



Aptamerbasiertes Caging zur selektiven Maskierung von Protein-domänen**

Falk Rohrbach, Florian Schäfer, Manuela A. H. Fichte, Franziska Pfeiffer, Jens Müller, Bernd Pötzsch, Alexander Heckel* und Günter Mayer*

Die externe Kontrolle biologischer Phänomene verlangt eine möglichst hohe Zeit- und Ortsauflösung auf Makromolekül-ebene. In den letzten Jahren wurden zu diesem Zweck unterschiedliche Ansätze verfolgt, z.B. durch die Verwendung photochemischer Werkzeuge wie Photoschalter oder Photo-trigger („cages“).^[1] Bei der Caging-Strategie werden Schlüsselpositionen in Molekülen durch photolabile Gruppen blockiert, um diese zum gewünschten Zeitpunkt am gewünschten Ort freizugeben.

Ein Problem in diesem Zusammenhang ist die gezielte Steuerung einer Proteinaktivität mit Licht. Regulatorische Epitope, z.B. zur Steuerung der Proteinfunktion, können kleine katalytische Zentren, aber auch große Interaktionsflächen für makromolekulare Komplexe sein. Die meisten Proteine sind aufgrund ihrer Größe nicht für die Festphasensynthese geeignet, und der translationale Einbau von nichtnatürlichen „caged“ Aminosäuren ist daher die Methode der Wahl.^[2] Die Interaktion der Proteine mit Makromolekülen erfolgt über eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen mit oft unbekannten Oberflächen, was die gezielte Steuerung dieser Prozesse zu einer Herausforderung macht. Die Herstellung eines lichtaktivierten Proteins mit einer Vielzahl von zufällig verteilten „caged“ Aminosäuren ist strategisch nicht sinnvoll, da es oft zu einer unspezifischen Blockierung aller Proteinfunktionen führt.^[3]

Als Zielprotein dieser Studie wählten wir die Serinprotease Thrombin aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten, ihre Funktion zu kontrollieren (Abbildung 1). Zusätzlich zum

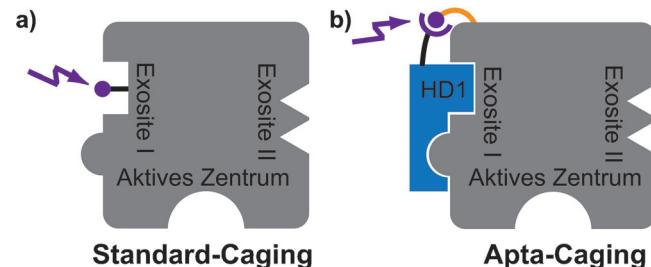


Abbildung 1. Vergleich von a) Standard-Caging eines einzelnen Aminosäurerests mit einem limitierten Wechselwirkungs-Inhibitions-Radius und b) Apta-Caging zur Maskierung von Proteindomänen. Aptamers ähneln einem Gipsabdruck und sind in der Lage, regulatorische Proteinoberflächen mit der Aptamerdomäne und der darauf folgenden kovalenten, aber photolabilen Verknüpfung zu blockieren. Durch Bestrahlung wird die kovalente Verbindung von Aptamer und Protein gespalten und die Oberfläche des Epitops freigegeben.

katalytisch aktiven Zentrum koordiniert Thrombin seine vielfältigen Wechselwirkungen mit verschiedenen makromolekularen Substraten durch seine Subdomänen „Exosite I“ und „Exosite II“. So stabilisiert z.B. Exosite I die Bindung von Fibrinogen, während Exosite II unter anderem die Wechselwirkung von Antithrombin über Glykosaminoglykanen vermittelt.^[4]

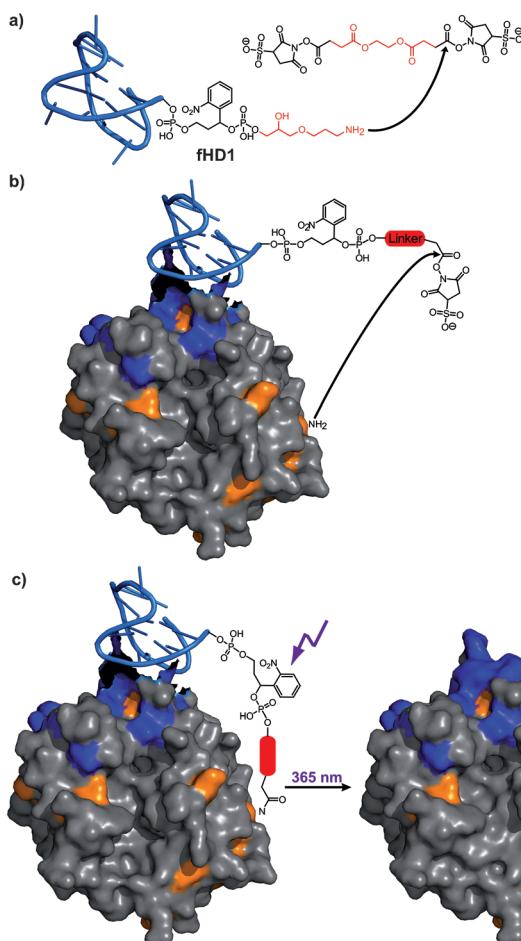
Die Anwendung von Aptamern ist eine hervorragende Technik zur Adressierung individueller Subdomänen von Proteinen.^[5] Aptamere sind wie ein Gipsabdruck eines Teils ihres Zielmoleküls. Für ihre Entwicklung ist keine strukturelle Information nötig, dennoch können individuelle Subdomänen durch angepasste Selektionsschemata adressiert werden. Wir beschreiben hier die Verwendung eines Aptamers, HD1, um die inhärente Limitierung lokaler Cages zu überwinden. Das Aptamer HD1 wird mittels einer lichtgesteuerten Freisetzungsstrategie zu einem effizienten Supracinge („Apta-Cage“), der zur verlässlichen, aber temporären Maskierung einer regulatorischen Proteinoberfläche eingesetzt wird. In früheren Studien wurde gezeigt, dass HD1 die Exosite I bedeckt und die Bindung von Fibrinogen an Thrombin blockiert.^[6] Das Aptamer hat eine Interaktionsfläche von ca. 915 Å², während ein klassischer Nitrophenylethyl(NPE)-Cage eine Oberfläche von 110 Å² abdeckt. Dies verdeutlicht die Überlegenheit des Apta-Caging in der reversiblen Epitop-Blockierung.

Nach unserer Meinung ist Thrombin ein ideales Modell, um die Fähigkeit des Apta-Caging zur Blockierung einer regulatorischen Domäne und deren Reaktivierung mit Licht zu demonstrieren. Um dies zu erreichen, synthetisierten wir eine funktionalisierte Variante von HD1, fHD1, mit einer photospaltbaren Erweiterung am 3'-Ende gefolgt von einer termi-

[*] F. Rohrbach, F. Pfeiffer, Prof. Dr. G. Mayer
Life and Medical Sciences Institute
Gerhard Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de
Homepage: <http://www.mayerlab.de>
F. Schäfer, M. A. H. Fichte, Prof. Dr. A. Heckel
Institut für Organic Chemie und Chemische Biologie, Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: heckel@uni-frankfurt.de
Homepage: <http://photochem.uni-frankfurt.de>
Dr. J. Müller, Prof. Dr. B. Pötzsch
Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin
Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 902 und MA 3442/1-2), dem Fonds der Chemischen Industrie (Stipendium an M.A.H.F.) und der NRW Graduate School LIMES Chemical Biology (Stipendium an F.R.) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306686> zu finden.



Schema 1. a) Herstellung des fHD1-Aptamer-basierten Reagens und b) die templatierte Reaktion für das Apta-Caging von Thrombin. c) Durch Bestrahlung wird der Verknüpfer (Linker) gespalten und lässt aktiviertes Thrombin entstehen. PDB: 4DII (Exosite I ist blau markiert, die Lysin-Gruppen sind orange dargestellt).

nalen Aminogruppe (Schema 1a). In früheren Studien konnten wir zeigen, dass die Modifikation am 3'-Ende und nicht am 5'-Ende erfolgen muss, da bei letzterem die Aktivität des Aptamers drastisch reduziert wird.^[7] Im aktuellen Fall hat die fHD1-Modifikation keinen Einfluss auf die Affinität des Aptamers zu Thrombin (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Die zusätzliche Funktionalisierung mit Sulfo[ethylenglycol-bis(succinimidylsuccinat)] (EGS), das zwei Sulfo-NHS-Gruppen beinhaltet, führt zu einem Aptamer-basierten Reagens (Schema 1a), das nach der Bindung an Thrombin einen kovalenten Komplex mit einer der benachbarten Lysingruppen bildet. Diese photolabile Verknüpfung ist essentiell, da in einem nichtkovalenten Komplex aus Aptamer und Thrombin aktive Protease freigesetzt würde, sobald die lokale Konzentration in die Nähe oder unter die Dissoziationskonstante fällt, welche in diesem Fall bei ca. 100 nm liegt (Abbildung S1).

Die Visualisierung der Bildung des kovalenten Komplexes (fHD1-Thrombin) und dessen lichtinduzierter Spaltung wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließende Western-Blot-Analyse erreicht (Abbildung 2). Als Kontrollexperimente wurden die Reaktionen einmal mit einer Punktmutation des Aptamers mit reduzierter Affinität

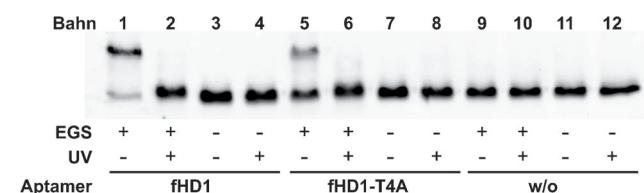


Abbildung 2. Western-Blot-Analyse des Apta-Cage von Thrombin. Aptamer fHD1 (Bahnen 1–4), die Punktmutante fHD1-T4A (Bahnen 5–8) und kein Aptamer (Bahnen 9–12) wurden für die Aptamer-gesteuerte Bildung des Apta-Cages von Thrombin eingesetzt. Der EGS-Verknüpfer und UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) wurden wie angegeben verwendet. Zur Quantifizierung siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S2.

zu Thrombin (fHD1-T4A), einmal ohne EGS-Verknüpfer und schließlich ohne jedwedes Aptamer durchgeführt. Die Komplexe wurden mittels Gelfiltration gereinigt und die daraus resultierenden Proben mithilfe eines Thrombin-spezifischen Antikörpers analysiert. Die leichte (6 kDa) und schwere Kette (31.5 kDa) von Thrombin sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, die durch die reduzierenden und denaturierenden Bedingungen im SDS-PAGE-Gel gespalten wird. Die kovalente Verbindung aus Aptamer (5.5 kDa) und der schweren Kette von Thrombin resultiert in einer Bande bei 37 kDa. Wie in Abbildung 2 gezeigt, bringt die Reaktion einen Aptamer-Thrombin-Komplex (Bahn 1) hervor, der durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) gespalten werden kann (Bahn 2). Wenn die Punktmutation fHD1-T4A in die Reaktion eingesetzt wird, ist ebenfalls ein kovalenter Komplex zu erkennen (Bahn 5), allerdings in deutlich schwächerer Ausprägung (zur Quantifizierung siehe Abbildung S2). Dieser Komplex ist ebenfalls lichtspaltbar (Bahn 6). Bei Verzicht auf entweder das Aptamer oder den EGS-Verknüpfer ist keine Bandenverschiebung zu beobachten (Bahnen 3 und 4 sowie 7–12). Aktuelle Studien zeigen, dass HD1 nicht nur an Exosite I bindet, sondern auch eine schwache Wechselwirkung mit der basischen Exosite II von Thrombin eingeht.^[8] Unsere Western-Blot-Ergebnisse erbringen neue Erkenntnisse zu diesem Phänomen. Die Bildung des Komplexes resultiert in einer dominanten Bande entsprechend dem 1:1-Komplex und einer zusätzlichen, langsamer wandernden Bande, die höchstwahrscheinlich den ternären Komplex aus zwei fHD1-Molekülen in kovalenter Bindung zum Thrombin repräsentiert (Abbildung S3a). Beide Banden verschwinden nach Bestrahlung. Weder die Zugabe von äquimolaren Konzentrationen von nichtmodifiziertem HD1 noch die Zugabe von HD1-T4A waren in der Lage, die Bildung des ternären Komplexes mit Exosite I und II zu verhindern. Die Zugabe von HD22, einem Aptamer, welches Exosite II spezifisch erkennt,^[9] reduziert hingegen eindeutig die Bildung des ternären Komplexes (Abbildung S3a). Ähnliche Ergebnisse wurden für den fHD1-T4A-Komplex beobachtet (Abbildung S3b).

Wie in Abbildung 2 zu erkennen, ist die Bildung des kovalenten Komplexes nicht quantitativ, es verbleibt eine Restmenge an freiem Thrombin (Abbildung 2, Bahn 1). Eine weitere Abreicherung von freiem Thrombin wurde mithilfe eines Bead-Aufreinigungsansatzes untersucht. Magnetische Beads mit angekuppeltem HD1, die mit dem freien Thrombin in der Lösung interagieren sollten, wurden mit dem Reakti-

onsprodukt inkubiert. Während dies sehr gut mit Lösungen von freiem Thrombin funktioniert, ist eine vollständige Abreicherung von freiem Thrombin in den fHD1-Thrombin-Komplex-Proben nicht möglich (Abbildung S4). Dies weist darauf hin, dass das verbleibende Thrombin nicht mit HD1 zu interagieren vermag und damit in Koagulationstests inaktiv sein wird.

Um die erfolgreiche Maskierung der Exosite I im kovalenten Komplex zu untersuchen, verwendeten wir ein amidolytisches Testsystem in An- und Abwesenheit von Hirudin (Abbildung S5). Hirudin erkennt gleichzeitig Exosite I und das aktive Zentrum von Thrombin mit einer sehr hohen Affinität (K_d -Wert von 0.2 pm) und blockiert dadurch die amidolytische Aktivität.^[10] Die Ergebnisse des amidolytischen Testsystems sind in Abbildung 3 und in den Hintergrundinformationen Abbildung S6–S8 gezeigt. Grundsätzlich behält der kovalente Komplex einen Teil der Spaltungsaktivität in Gegenwart von Thrombin, während Bestrahlung eine vollständige Hemmung der Peptidspaltung zur Folge hat. Dies weist eindeutig auf die Maskierung der Exosite I durch das Aptamer hin. Kontrollexperimente mit fHD1-T4A oder ohne Aptamer zeigen eine lichtunabhängige Hemmung der amidolytischen Aktivität von Thrombin abhängig von der Hirudin-Konzentration. Erhöhte Hirudin-Konzentrationen reduzieren die amidolytische Aktivität des kovalenten Komplexes (Abbildung S6). Dies ist möglicherweise durch eine Kompetition von fHD1 durch Hirudin, welches eine 500000-fach höhere Affinität als HD1 hat, aus dem Komplex oder durch eine geringe residuale Wechselwirkung von Hirudin mit dem aktiven Zentrum selbst in Anwesenheit von fHD1 begründet.

Als nächstes haben wir untersucht, ob der Aptacage aus Thrombin und fHD1 in einem Testsystem verwendet werden kann, welches auf lichtabhängiger Gerinnselbildung basiert. Um dies zu erreichen, verwendeten wir ein sensitives spektrometrisches Testsystem, das die erhöhte Absorption von UV-Licht von Plasma-Gerinnseln nutzt (das schwache UV-Licht des Plattenlesers des Testsystems ist nicht ausreichend für jegliches Uncaging).^[11] Wenn die Fibrinogen-Bindestelle durch den kovalenten Komplex zwischen fHD1 und Thrombin maskiert ist, verursacht dessen Zugabe keine Koagulation des Plasmas (Abbildung 4a). Bestrahlung ($\lambda = 365$ nm) hingegen verursacht die Freigabe von Thrombin, was zu einer Gerinnselbildung führt (Abbildung 4b), veranschaulicht durch die Absorptionserhöhung. Demgegenüber wird bei der Reaktion mit fHD1-T4A kein signifikanter Unterschied zwischen der Gerinnungsaktivität vor und nach Bestrahlung erkennbar (Abbildung 4c,d). Gleiches gilt für die Kontrollreaktion ohne Oligonukleotid und ohne Verknüpfer (Abbildung 4e,f). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen wird die Gerinnselbildung auch in Proben ohne Ap-

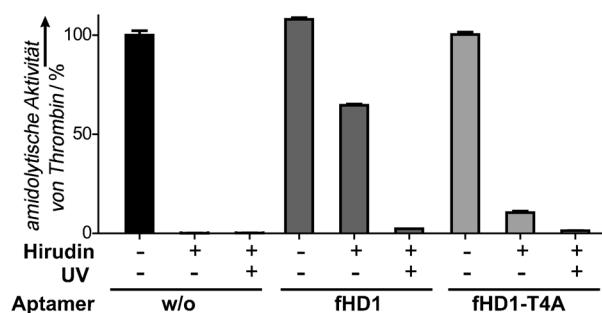


Abbildung 3. Die amidolytische Aktivität von Thrombin wird durch die Spaltung eines fluorogenen Peptidsubstrats gemessen. Der Aptacage von Thrombin [7 nm] wurde mit Hirudin [15 nm] und dem fluorogenen Peptidsubstrat vor und nach Bestrahlung mit einer UV-LED ($\lambda = 356$ nm) inkubiert. Der zeitabhängige Anstieg des Fluoreszenzsignals wird gemessen und auf das Signal in Abwesenheit von Hirudin und LED-UV-Licht normalisiert. Hirudin und LED-UV-Licht wurden wie angegeben eingesetzt. Die Bildung des Aptacages wurde entweder ohne Aptamer (w/o), mit fHD1 oder mit fHD1-T4A wie angegeben durchgeführt. Es ist ein repräsentativer Datensatz gezeigt, die Fehlerbalken geben die intra-experimentelle Varianz an (siehe auch Hintergrundinformationen, Abbildung S7).

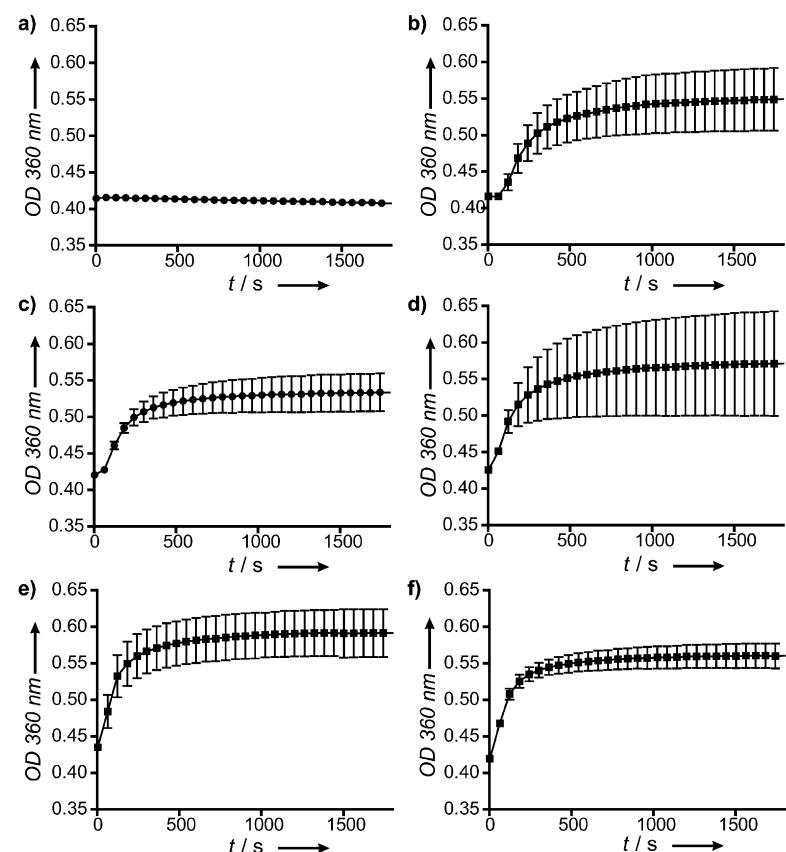


Abbildung 4. Gerinnungsstudien von Plasma. Die Absorption bei 360 nm wird in Abwesenheit des Aptacages von Thrombin in Abhängigkeit von LED-UV-Bestrahlung gemessen. Ein Plasma-Gerinnsel führt zu einer Erhöhung der Absorption, es wurde für 30 min gemessen. a) Thrombin-fHD1-Aptacage vor UV-Bestrahlung, b) Thrombin-fHD1-Aptacage nach UV-Bestrahlung, c) Thrombin-fHD1-T4A-Aptacage vor UV-Bestrahlung, d) Thrombin-fHD1-T4A-Aptacage nach UV-Bestrahlung, e) Thrombin in Reaktionslösung ohne Aptamer und Verknüpfer vor UV-Bestrahlung, f) Thrombin in Reaktionslösung ohne Aptamer und Verknüpfer nach UV-Bestrahlung. Ein repräsentativer Datensatz ist gezeigt. Fehlerbalken kennzeichnen die Abweichung zwischen den Experimenten (siehe auch Hintergrundinformationen).

tamer oder ohne Verknüpfer nicht gehemmt (Abbildungen S9 und S10). Diese Daten zeigen eindeutig, dass der kovalente Komplex zwischen Thrombin und fHD1 die Exosite I maskiert und dass dieses Epitop durch Bestrahlung reaktiviert wird.

In einem letzten Experiment wollten wir die lichtgesteuerte Freisetzung von Thrombin und die darauffolgende Gerinnselbildung visualisieren. Dazu inkubierten wir Fibrinogen mit dem kovalenten Komplex in zwei Glaskapillaren und bestrahlten eine davon in einem kleinen Bereich mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm), während die andere unbestrahlt blieb. Wir zeichneten die Gerinnselbildung durch Lichtmikroskopie (Hintergrundinformationen Movie S1) sowie ein repräsentatives Bild vor (Abbildung 5a) und nach Bestrahlung (Abbildung 5b) auf.

Zusammenfassend haben wir eine neue Caging-Methode vorgestellt, die die selektive Maskierung von Proteindomänen ermöglicht. Wir haben die Synthese eines Aptamer-basierten Reagens beschrieben, welches nach spezifischer Interaktion mit seinem Zielprotein einen stabilen Komplex bildet. Bestrahlung dieses Komplexes mit Licht stellt das aktive Protein wieder her. Dieser „Apta-Caging“-Ansatz kann für jedes Zielprotein angewendet werden, für welches Aptamere existieren oder generiert werden können. Aptamer-gesteuerte Chemie hat sich kürzlich als äußerst geeignet für die spezifische Maskierung von reaktiven Gruppen von Aminoglykosiden herausgestellt, welches die spezifische Modifikation bestimmter Positionen ermöglicht.^[12] In dieser Arbeit verfolgten wir einen anderen Ansatz, indem wir supramolekulare Chemie anwendeten, um einen kovalenten Komplex zu generieren, welcher orts- und zeitaufgelöst gespalten werden kann. Die Verwendung von Thrombin hat nicht nur Modellcharakter, sondern ermöglicht auch eine Vielzahl an biomedizinischen Anwendungen. Lokal induzierte Blutgerinnung kann ein sehr potentes Werkzeug zur Einschränkung der Blutzufuhr von Tumoren oder aber zur Unterbindung von unkontrollierten Blutungen in Notfall-Situationen sein. Aktivierbares Thrombin könnte gegenüber

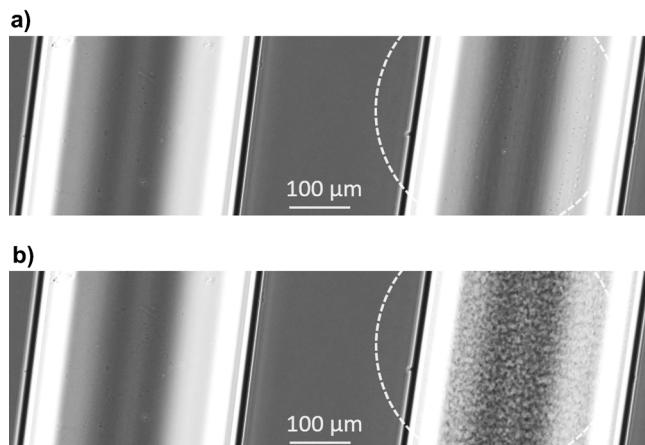


Abbildung 5. Mikroskopiebilder der Gerinnselbildung in Glaskapillaren a) vor und b) 28 min nach UV-Bestrahlung mit einer UV-Hg-Lampe, Bestrahlungszeit 1 min ($\lambda = 365$ nm). Beide Kapillaren sind mit 8 mg mL^{-1} Fibrinogen und 0.1 µg mL^{-1} Thrombin-Apta-Cage gefüllt. Die weiß gestrichelten Kreise definieren den Bestrahlungsbereich.

dem Einsatz hämostatischer Mittel, wie rekombinanter aktiver Faktor VII, von Vorteil sein, da es unerwünschte Nebeneffekte wie lebensbedrohliche thromboembolische Komplikationen minimiert. Zukünftige Experimente mit für In-vivo-Anwendungen geeigneten photospaltbaren Schutzgruppen werden zeigen, ob dieser Ansatz auf patientenrelevante klinische Bedingungen übertragen werden kann. Außerdem wird der hier beschriebene Ansatz Einfluss auf die synthetische und systematische Biologie haben, indem er dort zur Maskierung und Freigabe von Proteindomänen verwendet werden wird, welche zelluläre Netzwerke und Kreisläufe kontrollieren.

Eingegangen am 31. Juli 2013,
veränderte Fassung am 30. August 2013
Online veröffentlicht am 14. Oktober 2013

Stichwörter: Aptamere · Caging · Photoaktivierung · Supramolekulare Chemie · Thrombin

- [1] a) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; b) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; c) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444; d) T. Drepper, U. Krauss, S. M. zu Berstenhorst, J. Pietruszka, K. E. Jaeger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 23–40; e) U. Krauss, T. Drepper, K. E. Jaeger, *Chemistry* **2011**, *17*, 2552–2560; f) H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; g) R. H. Kramer, D. L. Fortin, D. Trauner, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2009**, *19*, 544–552; h) G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628; i) W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25–35.
- [2] a) L. Gardner, A. Deiters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 292–299; b) E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 769–772; c) C. Chou, A. Deiters, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6971–6974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6839–6842.
- [3] L. Bédouet, H. Adenier, S. Pulvin, C. Bedel-Cloutour, D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 939–944.
- [4] J. A. Huntington, *J. Thromb. Haemostasis* **2005**, *3*, 1861–1872.
- [5] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 537–550.
- [6] a) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566; b) I. R. Krauss, A. Merlini, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella, F. Sica, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 8119–8128; c) S. M. Nimjee, S. Oney, Z. Volovyk, K. M. Bompiani, S. B. Long, M. Hoffman, B. A. Sullenger, *RNA* **2009**, *15*, 2105–2111; d) G. Mayer, F. Rohrbach, B. Pötzsch, J. Müller, *Haemostaseologie* **2011**, *31*, 258–263.
- [7] M. C. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [8] a) Y. Li, L. Guo, F. Zhang, Z. Zhang, J. Tang, J. Xie, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2570–2577; b) C. Daniel, F. Melaine, Y. Roupioz, T. Livache, A. Buhot, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40*, 186–192.
- [9] D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688–698.
- [10] V. De Filippis, I. Russo, A. Vindigni, E. Di Cera, S. Salmaso, A. Fontana, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2213–2217.
- [11] A. Rodrigues-Correia, M. B. Koeppl, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 441–447.
- [12] A. A. Bastian, A. Marcozzi, A. Herrmann, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 789–793.