre componenti fosforilati (7P, 6P e 5P) e da una forma non allelica deleta del peptide β (f27-34) a sua volta presente negli stessi tre gradi di fosforilazione. L'analisi elettroforetica e cromatografica hanno messo in evidenza almeno quattro varianti denominate A, B, C e D.

L' α_{s2} di asina esibisce la più elevata carica netta negativa rispetto alle altre frazioni caseiniche ed un pI molto simile a quello delle β -CN. La sua struttura primaria consiste in una proteina lunga 221 amminoacidi (Figura 7) con peso molecolare di 26029 Da presente in almeno tre gradi di fosforilazione (10, 11 e 12P).

Per quanto riguarda la caseina κ è stata visualizzata nei diversi profili elettroforetici solo dopo immunocolorazione con anticorpi policlonali specifici probabilmente per il suo basso livello di espressione. I risultati mettono in evidenza, anche per questa specie, una elevata eterogeneità compositiva, che, in analogia con le altre specie, è dovuta al diverso grado di glicosilazione.

Dalla valutazione delle omologie di sequenza dell' α_{s1} -CN e della β -CN delle tre specie, asina, donna e vacca, la più elevata è riscontrata tra la specie asinina e quella umana sia per l' α_{s1} -CN (42% contro il 31% vacca-donna) che per la β -CN (57% contro il 54% vacca-donna). Tale dato, strettamente dipendente dalle sequenze aminoacidiche delle proteine a confronto, in aggiunta al basso livello quantitativo di tali due frazioni nel latte di asina, potrebbe dar conto della migliore tollerabilità del latte di tale specie.

Un'altra peculiarità compositiva che rende tale latte più simile a quello di donna, rispetto al più usato latte bovino nella produzione delle formule, è il livello di NPN (0,23 asina contro lo 0,34 donna). Come è noto esso è costituito in gran parte da peptidi derivanti all'idrolisi delle caseine per attività enzimatiche endogene e che svolgono diverse bioattività tra le quali quella antiossidante.

GENOMICA

La specie asinina è dal punto vista genetico poco investigata e ciò rappresenta il vero limite per il suo miglioramento genetico.

I risultati conseguiti nell'ambito del progetto Selmol e che di seguito si riportano hanno

reso possibile analizzare ed individuare una certa variabilità nei geni che influenzano le caratteristiche quali-quantitative del latte.

Analogamente ai ruminanti, le quattro frazioni caseiniche (α_{s1} , β , α_{s2} e κ) presenti nel latte di asina sono codificate da quattro geni autosomici strettamente associati (rispettivamente *CSNIS1*, *CSN2*, *CSNIS2* e *CSN3*). Nei bovini, negli ovini e nei caprini l'intero complesso genico delle caseine è localizzato sul cromosoma 6, mentre per il cavallo esso mappa sul cromosoma 22. Tale cluster nei ruminati occupa una regione di DNA di 250 Kb, in cui i quattro geni sono organizzati nel seguente ordine: *CSNIS1*, *CSN2*, *CSNIS2* e *CSN3*. Analogamente ai ruminati, uomo e roditori, anche nel cavallo i geni *CSNIS1* e *CSN2* sono convergentemente trascritti. Attualmente non è nota la localizzazione cromosomica di tali geni nella specie asinina.

Caratteristica comune ai geni delle caseine sensibili al calcio (α_{s1} , β , α_{s2}) è la notevole somiglianza nell'organizzazione strutturale, in particolare, a livello delle sequenze codificanti il peptide leader, il sito multiplo di fosforilazione e la regione non tradotta al 5', a monte della quale mostrano delle sequenze comuni che sono importanti nella regolazione dell'espressione genica. Ciò avvalorava l'ipotesi di una loro origine filogenetica comune.

Il gene che codifica per la caseina α_{s2} (*CSNIS2*) è stato completamente sequenziato nella specie bovina, mentre sia per la specie ovina, caprina e bufalina si dispone di sequenze relative a cDNA e di parziali sequenze genomiche. Inoltre, è stato osservato che le specie umana, murina e cunicola si caratterizzano per la presenza di due forme presumibilmente non codificanti per tali geni. Per mezzo dell'applicazione di metodiche molecolari quali la PCR e l'RT-PCR sono state identificate e caratterizzate due differenti forme del gene *CSNIS2* per la specie asinina denominate *CSNIS2 I* e *CSNIS2 II*. Il cDNA relativo al gene *CSNIS2 I* si estende su di un tratto di 1016 nucleotidi che comprende 19 esoni le cui grandezze variano da 24 bp (esoni 4, 8 e 15) a 156 bp (esone 19) (Figura 8). La regione 5' non tradotta (5' UTR) del gene comprende l'intero 1° esone ed i primi 11 nucleotidi del 2° esone, mentre gli ultimi due esoni contengono la regione 3' UT. Il peptide leader (45 bp) è codificato dal 2° esone (dal 12° al 56° nucleotide, mentre lo stop codon si localizza tra i nucleotidi 10 e 12 del 18° esone. La sequenza del cDNA del gene *CSNIS2 I* di asina mostra un'omologia di circa il 74% con quella della corrispondente sequenza per la specie bovina. In accordo a quanto determinato a livello proteomico, tale gene codifica per una proteina matura di 221 aminoacidi (denominata α_{s2} -I) vs 207 della corrispondente proteina nella specie bovina. A tale *locus* sono state evidenziate due mutazioni: la prima consiste in una transizione silente G→A al 12° nucleotide del 14° esone, la seconda è una transizione T→C responsabile della sostituzione aminoacidica Ile¹¹⁷→Thr.

Per quanto riguarda il *locus CSNIS2 II*, il cDNA di tale gene si estende su di un tratto di 876 nucleotidi con un'omologia di circa il 52% con il cDNA della forma I. Analogamente alla sequenza del gene *CSNIS2 A* nella specie umana, il gene *CSNIS2 II* di asina si caratterizza per la presenza di 16 esoni con grandezze che variano da 24 bp (esoni 7, 9 e 11) a 257 bp (esone 16). Comparata alla forma I, tale gene mostra l'assenza di sequenze corrispondenti agli esoni 6, 7, 8, 10, 11, 12, l'inserzione a monte e a valle del 13° esone (8° per la forma II) di due sequenze di 24 bp, la seconda delle quali sembrerebbe essere una duplicazione del 4° esone, e, infine, un esone addizionale (esone 15) che si caratterizza per una sequenza micro satellite GA. Lo stop codon si localizza tra i nt 10 e 12 del 14° esone (Figura 8). La dedotta sequenza aminoacidica codificata dal gene *CSNIS2 II* dovrebbe corrispondere ad un peptide di 168 aminoacidi (α_{s2} -II) con un predetto peso molecolare di 18356.46 kDa ed una omologia di circa il 43% con la forma α_{s2} -I.

La presenza di geni duplicati non è un evento eccezionale. Sebbene nei ruminanti sia stata identificata una sola forma del gene *CSNIS2*, in topo, ratto coniglio ed uomo, analisi comparative ne hanno messo in evidenza due forme denominate A e B. Inoltre, copie non espresse (pseudogene) del gene codificante per la β -lattoglobulina sono state caratterizzate nel bovino, capra e pecora, mentre in cavallo ed asino tali geni duplicati sono normal-

mente tradotti. Uno pseudogene non codificante è stato anche caratterizzato al *locus* della α -lattoalbumina bovina.

Tra i diversi geni codificanti le proteine del latte, quello che codifica per la caseina α_{s1} (*CSN1S1*) è sicuramente il più investigato nelle specie animali di interesse zootecnico. Tale *locus* rappresenta, infatti, da anni un modello eccellente per dimostrare come gran parte della variabilità osservata nel contenuto di caseina α_{s1} nel latte sia dovuta alla presenza di alleli “quantitativi” ad un singolo *locus* strutturale. Anche nell’asino sembra siano presenti alleli quantitativi. Recentemente, infatti, analogamente a quanto osservato per la specie caprina, anche per l’asina sono stati evidenziati pattern elettroforetici delle proteine del latte caratterizzati dall’apparente assenza di α_{s1} -caseina. La struttura completa del gene della caseina α_{s1} (*CSN1S1*) è stata determinata per la prima volta nella specie bovina nel 1991 ed in seguito è stato caratterizzato anche per altre specie.

La sequenza del gene *CSN1S1* di asina (17053 nucleotidi) ha messo in evidenza che anche in questa specie il gene è suddiviso in almeno 20 esoni la cui grandezza varia dai 15 nucleotidi dell’esone 6 ai 392 nucleotidi dell’esone 20. L’esone 2 codifica per 17 amminoacidi di cui 15 costituiscono il peptide leader. Le sequenze amminoacidiche del peptide leader della caseina α_{s1} di asino, cavallo, bovino e capra sono identiche e differiscono da quella dell’uomo soltanto per il secondo amminoacido (Lys vs Arg). Lo splicing alternativo dell’esone 6 determina la sintesi delle due componenti principali della caseina α_{s1} matura, una lunga 202 e l’altra 197 amminoacidi. La tripletta che codifica per lo stop codon è costituita dagli ultimi due nucleotidi dell’esone 18 e dal primo nucleotide dell’esone 19.

Risultati preliminari di analisi di popolazione hanno messo in evidenza due polimorfismi nella regione codificante del gene: una transizione C→T al 61° nucleotide del secondo esone, responsabile della sostituzione amminoacidica Pro → Ser e una transizione silente A → G al 18° nucleotide del 5° esone. La mutazione al secondo esone è risultata associata, non causativa, all’apparente assenza di caseina α_{s1} nel latte di asina.

La caseina β , insieme alla caseina α_{s1} è la componente proteica proporzionalmente più abbondante nel latte. Il gene *CSN2* è stato completamente sequenziato e caratterizzato nella specie bovina, bufalina, ovina, caprina. La sequenza del gene *CSN2* di asina (9378 nucleotidi) ha messo in evidenza una struttura molto simile a quella osservata negli animali poligastrici (Figura 9). Infatti, il gene è organizzato in 9 esoni e l’esone 7 è responsabile della sintesi della maggior parte della proteina matura (176 su 226 amminoacidi). In base a risultati preliminari, anche a tale *locus* è stato evidenziato un polimorfismo nella sequenza codificante: T→G al 35° nucleotide del 2° esone responsabile della sostituzione amminoacidica Leu→Arg al nono amminoacido del peptide leader. Questa mutazione, non sembra avere alcun effetto sulla struttura primaria della proteina matura e non sembra essere associato a differenze di tipo quantitativo.

Analogamente è stato sequenziato il gene della β -lattoglobulina di tipo II. Nell’asino, come nel cavallo, il gene è costituito da 6 esoni di lunghezza compresa tra i 17 e 140 nt (546 nucleotidi complessivamente). Gli introni hanno una lunghezza che varia dai 256 nt del 5° ai 1526 nt del 3°. Inoltre è stata sequenziata una regione di 226 nt a monte del primo esone. Nell’asina la sequenza presenta in complesso 9 sostituzioni amminoacidiche rispetto alla proteina di cavallo. L’esone I è risultato monomorfo e identico a quello del cavallo, mentre 10 transizioni sono state osservate nelle restanti regioni esoniche. Tuttavia, a tutt’oggi, non sono state identificate le mutazioni responsabili del fenotipo “difettivo” nel latte, né alcuna forma di associazione tra polimorfismo genetico e l’osservata apparente assenza di tale frazione proteica nel latte di asina.

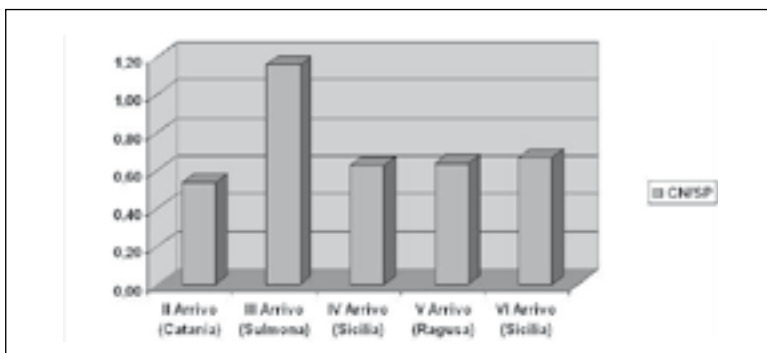


Fig. 1. Determinazione del rapporto CN/SP mediante analisi densitometrica dei profili PAGE-SDS di campioni di latte di asina

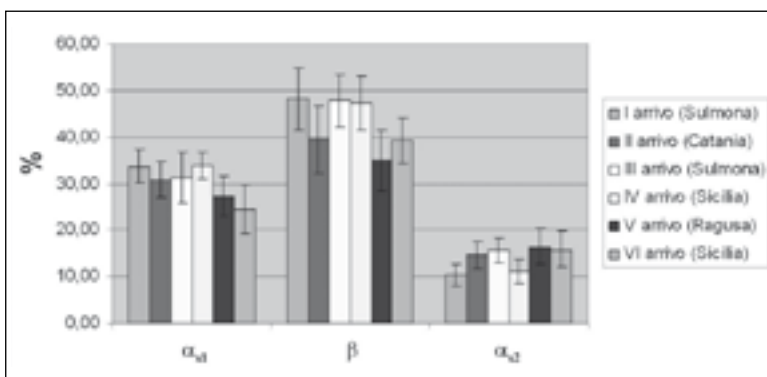


Fig. 2. Percentuale relativa media di α_{s1} , β ed α_{s2} -CN mediante analisi densitometrica di profili PAGE.

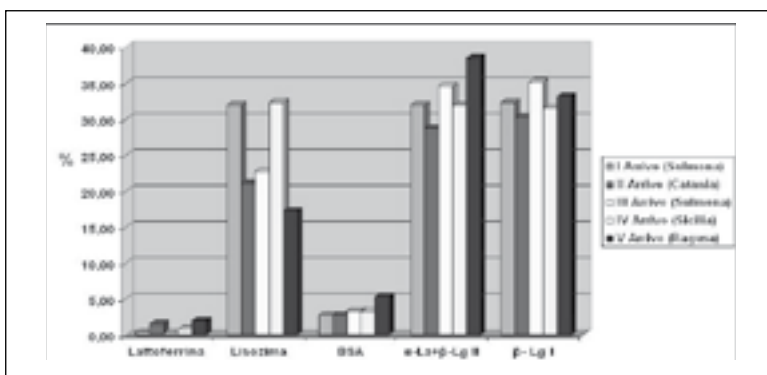


Fig. 3. Percentuale relativa delle sieroproteine asinine determinata mediante analisi RP-HPLC

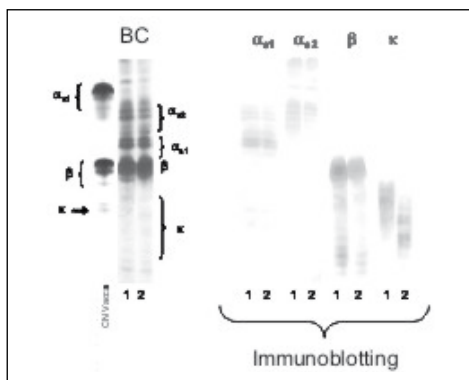


Fig. 4. Analisi PAGE pH 8,6 di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche α_1 , β , α_2 e κ -CN.

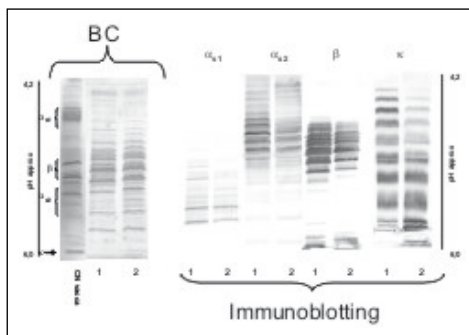


Fig. 5. Analisi UPLIEF di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche α_1 , β , α_2 e κ -CN.

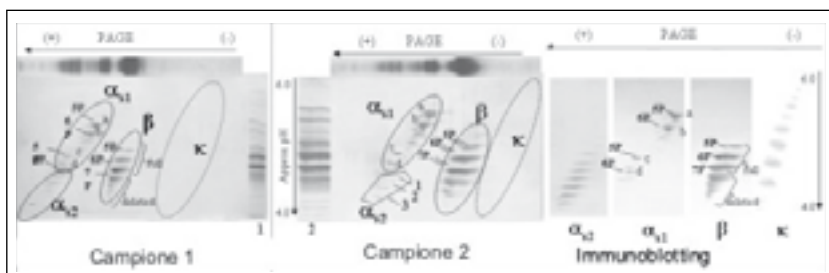


Fig. 6. Analisi 2D di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche α_1 , β , α_2 e κ -CN.

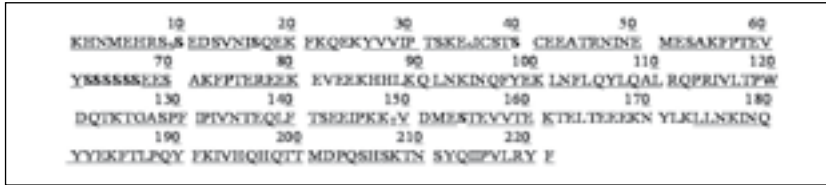


Fig. 7. Struttura primaria dell' α_2 -CN di asina.



Fig. 8. Allineamento delle sequenze delle sequenze cDNA relative a geni CSN1S2 I e I di asina. Il peptide leader e lo stop codon sono sottolineati, mentre in grassetto si evidenziano i possibili siti di giunzione esone-esone. I nucleotidi conservati sono evidenziati.

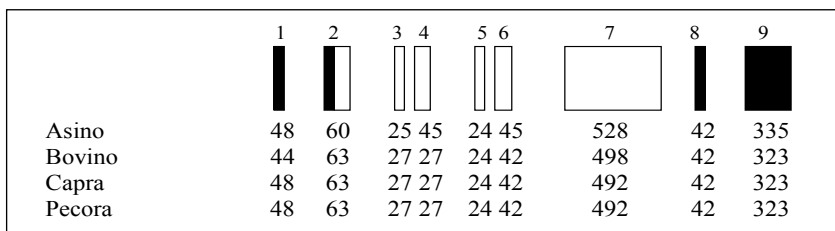


Fig. 9. Confronto tra gli esoni del gene CSN2 di varie specie. I rettangoli pieni indicano il 5'UT e il 3'UT, i rettangoli vuoti indicano il CDS. Sopra i rettangoli è riportata la numerazione progressiva degli esoni, al di sotto la grandezza degli esoni per specie espressa in nucleotidi

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Businco L., Giampietro P.G., Lucenti P., Lucaroni F., Pini C., Di Felice G., Lacovacci P., Curadi C., Orlandi M. (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 105, 1031-1034.
- 2) Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, D'Amico D, Alabrese L, Iacono G. (2000). Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical and Experimental Allergy.* 30(11), 1597-1603
- 3) Chianese L., Calabrese M.G., Ferranti P., Mauriello R., Garro G., De Simone C., Quarto M., Addeo F., Cosenza G., Ramunno L. (2010). Proteomic characterization of donkey milk "caseome" *Journal of Chromatography A.* 1217, 4834-4840
- 4) Cosenza G., Pauciullo A., Annunziata A.L., Rando A., Chianese L., Marletta D., Iannolino G., Nicodemo D., Di Berardino D., Ramunno L. (2010). Identification and characterization of the donkey CSN1S2 I and II cDNAs and polymorphisms detection. *Italian Journal of Animal Science* 9 (e40), 206-211
- 5) Criscione A., Cunsolo V., Bordonaro S., Guastella A. M., Saletti R., Zuccaro A., D'Urso G., Marletta D. (2009) Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *International Dairy Journal* 19, 190-197
- 6) Cunsolo V., Saletti R., Muccilli V., Foti S. (2007). Characterization of the protein profile of donkey's milk whey fraction. *J Mass Spectrom* 42, 1162-1174.
- 7) Di Gregorio P., Rando A., Zuccaro A., Marletta D., Cosenza G., Chianese L., Ramunno L. (2010). DNA sequences of milk protein genes in *Equus asinus*. *32nd Conference for the International Society for Animal Genetics.* 26-30 Luglio 2010, Edinburgh, Scotland.
- 8) Giufrida M.G., Cantisani A., Napolitano L., Conti A., Godovac-Zimmermann J. (1992). The amino-acid sequence of two isoforms of alpha-lactalbumin from donkey (*Equus asinus*) milk is identical. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 373, 931-935.
- 9) Godovac-Zimmermann J., Conti A., Liberatori J., Braunitzer G. (1985). The amino acid sequence of beta-lactoglobulin II from horse colostrum (*Equus caballus*, Perissodactyla). Structural basis for binding the retinol. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 366, 601-608.
- 10) Godovac-Zimmermann J., Conti A., Napolitano L., (1988a). The primary structure of donkey (*Equus asinus*) lysozyme contains the Ca(II) binding site of alpha-lactalbumin. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369, 1109-1115.
- 11) Godovac-Zimmermann J., Conti A., James L., Napolitano L., (1988b). Microanalysis of the amino-acid sequence of monomeric beta-lactoglobulin I from donkey (*Equus*

- asinus*) milk. The primary structure and its homology with a superfamily of hydrophobic molecule transporters. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369, 171-179.
- 12) Godovac-Zimmermann J., Conti A., Sheil M., Napolitano L. (1990). Covalent structure of the minor monomeric beta-lactoglobulin II component from donkey milk. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371, 871-879.
 - 13) Herrouin M., Mollé D., Fauquant J., Ballestra F., Maubois J.L., Léonil J. (2000). New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *J. Prot. Chem.* 19, 105-115.
 - 14) Mauriello R., Calabrese M. G., Ferranti P., Garro G., Quarto M., Ramunno L., Cosenza G., Chianese L. (2009). Caratterizzazione molecolare della caseina di asina. Nota 1 *Congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli Alimenti, 9° CISETA, Milano 11-12 giugno 2009.*
 - 15) Mercier J. C., Vilotte J. L. (1993). Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098.
 - 16) Rijnkels M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene *loci* and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia* 7, 327-345.
 - 17) Threadgill D.W., Womack J.E. (1990). Genomic analysis of the major bovine milk proteins genes. *Nucleic Acids Res.* 18, 6935-6942.
 - 18) Vincenzetti S., Polidori P., Mariani P., Cammertoni N., Fantuz F., Vita A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chem.* 106, 640-649.