

**DNA-Polymerase****Verbesserte Selektivität der Fehlpaarungsverlängerung von DNA-Polymerasen durch gerichtetes kombinatorisches Enzymdesign\*\***

*Daniel Summerer, Nicolas Z. Rudinger, Ilka Detmer und Andreas Marx\**

*Professor Bernd Giese zum 65. Geburtstag gewidmet*

Die Genauigkeit von DNA-Polymerasen ist für viele biotechnologische Anwendungen von zentraler Bedeutung.<sup>[1,2]</sup> Die nichtnatürlichen Bedingungen, wie sie z.B. bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) anzuwenden sind, beschränken wegen der resultierenden geringeren Selektivität von DNA-Polymerasen deren Anwendungsspektrum oder erfordern aufwändige Optimierungen. Ein Hauptziel bei der Entwicklung von DNA-Polymerasen mit veränderten Eigenschaften ist daher eine hohe Genauigkeit bei der Bildung der Watson-Crick-Basenpaare während der DNA-Synthese. Fortschritte auf diesem Gebiet führen zu wertvollen Werkzeugen für eine Vielzahl biotechnologischer Verfahren wie PCR, DNA-Sequenzierung, Mutagenesetechniken oder Genotypisierung. Durch DNA- und RNA-Polymerase-Engineering wurden z.B. Enzyme erhalten, die Didesoxynucleosidtriphosphate<sup>[3]</sup> als Substrat verwenden, ein verändertes Substratspektrum und niedrigere Genauigkeit haben, höhere Thermostabilität, verminderte Aktivität bei niedrigen Temperaturen und erhöhte Resistenz gegen Inhibitoren aufweisen.<sup>[4]</sup>

Hier beschreiben wir eine effiziente Methode, mit der Bibliotheken von DNA-Polymerasemutanten automatisiert und parallel in hohem Durchsatz getestet werden können. Die Auswertung basiert ausschließlich auf Enzymaktivität

[\*] Dr. D. Summerer, Dipl.-Biol. N. Z. Rudinger, Dipl.-Chem. I. Detmer, Prof. Dr. A. Marx  
Fachbereich Chemie  
Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, D 72657 Konstanz (Deutschland)  
Fax: (+49) 7531-88-5140  
E-mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[\*\*] Wir danken der Volkswagen-Stiftung für die finanzielle Unterstützung und M. Strerath für die Unterstützung bei der Erstellung des Manuskriptes.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

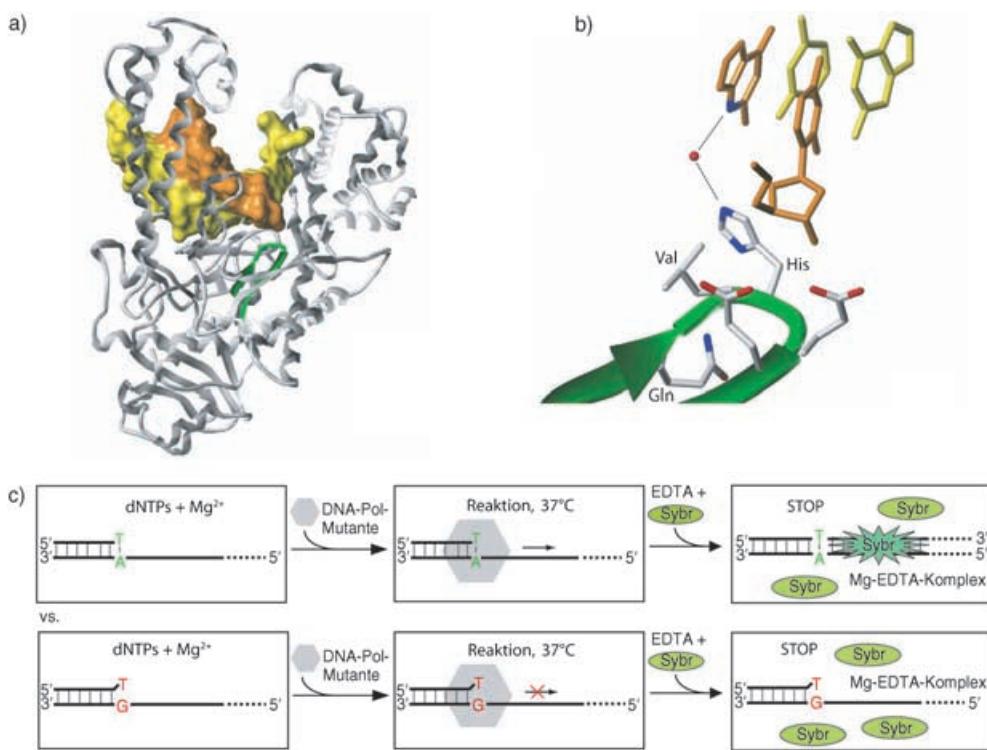
durch Fluoreszenzdetektion des Reaktionsproduktes. Durch Randomisierung einer Genkassette des Klenow-Fragments von *E.coli*-DNA-Polymerase I (3'-5'-Exonuclease-defizient, KF<sup>-</sup>) und anschließende automatisierte und vergleichende Durchmusterung konnten wir mehrere aktive Varianten mit signifikant erhöhter Verlängerungsgenauigkeit im Vergleich zu der des Wildtyps identifizieren. Des Weiteren konnten wir die neuen Eigenschaften einer Variante von KF<sup>-</sup> auf die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* übertragen. Damit stellen wir ein Werkzeug zur Verfügung, das die Eigenschaften des Wildtyp-Enzyms in einer auf hochgenauer PCR basierenden Genotypisierungsmethode übertrifft.

Unlängst wurde vorgeschlagen, dass das Motiv C an einem für DNA-Polymerasen der Familien A und B gemeinsamen Mechanismus zur Fehlpaarungserkennung von Primer und Templat über eine indirekte, von einer Histidin-Seitenkette vermittelte H-Brücke beteiligt ist (Abbildung 1).<sup>[5]</sup> Dieses β-Strang-Turn-β-Strang-Motiv beherbergt saure Aminosäuren, durch die katalytisch essenzielle Magnesiumionen koordiniert werden. Motiv C ist innerhalb der Familie-A-DNA-Polymerasen wie KF<sup>-</sup> und der DNA-Polymerasefamilien B, RT und X, einiger RNA-Polymerasen sowie der Familie-Y-DNA-Polymerasen, die über DNA-Schäden hinwegsynthetisieren können, hochgradig konserviert.<sup>[6]</sup> Daher erschien Motiv C als vielversprechender Ausgangspunkt für eine gerichtete Modifizierung durch gezielte Randomisierung und nachfolgende Durchmusterung nach Varianten mit modifizierten Eigenschaften.

Zur Modifizierung von Motiv C konstruierten wir eine Bibliothek von 1316 KF<sup>-</sup>-Mutanten, die an der QVH-Konsensussequenz (Q879, V880, H881) randomisiert wurden.<sup>[7]</sup> Diese Konsensussequenz ist dem katalytisch essenziellen Aspartat D882 direkt benachbart. Dort bildet sie den Hauptteil einer Schleife, die zwei β-Stränge von Motiv C verbindet und eng mit der Desoxyriboseeinheit des 3'-terminalen Primernucleotids interagiert (Abbildung 1b).

Die Proteinexpression fand in 96-Loch-Mikrotiterplatten statt. Enzymtests wurden direkt nach Lyse der Zellen und anschließender Verdünnung durchgeführt, ohne dass weitere Reinigungsschritte erforderlich waren. Die Aktivitäten der DNA-Polymerasen wurden durch SYBRgreen-I-vermittelte Quantifizierung von synthetisierter doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach Beendigung der Reaktion ermittelt (Abbildung 1c). Dieser Testaufbau verknüpft die Enzymaktivität mit einem Signal ohne den Zusatz artifizieller Substrate während der Reaktion, die die enzymatische Reaktion beeinflussen könnten. Um festzustellen, ob DNA-bindende oder -modifizierende Reagentien oder bakterielle DNA im Roh-Lysat die Signalqualität beeinflussen, wurden Lysate von *E.coli*-Expressionskulturen verglichen, die entweder den für KF<sup>-</sup>-Wildtyp codierenden Vektor oder den nicht codierenden Leervektor tragen. Fluoreszenzmessungen zeigten eine niedrige Hintergrundaktivität der Negativkontrolle mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von ungefähr 5:1, was die Messung der Enzymaktivität über ein breites und dynamisches Spektrum ermöglicht.

In 384-Loch-Mikrotiterplatten testeten wir Einzelklone in Hinsicht auf ihre unterschiedliche Fähigkeit zur Verlänge-

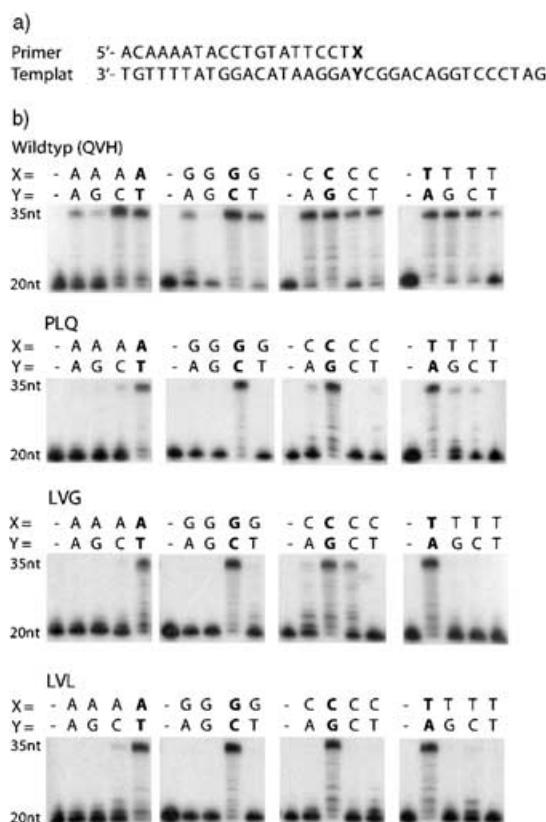


**Abbildung 1.** Struktureller Aufbau von Motiv C und Schema der Durchmusterung von Polymerasen mit verbesserter Selektivität. a) Übersicht der Bst-DNA-Polymerase I (PDB-Eintrag 2BDP), die zu KF- stark homolog ist.<sup>[16]</sup> Die DNA-Polymerase ist in Grau und Motiv C in Grün dargestellt. DNA ist als Connolly-Oberfläche beschrieben, mit dem Primer in Orange und dem Templatstrang in Gelb. b) Detaillierte Ansicht der Schleife von Motiv C und den letzten beiden Nucleotidpaaren am 3'-Terminus des Primers. Zur besseren Übersicht sind die Zuckerphosphatreste nicht von allen Nucleotiden gezeigt. Primernucleotide sind in Orange und Templatnucleotide in Gelb dargestellt. Die indirekte H-Brücke von Histidin mit dem N3-Atom (blau) des vorletzten 3'-Primernucleotids ist durch schwarzgestrichelte Linien gezeigt und wird durch ein Wassermolekül (rote Sphäre) vermittelt. c) Allgemeines Schema der Durchmusterung von Polymerasen mit verbesserten Selektivitäten. Enzymvarianten, die den kanonischen Primer-Templat-Komplex verlängern, nicht aber den fehlgepaarten Komplex, werden durch Hinzufügen des dsDNA-spezifischen Farbstoffs SYBRgreen I („Sybr“) zu beiden Reaktionen und anschließende Fluoreszenzmessung detektiert.

rung von Primer-Templat-Komplexen, die entweder das kanonische  $T_{\text{Primer}}A_{\text{Templat}}$ -Basenpaar oder eine TG-Fehlpaarung am 3'-Primerterminus tragen (Abbildung 1). Ein Pipettierroboter und anschließende Fluoreszenzmessung ermöglichen die Auswertung von 384 Reaktionen in ungefähr 40 Minuten. Als Maß für die Verlängerungsgenauigkeit wurde das Verhältnis der Werte aus den Fluoreszenzmessungen für Verlängerungsreaktionen von kanonischen zu fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen herangezogen. Die hier verwendeten Sequenzen wurden von dem menschlichen Einzelbasenpolymorphismus (SNP) G1691A des Faktor-V-Leiden(FVL)-Gens abgeleitet.<sup>[8]</sup> Die durchgeföhrten Tests zeigten eine beachtliche Mutabilität der QVH-Konsensussequenz. Trotz des hohen Konservierungsgrades dieses Motivs in mehreren DNA- und RNA-Polymerasefamilien<sup>[6]</sup> zeigten 47% der getesteten Mutanten messbare Enzymaktivität.

Für weitere Untersuchungen wählten wir die drei selektivsten Mutanten PLQ, LVG und LVL. Zunächst wurden die gereinigten Mutanten in radiometrischen Primer-Verlängerungsreaktionen getestet (Abbildung 2). Alle möglichen Basenpaarkombinationen am 3'-Primerterminus wurden unter Bedingungen, die eine Fehlpaarungsverlängerung begünstigen, getestet (d.h. Enzymüberschuss im Verhältnis zum Primer-Templat-Komplex und hohe dNTP-Konzentrationen).<sup>[7]</sup> Die Messungen ergaben, dass der KF-Wildtyp in

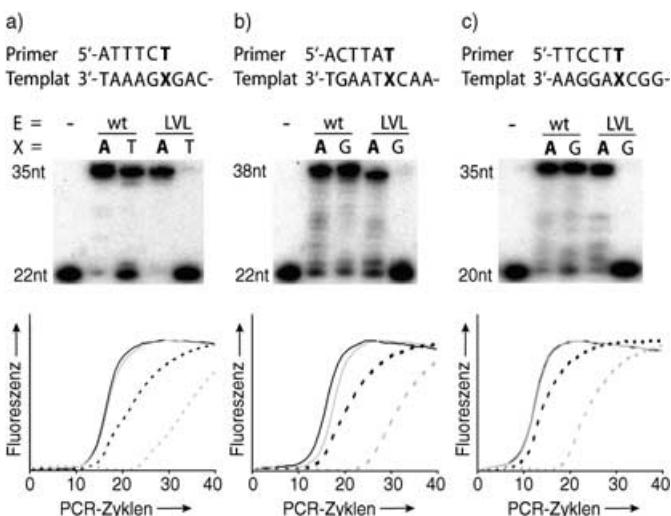
der Lage ist, unter den gewählten Bedingungen alle Fehlpaarungen zu verlängern, wenngleich mit unterschiedlicher Effizienz, was auch schon in anderen Studien gezeigt wurde (Abbildung 2b).<sup>[9]</sup> Dagegen verlängern alle drei gewählten Mutanten Fehlpaarungen wesentlich weniger effizient (Abbildung 2b). Hervorzuheben ist die LVL-Mutante, die in den meisten Fällen fehlgepaarte Primertermini nicht zu Voll-Längenprodukten verlängert (Abbildung 2b). Kinetische Messungen der Einzelbasenverlängerung unter Steady-State-Bedingungen zeigen in allen Fällen, in denen ein kanonisch gepaarter Primer-Templat-Komplex verlängert wurde, dass die Mutanten einen ähnlichen Wert für die  $k_{\text{cat}}$ -Steady-State-Konstante wie der Wildtyp (wt) haben.<sup>[7]</sup> Die  $K_M$ -Werte der Mutanten waren generell höher als die des wt, woraus eine weniger effiziente DNA-Synthese resultiert. Bemerkenswerterweise konnten wir unter Steady-State- und Single-completed-Hit-Bedingungen keine signifikante Elongation fehlgepaarter Primertermini durch die Mutanten feststellen. Für KF-wt sind die Ergebnisse allerdings konsistent mit denen anderer Studien.<sup>[9]</sup> Dies zeigt, dass die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der Mutanten bei allen fehlgepaarten Basenpaarkombinationen wesentlich niedriger als die des wt waren. Mithilfe von Bindungsstudien wurde überprüft, ob verminderte Bindungsaffinitäten die Effekte auf die Fehlpaarungsverlängerungseffizienz verursachen.<sup>[7]</sup> Interessanterweise zeigte aber lediglich die PLQ-



**Abbildung 2.** Verbesserte Primerverlängerungsgenauigkeit der identifizierten KF<sup>-</sup>-Mutanten PLQ, LVL und LVG (Positionen 879–881) im Vergleich zu jener des Wildtypenzym in verschiedenen Sequenzkontexten. Die gewählten Reaktionsbedingungen begünstigen die Fehlpaarungsverlängerung. Alle Reaktionen enthielten gleiche Konzentrationen von Primer-Templat-Komplex, Enzym und dNTPs.<sup>[7]</sup> a) Verwendete DNA-Sequenzen. b) Durch die beschriebenen Enzymvarianten katalysierte Primerverlängerungsreaktionen. Die erste Spur resultiert jeweils aus einer Kontrollreaktion ohne Enzym. Die Sequenzen von Primer und Templat wurden von dem humanen FVL-SNP G1691A abgeleitet.<sup>[7]</sup> Nucleotidsequenzen am 3'-Primerterminus sind über den Aufnahmen gezeigt. Längen (Zahl der Nucleotide, nt) von Primer und Voll-Längenprodukt sind auf der linken Seite der jeweiligen Aufnahme angegeben. X = 3'-terminales Primernucleotid, Y = Templatnucleotid, das mit X einen kanonischen (fettgedruckt) oder fehlgepaarten Primerterminus bildet.<sup>[7]</sup>

Mutante eine signifikant verminderte Bindungsaffinität zum Primer-Templat-Komplex an einem fehlgepaarten Primerterminus. Daraus folgt, dass eine veränderte Bindungsaffinität für die erhöhte Genauigkeit der Fehlpaarungsverlängerung nicht zwingend erforderlich ist.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die hier für die KF<sup>-</sup>-Mutanten gezeigten Effekte auch auf *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-wt) übertragbar sind. Obwohl *Taq*-wt und KF<sup>-</sup> der DNA-Polymerasefamilie A angehören, unterscheiden sie sich in Hinsicht auf Thermostabilität und Selektivität.<sup>[10]</sup> Die QVH-Konsensussequenz in *Taq*-wt wurde zu LVL mutiert und die Verlängerungsgenauigkeit der Mutante untersucht. In diesem Zusammenhang wurden Primer-Verlängerungsreaktionen in drei Sequenzkontexten, die bekannte Einzelbasenpolymorphismen enthalten, durchgeführt.<sup>[11,12]</sup> Dabei zeigten sich für das Wildtypenzym nur schwache Unterschiede zwis-



**Abbildung 3.** Einfluss der LVL-Mutation auf die Genauigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase innerhalb von drei Sequenzkontexten. Oben: Abschnitte der Primer-Templat-Nucleotidsequenzen für Primerverlängerungsreaktionen. Die erste Spur resultiert jeweils aus einer Kontrollreaktion ohne Enzym. Längen (Zahl der nt) von Primer und Voll-Längenprodukt sind auf der linken Seite der jeweiligen Aufnahme angegeben; E = Enzym, X = Templatnucleotid. Unten: Allel-spezifische Echtzeit-PCR-Experimente unter Verwendung von wt- oder LVL-*Taq*-DNA-Polymerase in drei Sequenzkontexten.<sup>[7]</sup> Durchgezogene Linien: wt-*Taq*-DNA-Polymerasen, gestrichelte Linien: LVL-*Taq*-DNA-Polymerase, schwarz: kanonisch gepaarte Primer-Templat-Komplexe, grau: fehlgepaarte Primer-Templat-Komplexe. a)–c) Experimente, die im Sequenzkontext a) des humanen BRAF-somatischen SNPs T1796A, b) des humanen DPYD-SNPs G735A und c) des humanen DPYD-SNPs G735A durchgeführt wurden.<sup>[7]</sup>

schen der Verlängerung von kanonischen und fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen (Abbildung 3).

Die mutierte *Taq*-DNA-Polymerase (Taq-LVL) ist dagegen zur Diskriminierung von Transitions- und Transversions-Einzelbasenpolymorphismen in der Lage (Abbildung 3). *Taq*-LVL könnte das Einsatzspektrum von PCR-basierten Methoden wie der Allel-spezifischen PCR (asPCR) erweitern und zu deren Verbesserung beitragen.<sup>[13]</sup> Um die Anwendbarkeit von *Taq*-LVL für die asPCR zu testen, wurden Echtzeit-PCR-Reaktionen in den für die Primerverlängerungsreaktionen verwendeten Sequenzkontexten durchgeführt. Hierfür wurde die Differenz der Zyklenzahlen ( $\Delta C_t$ ), bei denen das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen heraustritt, für kanonische und fehlgepaarte Primer-Templat-Komplexe bestimmt (Abbildung 3). *Taq*-wt zeigte keine oder eine nur schwache Diskriminierung, wogegen *Taq*-LVL in allen Sequenzkontexten zu einem  $\Delta C_t$  von 10 und damit zu einer erhöhten Diskriminierung führte, und zwar unabhängig vom jeweiligen Sequenzkontext sowie den Enzym- und Templatkonzentrationen, wie zusätzliche Untersuchungen zeigten.<sup>[7]</sup>

Mit der Identifizierung mehrerer aktiver Polymerasevarianten mit erhöhter Diskriminierung von Fehlpaarungen (oder: erhöhte Genauigkeit der Fehlpaarungsverlängerung) wurde hier gezeigt, dass keiner der veränderten Aminosäurereste essenziell für die Katalyse ist. Allerdings scheint die Funktion der Seitenkette von V880 am stärksten konserviert

zu sein, da alle identifizierten aktiven und stärker selektiven Polymerasemutanten an dieser Position eine unpolare Seitenkette enthalten. Des Weiteren weist das Fehlen jeglicher ionischer Reste bei den gewählten aktiven Mutanten darauf hin, dass Ladungen in dieser Sequenz mit D882, Magnesiumionen oder einem hereinkommenden dNTP interferieren und so das Enzym inaktivieren könnten.

Die Tatsache, dass die offensichtlich höhere Genauigkeit nicht auf den während der Durchmusterung der Enzykbibliothek verwendeten Sequenzkontext beschränkt ist, spricht für einen allgemeinen Mechanismus der Fehlerdetektion. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass die entsprechende Histidin-Seitenkette innerhalb der QVH-Sequenz an Mechanismen beteiligt ist, die die Verlängerungsgenauigkeit der DNA-Polymerase bestimmen, indem sie die H-Brücke durch die kleine Furche der DNA bildet (Abbildung 1).<sup>[5]</sup> Eine der identifizierten Mutanten mit erhöhter Verlängerungsgenauigkeit, PLQ, hat Aminosäuresubstitutionen an allen drei Positionen der QVH-Konsensussequenz; so ist z.B. H881 durch einen Glutaminrest substituiert. Die flexible Seitenkette von Glutamin ist in der Lage, anstelle von Histidin H-Brücken zu bilden,<sup>[14]</sup> und eine günstigere Wechselwirkung dieser Seitenkette könnte eine Ursache für die erhöhte Genauigkeit der PLQ-Mutante sein. Verhindert man allerdings die Bildung dieser H-Brücke gänzlich, wie in den Mutanten LVG und LVL, resultiert interesseranterweise auch eine höhere Genauigkeit. Unlängst wurde von ähnlichen Ergebnissen für eine KF<sup>-</sup>-Variante (H881A) berichtet.<sup>[15]</sup> Zurzeit sind jedoch die Ursachen für die beobachtete Selektivität noch nicht geklärt. So könnte ein bereits durch die Fehlpaarung destabilisierter Enzym-Substrat-Komplex mit fehlender H-Brücke stärker destabilisiert werden als ein Komplex mit der Möglichkeit zur H-Brückebildung, was die Selektivität der entsprechenden Polymerase erhöhen sollte.

Der hier beschriebene Ansatz zur effizienten Durchmusterung von DNA-Polymerasen, der zur Identifizierung von wertvollen Enzymvarianten führte, sollte sich zur Entwicklung von weiteren DNA-Polymerasen mit neuen Eigenschaften eignen. Neue Einblicke in biologische Prozesse sowie neue Werkzeuge für biotechnologische Anwendungen und Anforderungen könnten auf diese Weise erhalten werden.

Eingegangen am 16. Januar 2005,  
veränderte Fassung am 18. April 2005  
Online veröffentlicht am 1. Juli 2005

**Stichwörter:** DNA-Erkennung · DNA-Polymerase · Molekulare Evolution · Polymerasekettenreaktion

- [1] a) T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497–529; b) E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219.
- [2] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, USA, **2001**.
- [3] Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9491–9496.
- [4] a) F. J. Ghadessy, J. L. Ong, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4552–4557; b) S. Brakmann, S. Grzeszik, *Chem-BioChem* **2001**, *2*, 212–219; c) G. Xia, L. Chen, T. Sera, M. Fa, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**,

99, 6597–6602; d) P. H. Patel, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40266–40272; e) M. B. Kermekchiev, A. Tzekov, W. M. Barnes, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6139–6147; f) M. Fa, A. Radeghieri, A. A. Henry, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1748–1754; g) F. J. Ghadessy, N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 755–759.

- [5] M. C. Franklin, J. Wang, T. A. Steitz, *Cell* **2001**, *105*, 657–667.
- [6] M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos, *Protein Eng.* **1990**, *3*, 461–467.
- [7] *Experimentelles* siehe Hintergrundinformationen.
- [8] H. Engel, L. Zwang, H. vanVliet, J. J. Michiels, J. Stibbe, J. Lindemans, *Thromb. Haemostasis* **1996**, *75*, 267–269.
- [9] a) C. M. Joyce, X. C. Sun, N. D. Grindley, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24485–24500; b) D. T. Minnick, K. Bebenek, W. P. Osheroff, R. M. Turner, Jr., M. Astatke, L. Liu, T. A. Kunkel, C. M. Joyce, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3067–3075.
- [10] M. Suzuki, A. K. Avicola, L. Hood, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11228–11235.
- [11] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, N. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. C. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Siegler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, P. A. Futreal, *Nature* **2002**, *417*, 949–954.
- [12] X. X. Wei, H. L. McLeod, J. McMurrough, F. J. Gonzalez, P. Fernandez-Salguero, *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 610–615.
- [13] a) A. C. Syvänen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 930–942; b) M. M. Shi, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 164–172; c) M. V. Myakishev, Y. Khripin, S. Hu, D. H. Hamer, *Genome Res.* **2001**, *11*, 163–169.
- [14] A. Fersht in *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York, **1999**, S. 425.
- [15] D. T. Minnick, K. Bebenek, W. P. Osheroff, R. M. Turner, M. Astatke, L. Liu, T. A. Kunkel, C. M. Joyce, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3067–3075.
- [16] J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *391*, 304–307.