

실크 피브로인과 젤란검 하이드로젤에서 연골 재생 효과에 대한 연구

박종호 · 전하얀 · 전유신 · 박 현 · 김초민 · 송정은 · 강길선[†]

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
(2017년 9월 4일 접수, 2017년 9월 29일 수정, 2017년 10월 23일 채택)

Effect of Cartilage Regeneration on Gellan Gum and Silk Fibroin

Jong Ho Park, Ha Yan Jeon, Yoo Shin Jeon, Hyun Park, Cho Min Kim, Jeong Eun Song, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Convergence Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea

(Received September 4, 2017; Revised September 29, 2017; Accepted October 23, 2017)

초록: 최근 조직 공학에서 새로운 생체 재료로 관심을 받고 있는 젤란검은 포도당, 글루콘산, 람노스로 구성된 다당류로서 연골 조직 재생의 대체재로 각광받고 있다. 실크 피브로인은 생체적합성과 생분해성이 뛰어나며 우수한 기계적 특성을 갖고 있다. 본 실험은 실크 피브로인이 연골 재생에 미치는 영향을 확인하기 위해 2 wt% 젤란검 수용액에 2 wt% 실크 피브로인 수용액을 100/0, 70/50, 50/50 비율로 첨가하여 하이드로젤 지지체를 제조하였으며, 실크 피브로인 수용액이 다양한 함량으로 제작된 젤란검 하이드로젤 지지체의 물리적 특성을 알아보기 위하여 압축강도, 다공도, FTIR 등을 실시하였고 연골 세포의 증식과 유전자 발현을 평가하기 위해 MTT, bio-SEM, RT-PCR을 실시한 결과 50/50 비율의 젤란검/실크 피브로인(GG/SF) 하이드로젤 지지체에서 높은 세포 증식률과 우수한 연골재생 효과를 확인하였다. 결과적으로 50/50 비율의 젤란검/실크 피브로인 하이드로젤 지지체가 연골 조직 재생에 긍정적으로 작용함을 확인하였다.

Abstract: Recently, in tissue engineering gellan gum as a polysaccharide composed of glucose, glutaric acid, and rhamnose is proposed as a substitute for cartilage regeneration applications. Silk fibroin has biocompatibility, biodegradability and excellent mechanical properties. In this work, to confirm the effect of silk fibroin on cartilage regeneration, hydrogel scaffolds were prepared by using 2 wt% silk fibroin (SF)/2 wt% gellan gum (GG) at weight ratio of 100/0, 70/30, and 50/50. The characterizations of scaffolds were implemented by FTIR, compressive strength, porosity, and SEM. Cell proliferation and gene expression were evaluated by MTT, bio-SEM, RT-PCR. As a result, SF50/GG50 scaffold was confirmed as an excellent scaffold for cartilage tissue regeneration.

Keywords: gellan gum, silk fibroin, cartilage regeneration, hydrogel scaffold.

서 론

연골은 단백질, 다당류 및 연골 세포로 구성된 조직으로 뼈와 뼈 사이에 완충작용을 하고, 관절에 유연성을 갖게 한다. 이러한 연골의 특징은 연골 세포와 조직적 기능을 활성화시키고, 기계적 하중으로부터 조직의 물리적 변형을 막는다. 연골에는 약 80%의 물과 기질로 구성되며 세포외 기질은 연골 세포에 의해 유지된다. 연골 세포는 제 2형 콜라겐과 어그리칸을 생성하고, 관절 연골의 인장 및 압축 저항을 조절한다.¹ 연골은 다른 결합 조직과는 달리 한번 손상되거나 퇴화되면

재생이 어려운 조직이다. 현재 다양한 치료법들이 도입되고 있으나, 대부분 관절경술, 변연절제술, 미세골절술과 같은 기계적 기술을 이용한 방식을 활용하고 있어 조직 자체를 회복시키기 위한 방법이 필요하다.^{2,4} 이러한 대안으로 연골 조직 공학에서 천연 및 합성 생체 재료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 대표적인 생체재료로는 히알루론산, 젤라틴, 키토산, 피브린, 콜라겐, 폴리 에틸렌 옥사이드 등이 있다.⁵⁻⁸

식품 산업 및 약물 전달을 위한 생물 의학 분야에서 광범위하게 사용되고 있는 젤란검(gellan gum, GG)은 포도당, 글루콘산, 람노스의 반복 단위로 구성된 선형 음이온 다당류로서 최근 조직 공학 분야에서 연골 재생을 위한 새로운 천연 생체 재료로 관심을 받고 있다.⁹

젤란검은 내열성, 내산성, 내효소성으로 우수한 특성뿐만 아니라, 리간드(reagent)를 이용하지 않고, 상온에서 젤화

[†]To whom correspondence should be addressed.
gskhang@jbnu.ac.kr, ORCID[®] 0000-0002-6452-5653
©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

(gelation) 시킬 수 있어, 신체에 주입 시 면역 거부반응이 없고, 생분해가 가능하여 생체 조직 공학에서의 활용이 용이하다.¹⁰

젤란검 하이드로겔 지지체에 첨가된 실크 피브로인(silk fibroin, SF)은 누에로부터 얻어지는 천연 단백질로서, 생체적 합성 및 생분해성이 뛰어나고 염증반응이 낮으며 단백질 분해효소인 프로테아제(protase)에 민감하지 않아 기계적 강도를 유지하는 특징을 갖고 있다. 또한 세포 부착 및 성장을 촉진하는 역할을 하며 다양한 아미노산이 결합되어 있어 연골 세포 성장에 영향을 준다고 알려져 있다.¹¹⁻¹⁶ 최근 연골 조직 공학 분야에서 실크 피브로인을 활용한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 실크 피브로인의 낮은 생분해성으로 다른 생체 재료와 혼합하여 적절한 지지체 제조가 가능하다.¹⁷⁻¹⁹

이에 본 연구에서는 젤란검에 함량별 실크 피브로인을 첨가한 젤란검/실크 피브로인(GG/SF) 하이드로겔 지지체를 제작하여 함량 별로 연골 재생 효과를 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 젤란검은 Gelzan™CM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 평균 분자량 1000000 g/mol, G1910), 누에고치는 계봉농장(Kyebong Farm, Korea)에서 구입하였으며, 모든 화학 약품 및 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

지지체 제조. 90 °C에서 중탕시킨 3차 증류수에 젤란검 분말을 넣고, 교반한 후 가교제인 0.03% 염화칼슘(CaCl₂)을 첨가하여 2 wt% 젤란검 수용액을 제조하였다.

실크 수용액은 Bombyx mori 누에고치를 잘게 잘라 0.02 M의 탄산나트륨(Na₂CO₃)을 포함한 3차 증류수에 넣고, 30분 동안 가열하여 세리신을 제거한 후 증류수에 헹구고 상온에서 건조하였다. 건조된 실크는 9.3 M의 브롬화리튬(LiBr) 용액에 60 °C에서 용해시켰다. 실크 수용액에 있는 LiBr을 제거하기 위해 투석막(SnakeSkin® Dialysis Tubing, 3.5 K MWCO, Thermo Science, USA)을 사용하여 48시간 동안 증류수에서 투석시켜 7 wt% 실크 피브로인 수용액을 제조한 후 회석하여, 2 wt% 실크 피브로인 수용액으로 제조하였다. 2 wt% 젤란검 수용액에 2 wt% 실크 피브로인 수용액을 100/0, 70/30, 50/50 비율로 첨가하여 패트리디쉬에 분주한 뒤 30분 동안 굳히고, 바이옵시 펀치(Biopsy punch)를 사용하여, 직경 8 mm, 높이 4 mm 크기의 GG/SF 하이드로겔 지지체를 제조하였다(Figure 1).

연골 세포의 분리 및 배양. 연골 세포는 생후 3주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(Hannil laboratory animal center, Wanju, Korea)에서 추출하였다. 토끼 무릎에서 연골 부위를 분리하여 PBS(pH 7.4 Gibco NY, USA)로 3번 세척한 후 연골 부위를 끊어내어 코니컬에 담은 뒤 1500 rpm, 4 °C에서 3분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리를 한 연골세포는 DMEM

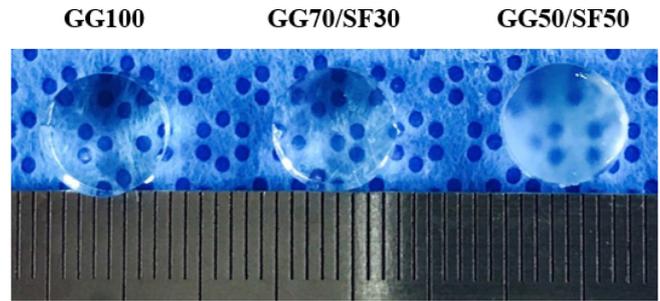


Figure 1. Gross images of GG/SF scaffolds.

고농도 글루코오스(Dulbecco's modified eagle medium)와 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)을 혼합한 배양액을 0.2 wt% 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA) 200 µL를 첨가하여 36 °C, 5% CO₂ 조건으로 인큐베이터 안에 12시간 동안 연골조직을 분해하였다. 그 후에 1500 rpm, 4 °C에서 3분 동안 원심분리 후 배양액과 함께 세포배양 디쉬에 분주하였고 36 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양액은 2~3일에 한 번씩 교체해주었다.

FTIR 분석. GG/SF의 구조적 분석을 위해 적외선 분광 광도계(FTIR, GX, Perkin Elmer, Connecticut, USA)를 이용하여 4000~650 cm⁻¹ 파장에서 분석하였다.

SEM 관찰. GG/SF의 표면에 있는 다공을 확인하고, 연골 세포 증식률을 관찰하기 위해 SEM 측정을 실시하였다. 세포를 고정하기 위해 각 7, 14 및 21일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 뒤 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 24시간 동안 고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 그 다음 GG/SF는 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백금 코팅하였고, 이를 주사전자 현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 표면 변화를 관찰하였다.

MTT 분석. 세포 증식률을 확인하기 위해 각 하이드로겔 지지체에 1×10⁵(cell/scaffold)의 연골 세포를 파종한 후 1, 4, 7, 14 및 21일째 MTT[디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드] 분석을 실시하였다. MTT 용액(Sigma, 50 mg/mL)을 100 µL를 넣어준 후 4시간 동안 36 °C, 5% CO₂ 조건 하에 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)를 1 mL 첨가하여 샘플을 각 100 µL씩을 채취(E-max, Molecular Device, USA)하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

mRNA 발현도 확인. 연골세포를 배양한 GG/SF 하이드로겔 지지체에서 특정 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 7일, 14일 및 21일째 회수된 GG/SF를 PBS로 세척한 후 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies

Co., Groningen, Netherlands)을 첨가한 다음 피펫팅하여 1.5 mL의 EP 튜브에 용액을 넣고, 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가한 후 4 °C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™), 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), Rnase inhibitor (Invitrogen™), Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타아제(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, 제 1형 콜라겐(type I collagen, Col I), 제 2형 콜라겐(type II collagen, Col II) 및 SOX9 PCR을 수행하였다. PCR후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔을 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, UK)에 의해 시각화하였으며, 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 GAPDH, type I collagen, type II collagen 및 SOX9 mRNA 밴드의 발현 정도를 확인하였다.

통계학적 분석. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

결과 및 토론

FTIR 분석. Figure 2는 적외선 분광기 분석을 통해서 GG/SF의 화학적 성분을 분석하기 위해 실시하였다. 분석 결과 젤란검에서는 O-H(3301 cm⁻¹)와 에스테르기(1602 cm⁻¹), C-O(1024 cm⁻¹)가 나타났음을 확인하였고 실크 피브로인에서는 amide I(1643 cm⁻¹), amide II(1515 cm⁻¹), amide III(1234 cm⁻¹)의 피크를 확인하였다.²⁰⁻²⁴ Figure 2를 확인해 보면 앞서 말한 SF와 GG의 특징적인 피크들이 혼합물인 GG50/SF50과 GG70/SF30에서 확인되는 것으로 보아 각각의 재료에서 나타나는 화학적 특성들이 변하지 않고 주요 피크들이 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

SEM 관찰. Figure 3은 각 군의 GG100, GG70/SF30, GG50/SF50 및 SF를 동결건조시킨 후 그것의 단면을 관찰한

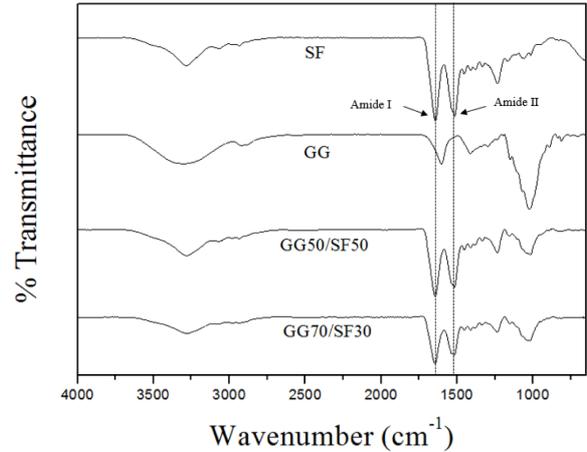


Figure 2. FTIR results of GG/SF scaffolds.

결과로 모든 군의 지지체에서 타원형 모양의 일정한 다공을 확인할 수 있었고 군마다 매끄러운 표면을 확인할 수 있었다. 특히 지지체에 실크 피브로인의 함유량이 증가할수록 실크 피브로인의 다공 모습과 유사한 형태를 갖으며, 다공이 조밀해지고 다공수가 증가하는 모습을 확인할 수 있었다. 이러한 다공 구조는 대부분 열린 구조를 하고 있고 다공과 다공 사이에서 연결이 양호하여 세포 부착에 영향을 줄거라 사료된다.

Figure 4에서는 각각의 GG/SF에 세포를 파종한 후 7, 14 및 21일 동안 세포의 부착 및 형상을 확인하기 위해 SEM으로 촬영한 결과로 전반적으로 모든 군에서 부착된 세포를 발견할 수 있었다. 7일째에는 다른 군에 비해 GG50/SF50에서 연골 세포의 부착이 더 활발하게 이루어지고 있는 것을 확인할 수 있었고, 시간이 지날수록 실크 피브로인의 함유량이 많은 군인 GG50/SF50에서 세포의 기질(extracellular matrix)이 활발하게 응집되고 뻗어가는 것을 관찰할 수 있었다.

MTT 분석. GG/SF에서의 연골 세포 증식률을 분석하기 위해 MTT 분석을 시행하였고, 이를 Figure 5에 나타내었다. 분석결과 시간이 지날수록 다른 군에 비해 GG50/SF50에서 세포의 높은 증식률을 나타냈다. 이는 앞서 언급한 바와 같이, 천연재료인 실크 피브로인이 다양한 아미노산과 단백질로 이루어져 있기 때문에 연골세포의 세포부착 및 성장을 촉진시

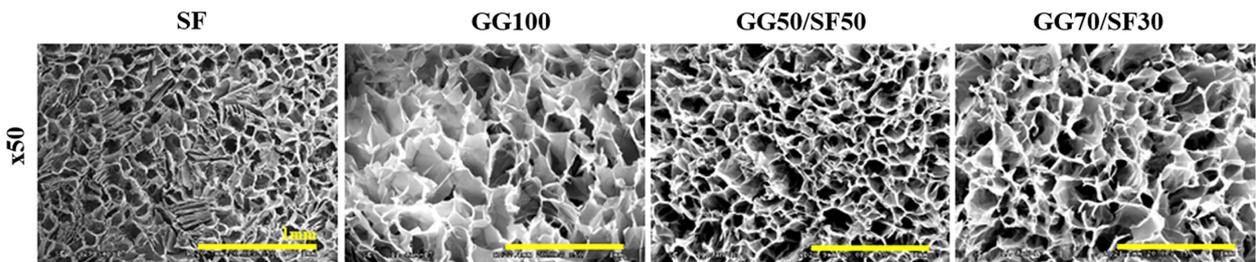


Figure 3. SEM images of GG/SF scaffolds.

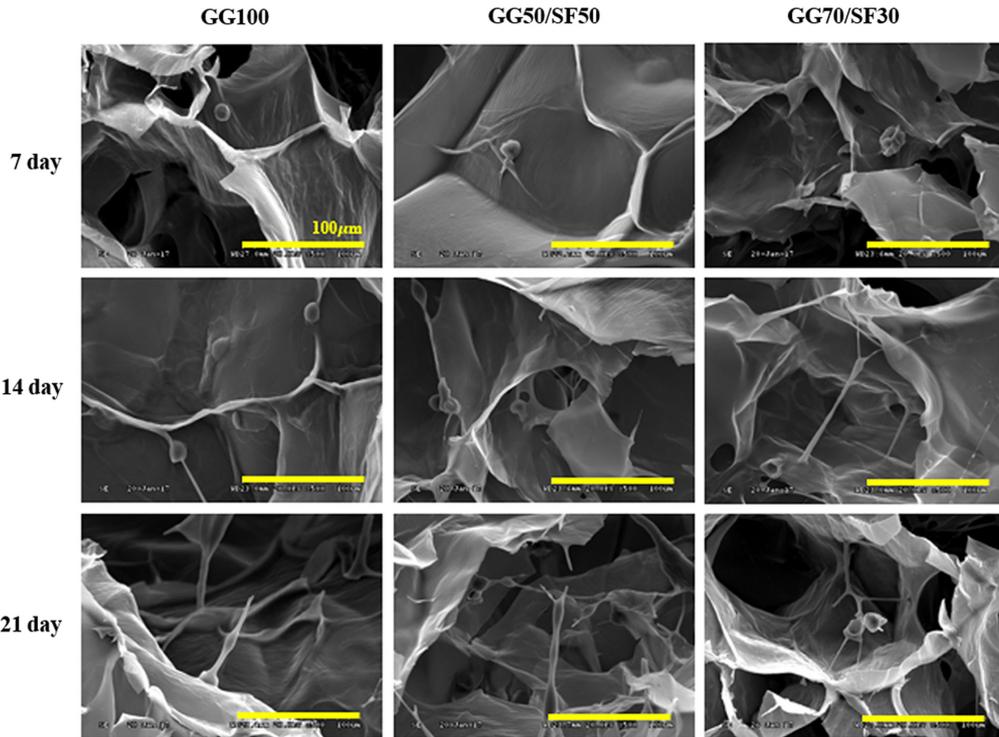


Figure 4. *In vitro* chondrocyte behavioral study. SEM images of chondrocyte on GG/SF scaffolds during 7, 14 and 21 days of culturing showing the cell attachment and migration.

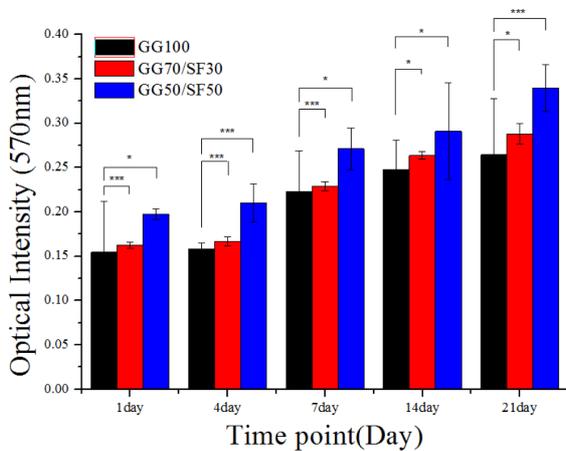


Figure 5. Proliferation of chondrocyte on GG/SF scaffolds after 1, 7, 14 and 21 days studied by MTT assay (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

켜, 연골세포 증식에 영향을 준 것으로 판단된다. 따라서 GG, GG70/SF30, GG50/SF50 지지체 중에서, 실크 피브로인의 함량이 가장 높은 GG50/SF50에서 높은 증식률이 보였다고 사료된다.^{25,26}

mRNA 발현도 확인. *In vitro* 환경에서 GG/SF 하이드로겔 지지체 내에 파종된 연골세포를 28일 동안 배양한 후 특정 유전자 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 모든

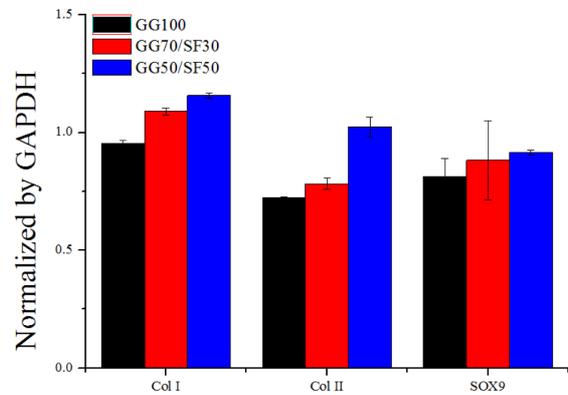


Figure 6. mRNA expression of chondrocyte. RT-PCR analysis of the chondrocyte on GG/SF scaffolds after 21 days. RT-PCR results for GAPDH, Col I, Col II, and SOX9 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

실험 군에서 발현된 house keeping gene인 GAPDH를 기준으로 Col II, Col I, SOX9의 발현도를 표준화시켜 나타내었다. Col II는 연골 단백질의 50%를 차지하며 sGAG를 합성한다고 알려져 있으며, Col I은 연골 퇴화에서 발현된다. 그리고 SOX9는 연골 세포가 분화될 때, 발현이 시작되며 연골 세포의 조절 인자 역할과 Col I 및 Col II의 세포 특이적 서열과 결합 작용을 하면서 연골 형성 및 발달에 핵심적인 역할을 하므로 이들 유전자 발현을 확인하는 것은 중요하다.

Figure 6에서 제 1형 콜라겐, 제 2형 콜라겐 및 SOX9의 발현 결과, GG50/SF50에서 다른 군들보다 높은 발현도를 나타낸 것으로 보아 연골 세포가 안정적으로 건강하게 배양되고 있다는 것을 확인하였다. 이것은 앞서 확인한 MTT 결과와 비슷하게 실크 피브로인의 특정 함량이 충족되었을 때, 연골 세포 증식에 영향을 주어 최적 환경을 제공하는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 천연 고분자인 젤란검과 실크 피브로인을 100/0, 70/30, 50/50으로 혼합하여, GG/SF 하이드로젤 지지체를 제조하였고, 이에 연골 세포를 파종하여 연골 조직 공학에 적용 가능성을 확인하기 위해, *in vitro* 환경에서 실험을 실시하였다. FTIR을 통하여, 제작된 GG/SF 하이드로젤 지지체는 젤란검과 실크 피브로인의 물리적 특성을 잘 유지되고 있는 것을 확인하였고, MTT 분석을 통해 각 GG/SF 하이드로젤 지지체에서의 연골 세포 증식률을 확인하였다. 또한 SEM 분석을 하여 지지체의 표면에 있는 다공 모양과 크기를 확인하였고, 각 군에서 연골 세포의 부착 모습과 세포외기질의 형상을 관찰할 수 있었으며, RT-PCR을 통해 연골에 발현하는 특이 유전자의 발현도를 확인하였다. 그 결과, GG100과 GG70/SF30 하이드로젤 지지체보다 GG50/SF50 하이드로젤 지지체가 연골 세포의 증식을 높이고, 제 2형 콜라겐, SOX9 발현이 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 따라서 GG50/SF50 하이드로젤 지지체는 연골 조직공학 지지체로 적용될 가능성이 있다고 판단된다.

감사의 글: 이 논문은 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원(HI15C2996)을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. J. T. Oliveira, T. C. Santos, L. Martins, M. A. Silva, A. P. Marques, A. G. Castro, N. M. Neves, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **7**, 493 (2009).
2. S. A. Hunt, L. M. Jazrawi, and Sherman, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, **10**, 356 (2002).
3. A. I. Caplan, M. Elyaderani, Y. Mochizuki, S. Wakitani, and V. M. Goldberg, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **342**, 254 (1997).
4. R. Cancedda, B. Dozin, P. Giannoni, and R. Quarto, *Matrix. Biol.*, **22**, 81 (2003).
5. M. V. Risbud and M. Sittinger, *Trends Biotechnol.*, **20**, 351 (2002).
6. K. Tuzlakoglu, C. M. Alves, J. F. Mano, and R. L. Reis, *Macromol. Biosci.*, **4**, 811 (2004).
7. C. R. Lee, H. A. Breinan, S. Nehrer, and M. Spector, *Tissue Eng.*, **6**, 555 (2000).
8. D. W. Huttmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
9. J. T. Oliveira, L. Martins, R. Picciochi, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, N. M. Neves, J. F. Mano, and R. L. Reis, *J. R. Soc. Interface*, **93**, 852 (2010).
10. A. M. Smith, R. M. Shelton, Y. Perrie, and J. J. Harris, *J. Biomater.*, **22**, 241 (2007).
11. H. Mori and M. Tsukada, *Mol. Biotechnol.*, **74**, 95 (2000).
12. R. L. Horan, K. Antle, A. L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. E. Moreau, V. Volloch, D. L. Kaplan, and G. H. Altman, *Biomaterials*, **26**, 3385 (2005).
13. L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, L. Meinel, C. Kirker-Head, J. Mc-Cool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 147 (2005).
14. H. W. Ju, O. J. Lee, J. M. Lee, B. M. Moon, Y. R. Park, M. C. Lee, S. H. Kim, J. R. Chao, C. S. Ki, and C. H. Park, *Int. J. Biol. Macromol.*, **85**, 29 (2016).
15. J. R. Maunney, T. Nguyen, K. Gillen, C. Kirker-Head, J. M. Gimble, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **28**, 5280 (2007).
16. E. Y. Kim, C. J. Lee, S. Y. Kim, N. K. Jang, J. E. Song, C. K. Joo, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regener.*, **5**, 69 (2014).
17. N. Bhardwaj, Q. T. Nguyen, A. C. Chen, D. L. Kaplan, R. L. Sah, and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **32**, 5773 (2011).
18. Y. Wang, U. J. Kim, D. J. Blasioli, H. J. Kim, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 7082 (2005).
19. Y. Wang, D. J. Blasioli, H. J. Kim, H. K. Kim, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **27**, 4434 (2006).
20. J. Karvinen, J. T. Koivisto, I. Jönkkäri, and M. Kellomäki, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **71**, 383 (2017).
21. S. R. Sudhamani, M. S. Prasad, and K. U. Sankar, *Food Hydrocolloids*, **17**, 245 (2003).
22. D. F. Coutinho, S. V. Sant, H. Shin, J. T. Oliveira, M. E. Gomes, N. M. Neves, A. Khademhosseini, and R. L. Reis, *Biomaterials*, **31**, 7494 (2010).
23. D. K. Kim, J. I. Kim, B. R. Sim, and G. Khang, *Mater. Sci. Eng. C*, **78**, 571 (2017).
24. D. H. Lee, N. Tripathy, J. H. Shin, J. E. Song, J. G. Cha, K. D. Min, C. H. Park, and G. Khang, *Int. J. Biol. Macromol.*, **94**, 14 (2017).
25. L. P. Yan, J. M. Oliveira, A. L. Oliveira, S. G. Caridade, J. F. Mano, and R. L. Reis, *Acta Biomater.*, **8**, 289 (2012).
26. N. Kasoju and U. Bora, *Adv. Healthc. Mater.*, **1**, 393 (2012).