

Rolle des Wassers und der Natriumionen bei der Aktivierung des μ -Opioidrezeptors**

Shuguang Yuan,* Horst Vogel und Slawomir Filipek*

Mehr als 800 humane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) ermöglichen es den Zellen, verschiedene extrazelluläre Reize (Photonen, Duftstoffe, Hormone, Lipide usw.) zu erkennen und die Signale über die Zellmembran zur Regulierung zentraler physiologischer Prozesse weiterzuleiten.^[1] GPCR werden mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht und gehören deshalb zu den wichtigsten Zielproteinen für Arzneimittel.^[2] Von einigen GPCR wurden mithilfe der Röntgenkristallographie hochauflöste Proteinstrukturen erhalten, die sieben membranüberspannende Helices vor und nach der Rezeptoraktivierung zeigen.^[3] Die Einzelheiten der strukturellen und dynamischen Vorgänge innerhalb eines Rezeptors während der Signalübertragung durch die Membran müssen aber noch aufgeklärt werden, was ein zur statischen Strukturbestimmung komplementäres Vorgehen erfordert. Moleküldynamik(MD)-Simulationen haben wichtige Informationen über solche Prozesse geliefert.^[4] In diesem Zusammenhang haben wir hier die Rolle von Wassermolekülen und Natriumionen während der GPCR-vermittelten Signalübertragung durch die Membran untersucht. Obwohl es experimentelle Hinweise gibt, dass sowohl Wassermoleküle als auch Natriumionen für die Aktivierung und Signalübertragung^[5] bei GPCR eine entscheidende Rolle spielen, fehlt bis jetzt eine mechanistische Erklärung dieser Befunde.

Um diese zentralen Probleme zu lösen, haben wir MD-Untersuchungen an der Kristallstruktur des μ -Opioidrezeptors (μ -OR; PDB-Code: 4DKL)^[6] durchgeführt. Dabei haben wir ein spezifisches Bewegungsmuster im Wegverlauf der Natriumionen gefunden, die in den Rezeptor von der extrazellulären Seite eindringen und in Richtung des internen, konservierten Restes D114^{2,50} wandern (Helix-Nummerie-

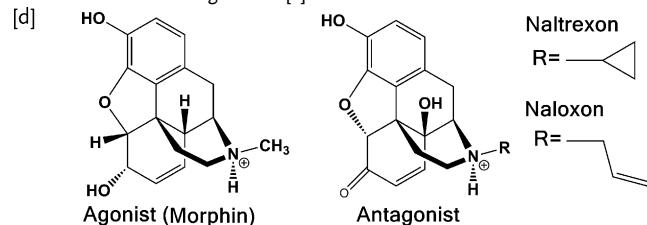
nung nach Ballesteros-Weinstein).^[7] Es besteht eine Korrelation zwischen spezifischen Stadien auf diesem Weg der Ionen und den spezifischen, lokalen Strukturveränderungen innerhalb des Rezeptors sowie der Verteilung interner Wassermoleküle. Die MD-Simulationen haben die experimentell gefundene doppelte Rolle der Natriumionen – 1) die verminderte Bindungsaffinität für Agonisten und 2) die erleichterte Aktivierung der G-Proteine – aufgeklärt.^[8]

Der μ -OR gehört zur Rhodopsin-ähnlichen GPCR-Familie. Dieser Rezeptor kommt in vielen Teilen des Gehirns vor und wurde auch im Rückenmark und Verdauungstrakt nachgewiesen.^[9] Um zu klären, welche Rolle Natriumionen an der allosterischen Bindungsstelle^[10] des μ -OR und, zusammen mit Wassermolekülen, bei der Aktivierung des Rezeptors spielen, haben wir MD-Simulationen unter Berücksichtigung aller Atome im langen Zeitmaßstab (insgesamt 9.4 μ s) durchgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Durchgeführte MD-Simulationen.

Fall	Apo	morWAT ^[a]	morNA ^[b]	naltNA ^[b]	naloNA ^[b]
Ligand ^[d]	–	Morphin	Morphin	Naltrexon	Naloxon
Zeitdauer ^[c]	500 \times 2	1400 \times 2	1400 \times 2	1400 \times 1	1400 \times 1

[a] ohne Na^+ an der allosterischen Bindungsstelle. [b] Mit Na^+ an der allosterischen Bindungsstelle. [c] ns \times Zahl der Simulationen.



[*] Prof. S. Filipek

Labor für Biomodellierung, Fakultät der Chemie
Universität Warschau, Warschau (Polen)
E-Mail: sfilipek@chem.uw.edu.pl

Dr. S. Yuan, Prof. H. Vogel

Labor für Physikalische Chemie der Polymere und Membranen
Eidgenössische Technische Hochschule Lausanne
Lausanne (Schweiz)
E-Mail: shuguang.yuan@gmail.com

[**] Wir möchten uns für die finanzielle Unterstützung aus dem Siebten Rahmenprogramm der Europäischen Union (FP7/2007–2013; grant 211800) und von dem Nationalen Wissenschaftszentrum, Polen (DEC-2011/03/B/NZ1/03204) bedanken. S.Y. wurde teilweise aus dem Swiss Sciex Programm (Grant 11.150) unterstützt. Ein Teil der Berechnungen wurde in dem interdisziplinären Zentrum für mathematische und rechnergestützte Modellierung in Warschau [Grant G07-13] durchgeführt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302244> zu finden.

Die meisten veröffentlichten hochauflösten GPCR-Kristallstrukturen zeigen an der allosterischen Bindungsstelle D^{2,50} Wassermoleküle, die ausgedehnte Wasserstoffbrücken-Netzwerke bilden.^[5] In den kürzlich bestimmten Strukturen des Adenosin-A2A-Rezeptors^[5] und des Protease-aktivierten Rezeptors (PAR1)^[11] wurde allerdings jeweils ein am D^{2,50} gebundenes Natriumion nachgewiesen. Im Dopamin-Rezeptor vom Subtyp D₂R wurde in dieser Region ebenfalls ein gebundenes Natriumion vorgeschlagen.^[12] Unsere Simulationen bestätigen, dass ein Natriumion an die allosterische Bindungsstelle des μ -Opioidrezeptors von der extrazellulären Seite (Abbildung 1) gelangen kann. Während der anfänglichen 30 ns der MD-Simulation (Abbildung 1) bewegte sich das Natriumion in einer Region rings um die negativ geladene Aminosäure E229^{5,35} in der Helix TM5 des μ -OR, die dem Einfluss der extrazellulären Phase (Abbildung 1 A, Bereich I) ausgesetzt ist. Interessanterweise wurde die Aminosäure E^{5,35}

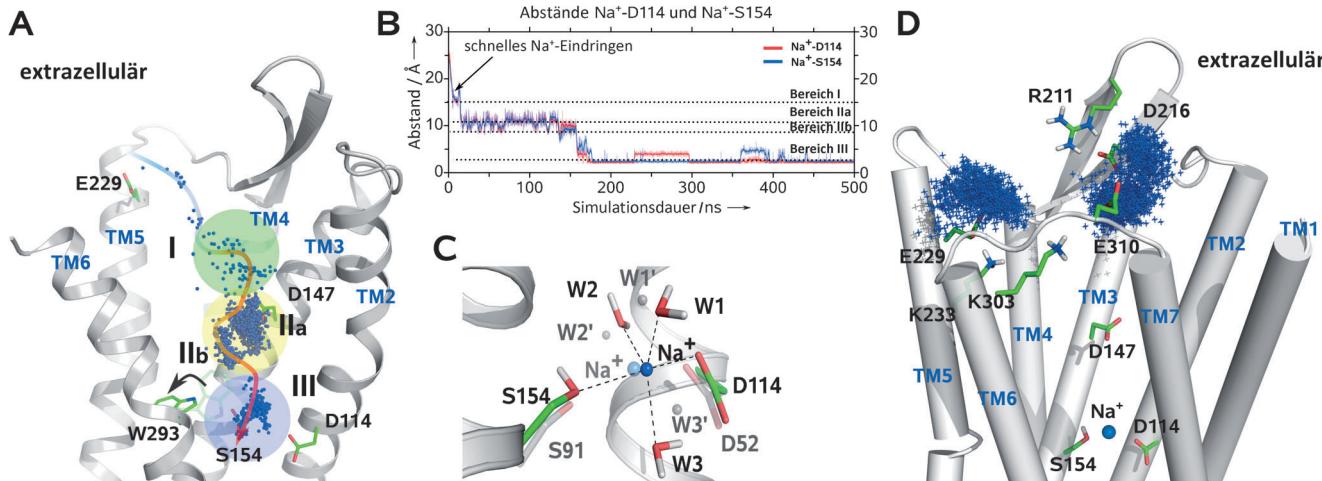


Abbildung 1. Eintrittsweg des Natriumions in den μ -OR. A) Der Querschnitt des μ -OR zeigt sechs membranüberspannende Helices TM1-TM6 und die Trajektorie (roter Pfeil) eines bestimmten Natriumions während der anfänglichen 200 ns der Simulation des Apo- μ -OR. Die blauen Punkte sind die aufeinanderfolgenden Positionen des Natriumions auf seinem Weg ins Innere des Proteins. Ein schwarzer Pfeil markiert eine Konformationsänderung der Aminosäure W293^{6,48}. Anfänglich hat die Aminosäure E229^{5,35} das Natriumion im Bereich I gehalten und dann schnell in den Bereich IIa unmittelbar neben der Aminosäure D147^{3,32} überführt. Nach einem kurzen Aufenthalt im Bereich IIb, ungefähr nach 150 ns Simulationszeit, wurde es endgültig im Bereich III nahe der Aminosäuren D114^{2,50} und S154^{3,39} stabilisiert. B) Die Abstände Na^+ -D114 (in blau) und Na^+ -S154 (in rot) während zwei separaten 500 ns Simulationen. C) Überlagerung der hochauflösten Struktur des Adenosin-A2A-Rezeptors (helle Farben) und der endgültigen MD-Struktur für Apo- μ -OR (intensive Farben). D) Positionen des zweiten Natriumions (blaue Kreuze) bei der Simulation eines Rezeptors ohne Liganden. Dieses Ion befindet sich entweder am E229^{5,35} oder zwischen D216^{ECL2} und E310^{ECL3} im extrazellulären Teil des μ -OR.

auch im δ -OR und κ -OR gefunden, was die Wichtigkeit einer negativen Ladung an dieser Stelle impliziert. Während der nächsten Molekulardynamik Schritte (30–160 ns, Abbildung 1B) wurde das Natriumion mithilfe von E229^{5,35} an die eigentliche Bindungsstelle D147^{3,32} (Abbildung 1A, Bereich IIa) des Rezeptors geführt, was für die Ligandenbindung entscheidend ist.^[13] Danach ist Na^+ in dem Bereich IIb (Abbildung 1A) eingedrungen, um auf ein Signalumschalten zu warten, und schließlich an die allosterische Bindungsstelle zu gelangen. Eine Konformationsänderung der Aminosäure W293^{6,48} ermöglichte ein weiteres Eindringen des Natriumions in die tiefe Tasche des μ -OR (Film M1), um schließlich zwischen den Resten S154^{3,39} und D114^{2,50} (Abbildung 1A, Bereich III) stabilisiert zu werden und dort bis zum Ende der Simulation (Abbildung 1B) zu bleiben. Unser Befund entspricht nahezu eindeutig einer neulich bestimmten 1.8 Å Kristallstruktur des Adenosin-A2A-Rezeptors mit gebundenem Agonisten.^[5] Die Überlagerung der Endstruktur des Apo μ OR aus unseren MD-Simulationen und der Kristallstruktur des Adenosin-A2A-Rezeptors zeigt das Natriumion in den beiden Strukturen in fast identischen Positionen zwischen D114^{2,50} und S154^{3,39} (Abbildung 1C). Außerdem finden wir in unseren Simulationen drei Wassermoleküle, die auch in der Kristallstruktur auftreten und in beiden Fällen das Natriumion koordinieren (Abbildung 1C). Ein ähnlicher Weg des Natriumions wurde woanders an einem aus MD-Simulationen erhaltenen Homologiemodell des D2-Dopaminrezeptors vorgeschlagen,^[12] aber die exakte Position des Natriumions konnte dort nicht bewiesen werden, weil geeignete Kristallstrukturen fehlten.

Nachdem in unserer Simulation das erste Natriumion durch D114^{2,50} an der ligandenfreien allosterischen Bin-

dungsstelle des μ -OR aufgefangen wurde, trat ein zweites Natriumion entweder bei E229^{5,35} oder zwischen D216^{ECL2} und E310^{ECL3} (Abbildung 1D) auf. Die drei negativ geladenen Reste auf der extrazellulären Seite des μ -OR bilden ein Dreieck oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle wobei sie sich alle unterhalb der positiv geladenen Reste (Abbildung S1) befinden. Die negativ geladenen Reste auf der extrazellulären Seite sind sehr wichtig für die temporäre Bindung der positiv geladenen Liganden, bis der Rezeptor durch thermische Konformationsfluktuationen den Weg zur Bindungsstelle freigibt.^[6,14] Das Blockieren dieser Erkennungsstelle durch Natriumionen könnte erklären, warum man bei zunehmender Natriumionenkonzentration eine verminderte Bindungsaffinität zu den Liganden beobachtet.^[8a,15]

Obwohl es bekannt ist, dass Natriumionen die Bindungsaffinität zu den Liganden des μ -OR vermindern,^[8a,16] hat man überraschenderweise festgestellt, dass Natriumionen auch die durch Agonisten induzierte Aktivierung der μ -OR fördern (gemessen durch GTP-Bindung) und gleichzeitig die spontane Aktivität der G_i/G_o -gekoppelten Rezeptoren hemmen.^[5,12] Um diese Befunde aufzuklären, haben wir MD-Simulationen der μ -OR mit gebundenem Agonisten oder Antagonisten durchgeführt. Die Bindungsmoden aller Liganden haben wir durch Ligandendocken und Optimierung der Strukturen der Komplexe bestimmt. Nach einer MD-Äquilibrierung erhielten wir für alle von uns untersuchten Fälle ähnliche Konformationen der gebundenen Liganden, da die Liganden ähnlich starre Strukturen zeigten (siehe Tabelle 1 und Abbildung S2). Bei jedem Liganden bildet das Sauerstoffatom im Phenol eine Wasserstoffbrücke zum H297^{6,52} mit durchschnittlich zwei Wassermolekülen aus, während ein protoniertes Stickstoffatom an einer Salzbrücke mit D147^{3,32}

beteiligt ist. Morphin und die beiden Antagonisten beeinflussen den Rezeptor unterschiedlich aufgrund der verschiedenen chemischen Strukturen, insbesondere am Stickstoffatom. Die am Stickstoffatom gebundene kleine Methylgruppe im Morphin (Abbildung S2) zeigt fast keine Wechselwirkung mit den hydrophoben Seitenketten von W293^{6,48} und Y326^{7,43}, wodurch genügend Raum für ein Eindringen der Wassermoleküle in das Innere des μ -OR entsteht. Außerdem zeigen die Simulationen, dass in einem Rezeptor mit gebundenem Agonisten ein Auflösen der Wasserstoffbrückenbindung zwischen D147^{3,32} und Y326^{7,43} den für die Wassermoleküle zugänglichen Raum vergrößert. Kolinski et al. haben im frühen Stadium der Aktivierung des homologen κ -Opioidrezeptors ebenfalls ein Auflösen dieser Bindung gefunden.^[17] Dagegen lagern sich die größeren hydrophoben Reste der Antagonisten Naltrexon und Naloxon zwischen den hydrophoben Seitenketten von W293^{6,48} und Y326^{7,43} (Abbildung S2 C,D) ein und vermindern dadurch ein weiteres Eindringen von Wassermolekülen. Die Strukturen aus jeder der 1400-ns-Simulationen des Rezeptors mit gebundenem Antagonisten zeigen deutlich weniger Wassermoleküle an der allosterischen Bindungsstelle (Abbildung S3 A,B) als die mit gebundenen Agonisten sowohl für morNA (Abbildung 2 A) als auch für morWAT (Abbildung S3 A). Statistische Berechnungen der Zahl der Wassermolekülen in einem Abstand von 6 Å von D114^{2,50} bestätigen diese Beobachtungen (Abbildung S4). Die Zahl der Wassermoleküle steigt in Anwesenheit eines Natriumions an der allosterischen Bindungs-

stelle des morNA im Vergleich zum Fall ohne Natriumion an. Darüber hinaus hat eine Analyse der letzten 50 ns jeder der 1400-ns-Simulationen ergeben, dass ein schneller Austausch von Wassermolekülen zwischen dem Inneren des μ -OR mit gebundenem Agonisten und dem extrazellulären Raum stattfindet (Abbildung 2 A und S3 A). Dies ist nicht der Fall beim μ -OR mit gebundenen Antagonisten (Abbildung 2 B und S3 B). Woanders wurde gezeigt, dass die Bewegung der Wassermoleküle an den konservierten Bereichen des Proteins wichtig ist, weil diese mit den für die GPCR-Aktivierung wichtigen Schaltzentren verbunden sind.^[18]

In vielen GPCR bildet das D(E)RY-Motiv am zytoplasmatischen Ende der TM3 ein „ionisches Schloss“ zwischen dem hoch konservierten R^{3,50} und der TM6, E^{6,30} im Fall des Rhodopsins, das den inaktiven Zustand des Rezeptors erhält.^[19] Im μ -OR findet man auch das DRY-Motiv, das TM3 und TM6 durch eine Wasserstoffbrücke zwischen R165^{3,50} und T279^{6,34} verbindet. Woanders wurde vorgeschlagen,^[6] dass diese Wechselwirkung den Rezeptor in seiner inaktiven Form stabilisiert, insbesondere deswegen, weil man festgestellt hatte, dass die Mutation T279^{6,34}K das Gleichgewicht des Rezeptors zum konstitutiv aktiven Zustand verschiebt.^[20] Bei unseren MD-Simulationen wurde während der Äquilibrierungsphase nach Entfernen der Sulfationen aus der Kristallstruktur die Bindung zwischen TM3 und TM6 zeitweilig gelöst und später wieder hergestellt (Abbildung 3 A). Bei beiden Simulationen des morWAT wurde eine Wasserstoffbrücke zwischen R165^{3,50} und T279^{6,34} nach 650–700 ns gebildet, während die ionische Wechselwirkung R165^{3,50}-D164^{3,49} bis zum Ende der Simulationen stabil blieb. Dagegen ist bei den Simulationen des morNA eine fast gleichzeitige Auflösung der ionischen Wechselwirkung innerhalb des DRY-Motivs und die Bildung einer Bindung zwischen TM3 und TM6 nach ungefähr 1100 ns aufgetreten. Die oben erwähnten Veränderungen in dem DRY-Motiv haben wir weder im μ -OR mit gebundenem Antagonisten noch in der Apo-Form des Rezeptors (Abbildung S5) beobachtet. Die Bildung einer transienten Bindung zwischen TM3 und TM6 durch R165^{3,50} im Anfangsstadium der Aktivierung könnte die Aufhebung der intrahelikalen Wechselwirkungen zwischen R165^{3,50} und D164^{3,49} erleichtern und es R165^{3,50} dann ermöglichen günstigere Wechselwirkungen während der späteren Aktivierungsphasen einzugehen, zum Beispiel mit Y^{5,58}, analog zum aktivierten Rhodopsin und zum β 2-adrenergen Rezeptor. Die Abbildung S6 zeigt die resultierenden Bewegungen der Helices im μ -OR mit gebundenem Morphin und Na⁺ an der allosterischen Bindungsstelle. Diese Bewegungen könnten sehr frühe Stadien der μ -OR-Aktivierung darstellen.

Abschließend kann man feststellen, dass wir bei MD-Simulationen im langen Zeitmaßstab wiederholt die Trajektorie von Natriumionen beim Eindringen in den μ -OR (Abbildung 3 B) beobachtet haben. Auf der Grundlage experimenteller Daten können einerseits Natriumionen die Bindungsaffinität zu Liganden der μ -ORs beeinflussen. Im Rahmen unserer MD-Simulationen lässt sich das mit einem abstoßenden Effekt gegenüber den positiv geladenen Liganden (protonierten Aminen) bei der Bindung des zweiten Natriumions an die extrazelluläre Oberfläche des Rezeptors erklären. Andererseits können Natriumionen auch die Akti-

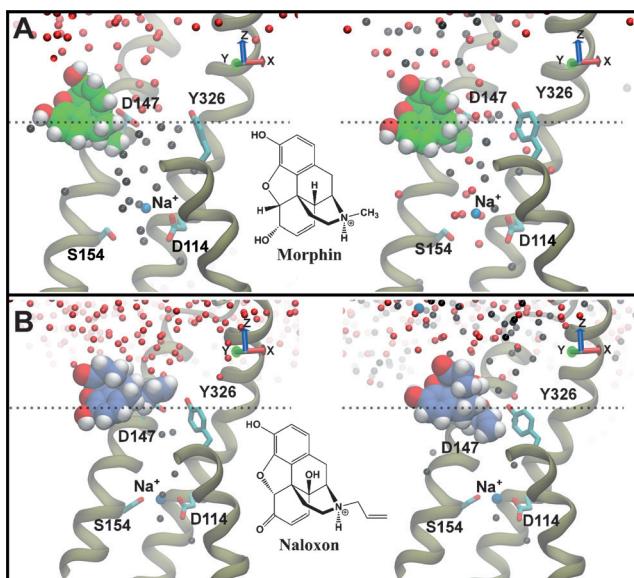


Abbildung 2. Wassermoleküle innerhalb des μ -OR nach 1350 ns (links) und 1400 ns dauernden MD-Simulationen (rechts). Rote Punkte: Wassermoleküle oberhalb der Ligandenbindungsstelle (Punktlinie); schwarze Punkte: Wassermoleküle unterhalb der Ligandenbindungsstelle. A) μ -OR mit gebundenem Morphin und Na⁺ an der allosterischen Bindungsstelle (unmittelbar neben D114^{2,50}). B) μ -OR mit gebundenem Naloxon und Na⁺ an der allosterischen Bindungsstelle; hier kann ein Austausch von Wassermolekülen zwischen der extrazellulären Phase und dem Bereich der allosterischen Bindungsstelle nicht stattfinden. Zur Verdeutlichung sind chemische Strukturen des Morphins und Naloxons gezeigt.

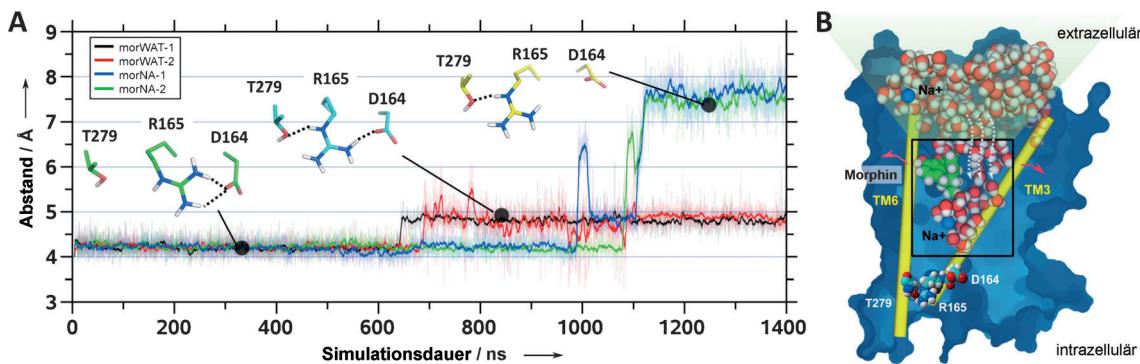


Abbildung 3. A) Zeitliche Veränderungen des Abstandes zwischen D164^{3,49} und R165^{3,50} im DRY-Motiv. Bei allen MD-Simulationen entstehen eine Bindung zwischen T279^{6,34} und R165^{3,50}. Befinden sich nur Wassermoleküle an der allosterischen Bindungsstelle, treten auch keine weiteren Veränderungen auf (schwarze und rote Linien); in Anwesenheit von Na^+ an der allosterischen Bindungsstelle wird jedoch die ionische Wechselwirkung zwischen D164^{3,49} und R165^{3,50} unterbrochen (blaue und grüne Linien). B) Rolle der Natriumionen und der Wassermoleküle bei der Aktivierung des μ -OR. In Anwesenheit von Morphin entsteht ein beträchtlicher Überschuss an Wassermolekülen an der allosterischen und an der orthostERICchen Bindungsstelle (schwarzes Rechteck). Natriumionen (blaue Kugeln) induzieren zusätzliche Bewegungen (weiße Pfeile) der Wassermoleküle von der extrazellulären Seite (helle blaugrüne Kegel) in Richtung der allosterischen Bindungsstelle des μ -OR mit gebundenem Agonisten. Die Bewegungen der Aminosäurereste (rote Pfeile) der membranüberspannenden Helices ermöglichen solche Bewegungen der Wassermoleküle.

vierung des μ -OR erleichtern indem sie die Bewegung von Wassermolekülen in Richtung der allosterischen Bindungsstelle einleiten, und damit die Wirkung des orthostERICchen Agonisten beeinflussen. Unsere Ergebnisse haben den Weg geebnet, die Rolle der Wassermoleküle und der Natriumionen bei der Aktivierung der GPCR zu verstehen. Sie könnten eine Anwendung beim virtuellen Screenen von GPCR-aktiven Substanzen finden indem ihr Einfluss auf die Mobilität der rezeptorinternen Wassermoleküle untersucht wird.

eingegangen am 16. März 2013

Online veröffentlicht am 31. Juli 2013

Stichwörter: Aktivierungsmechanismus · Aktivierungsschalter · G-Protein-gekoppelte Rezeptoren · Natriumionen · Opioidrezeptor

- [1] V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 531–556.
- [2] V. A. Doze, D. M. Perez, *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 645–675.
- [3] J. A. Salon, D. T. Lodoski, K. Palczewski, *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 901–937.
- [4] a) L. Gelis, S. Wolf, H. Hatt, E. M. Neuhaus, K. Gerwert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1274–1278; b) R. Vijayan, A. J. Plested, M. L. Mayer, P. C. Biggin, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1751–1760.
- [5] W. Liu, E. Chun, A. A. Thompson, P. Chubukov, F. Xu, V. Katritch, G. W. Han, C. B. Roth, L. H. Heitman, I. J. AP, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2012**, *337*, 232–236.
- [6] A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka, S. Granier, *Nature* **2012**, *485*, 321–326.
- [7] J. A. Ballesteros, H. Weinstein, *Methods Neurosci.* **1995**, *25*, 366–428.
- [8] a) P. Puttfarcken, L. L. Werling, S. R. Brown, T. E. Cote, B. M. Cox, *Mol. Pharmacol.* **1986**, *30*, 81–89; b) N. Yabaluri, F. Medzihradsky, *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 1053–1061.
- [9] N. A. Ingoglia, V. P. Dole, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1970**, *175*, 84–87.
- [10] A. Christopoulos, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 198–210.
- [11] C. Zhang, Y. Srinivasan, D. H. Arlow, J. J. Fung, D. Palmer, Y. Zheng, H. F. Green, A. Pandey, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, S. R. Coughlin, B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, *492*, 387–392.
- [12] J. Selent, F. Sanz, M. Pastor, G. De Fabritiis, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000884.
- [13] J. G. Li, C. Chen, J. Yin, K. Rice, Y. Zhang, D. Matecka, J. K. de Riel, R. L. DesJarlais, L. Y. Liu-Chen, *Life Sci.* **1999**, *65*, 175–185.
- [14] C. B. Fowler, I. D. Pogozheva, A. L. Lomize, H. LeVine III, H. I. Mosberg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15796–15810.
- [15] D. E. Selley, C. C. Cao, Q. Liu, S. R. Childers, *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 987–996.
- [16] a) S. J. Paterson, L. E. Robson, H. W. Kosterlitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6216–6220; b) S. R. Childers, I. Creese, A. M. Snowman, S. H. Synder, *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, *55*, 11–18.
- [17] M. Kolinski, S. Filipek, *J. Mol. Model.* **2010**, *16*, 1567–1576.
- [18] a) T. E. Angel, M. R. Chance, K. Palczewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8555–8560; b) S. Yuan, U. Ghoshdastider, B. Trzaskowski, D. Latek, A. Debinski, W. Pulawski, R. Wu, V. Gerke, S. Filipek, *PLoS One* **2012**, *7*, e47114.
- [19] K. P. Hofmann, P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H. W. Choe, J. H. Park, M. Heck, O. P. Ernst, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 540–552.
- [20] P. Huang, I. Visiers, H. Weinstein, L. Y. Liu-Chen, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11972–11980.