



Hybrid-Protein-Zymogene durch Selbstorganisation dendritischer Schutzgruppen**

David Y. W. Ng, Matthias Arzt, Yuzhou Wu, Seah Ling Kuan, Markus Lamla und Tanja Weil*

Abstract: Die Steuerung der Aktivität und Zellaufnahme in Abhängigkeit von physiologischen Veränderungen stellt eine wesentliche Eigenschaft von intelligenten Proteintherapeutika dar. Wir beschreiben die Selbstorganisation einer pH-schaltbaren PAMAM-Dendrimerhülle auf der Oberfläche von katalytisch aktiven Enzymen (Trypsin, Papain, DNase I), die unter Bildung eines Dendrimer-Enzym-Komplexes als supramolekulare Schutzgruppe wirkt. Die Selbstorganisation basiert auf einer pH-abhängigen Wechselwirkung, die es dem Komplex ermöglicht, reversibel auf pH-Änderungen im Bereich von pH 5.0 bis 7.4 zu reagieren. In Gegenwart der Dendrimerhülle ist das Enzym inaktiv, während unter sauren Bedingungen durch Abspaltung der Dendrimerhülle die katalytische Aktivität vollständig wiederhergestellt wird. Im Unterschied zu den nativen Proteasen werden die Hybrid-Protein-Zymogene effizient in A549-Zellen aufgenommen. In den sauren Zellkompartimenten erfolgt die programmierte Freisetzung der Proteasen, welche zelltoxisch wirken.

Die Verwendung schaltbarer Schutzgruppen, die eine genaue Kontrolle über die Stabilität, Freisetzung und Proteinaktivität bieten, stellt einen attraktiven Ansatz dar, um proteinbasierte Wirkstoffe mit einer möglicherweise hohen therapeutischen Breite herzustellen.^[1] In der Natur dienen peptidische Schutzgruppen dazu, so genannte Zymogene, d. h. Vorläufer-Proteine von Proteasen wie Trypsin, Pepsin oder Kaspasen, zu erzeugen, die einen effizienten intra/extrazellulären Transport ermöglichen sowie einen unkontrollierten zellulären Abbau verhindern.^[2] Die Einführung synthetischer makromolekularer Schutzgruppen stellt eine zeitgemäße chemische Perspektive dar, um die Funktion eines Enzyms durch sterische Abschirmung der Proteinoberfläche in Abhängigkeit von externen Reizen, z. B. dem pH-Wert, zu schalten.

Proteasen spielen eine zentrale Rolle bei der Krebsprogression und Metastasenbildung, wobei sie die Proliferation,

Apoptose, Differenzierung von Zellen sowie die Umgehung des Immunsystems regulieren.^[3] Der Transport von Proteasen ist sowohl für die Aufklärung ihrer Funktion im Organismus als auch für die Entwicklung neuartiger Proteintherapeutika von großem Interesse. Daher stellt die Entwicklung einer Synthesestrategie, die auf einer schaltbaren Abschirmung und Freisetzung ähnlich der Biosynthese von Zymogenen basiert, ein lohnenswertes Ziel dar. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die immanente, proteolytische Aktivität von Proteasen die Verwendung der meisten klassischen biologischen Transportsysteme, z. B. von zellgängigen Peptide oder Fusionsproteinen, unterbindet.

Die chemische Veränderung katalytisch aktiver Proteasen zum Einbau von Funktionalitäten, die sich durch äußere Reize schalten lassen, wird durch die häufig beobachtete Denaturierung der Proteine, ihrer Inaktivierung sowie einer verminderten Chemo-selektivität erschwert, sodass oft nur unter sehr milden, bioorthogonalen Bedingungen chemische Reaktionen an Proteinen durchgeführt werden können.^[4] Üblicherweise werden ortsspezifische Veränderungen auf der Proteinoberfläche durch Mutation einzelner Aminosäurereste eingefügt. Auf diesem Weg konnten bislang thermoresponsive sterische Anker eingebaut werden, die z. B. als temperaturabhängige Schalter wirkten.^[5–7] Dieses Konzept wurde weiterhin für die Entwicklung von Protein-Polymer-Konjugaten angewendet, die mithilfe von radikalischer Atomtransferpolymerisation (ATRP) aufgebaut wurden.^[8,9] Allerdings sind ortsspezifische Mutationen bei Proteinen, die ganz unterschiedlichen Enzymklassen angehören, aufgrund der sehr unterschiedlichen Aktivitäten und Stabilitäten oftmals nur schwer planbar. Werden metallkatalysierte Reaktionen verwendet, dann kann die Adsorption von Metallverunreinigungen oftmals zu Problemen während der Produktreinigung führen. Daher ist die Herstellung und Anwendung von chemisch veränderten Enzymen immer noch wenig verstanden und unterentwickelt.

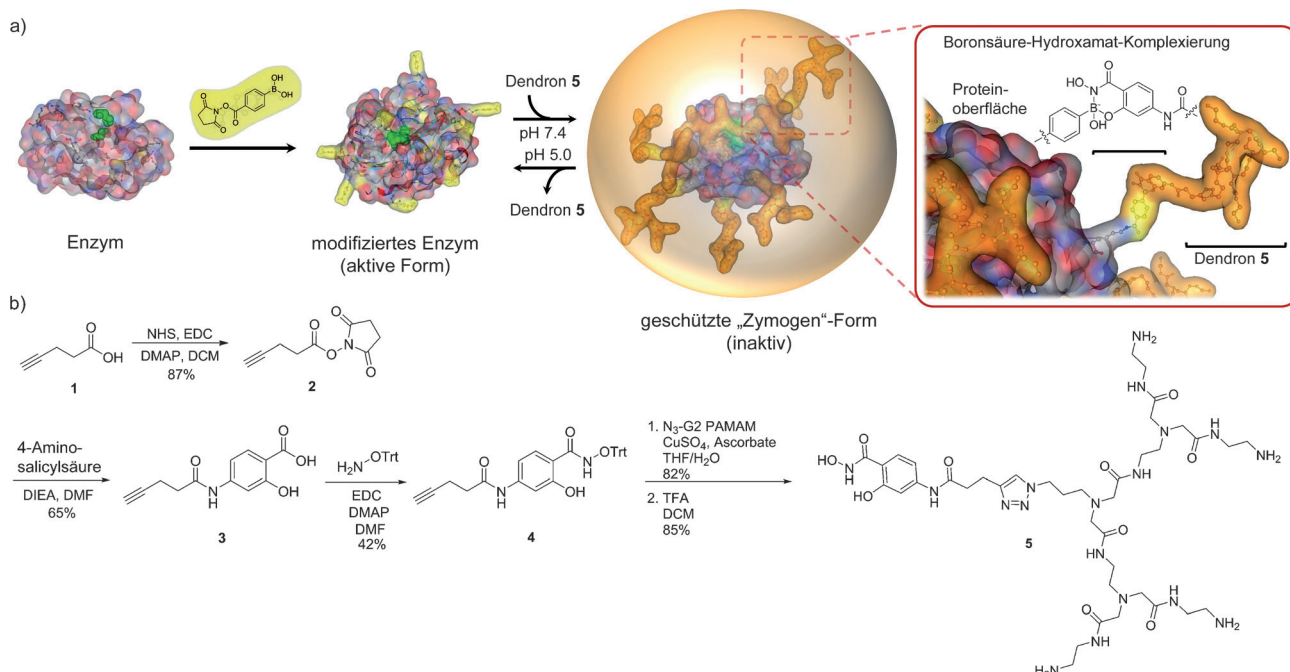
Aus diesem Grund haben makromolekulare Schutzgruppen, die zur Schützung und Entschützung der katalytischen Zentren metallfreie Reaktionen unter physiologischen Bedingungen nutzen, einen deutlichen Vorteil gegenüber den bisher bekannten Systemen. Inspiriert von den neuesten Erkenntnissen der Verwendung von Aptameren^[10] als makromolekulare Schutzgruppen, berichten wir hier über den Gebrauch eines pH-schaltbaren, dendritischen Kern-Schale-Systems, das sich in einer einfachen und bioorthogonalen Art und Weise zu einem supramolekularen Dendrimer-Enzym-Komplex zusammenlagert. Aufgrund ihrer verzweigten Struktur liefern kleine definierte Dendrimersegmente (sogenannte Dendrone) ein großes Volumen-Molekulargewicht-Verhältnis und können daher idealerweise als sterisch an-

[*] D. Y. W. Ng, M. Arzt, Y. Wu, Dr. S. L. Kuan, M. Lamla, Prof. Dr. T. Weil
Institut für Organische Chemie III, Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm (Deutschland)
E-Mail: tanja.weil@uni-ulm.de

D. Y. W. Ng, Prof. Dr. T. Weil
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des SFB 625, vom BMBF, Projekt Biotechnologie 2020+, und durch den ERC Synergy Grant 319130-BioQ gefördert. S. L. K. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308533> zu finden.



Schema 1. a) Synthese und supramolekulare dendritische Selbstorganisation zur Bildung von Hybridzymogenen. Die katalytischen Zentren sind grün markiert. b) Synthese der dendronisierten Salicylhydroxamsäure.

spruchsvolle Schutzgruppen Verwendung finden.^[11] Zusätzlich ermöglichen Dendrone mit geeigneten Oberflächenfunktionalitäten^[13] attraktive pharmakologische Eigenschaften wie eine erhöhte Zellaufnahme und Wirksamkeit.^[12] Basierend auf der säurelabilen Boronsäure-Salicylhydroxamat-Ligation können Dendrone bei leicht alkalischem pH-Wert an die Proteinoberfläche gebunden werden, wodurch ein pH-schaltbares Dendrimer-Enzym-Hybridmakromolekül entsteht (Schema 1a), das als synthetisches Zymogen (ein so genanntes Hybrid-Protein-Zymogen) wirkt. Um die große Anwendungsbreite dieser Aggregationsstrategie aufzuzeigen, haben wir als Beispielenzyme katalytisch wichtige Proteasen und Nukleasen wie Trypsin, Papain und DNase I ausgewählt, von denen jede eine Enzymklasse mit großer therapeutischer Bedeutung repräsentiert.^[3]

Die Synthese der sterisch anspruchsvollen, dendritischen Schutzgruppe basiert auf dem difunktionellen Poly(amido)amin(PAMAM)-Dendron der zweiten Generation, das eine einzelne Azidogruppe und vier primäre Amingruppen trägt (N₃-G2-PAMAM, Schema 1b).^[14] Über die Azidogruppe konnte in einer kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition eine Salicylhydroxamsäure-Einheit eingeführt werden. Salicylhydroxamate reagieren mit Arylboronsäuren in einer „Klick“-Reaktion unter Bildung stabiler Boronatkomplexe.^[15] Die Kinetik und Orthogonalität dieser schnellen Komplexbildung wurden in der Vergangenheit bereits zur effizienten Peptidligation verwendet.^[16] Um die Kernfunktionalität des Dendrons aufzubauen, wurde 4-Pentinsäure mit N-Hydroxysuccinimid aktiviert und dann mit 4-Aminosalicylsäure verknüpft, wobei **3** erhalten wurde. Die Kondensation der Ethynylsalicylsäure **3** mit einem Überschuss an Triethoxyamin ergab **4** in mäßigen Ausbeuten. Die resultierende geschützte Ethynylhydroxamsäure wurde in einer kupferka-

talysierten Cycloaddition mit dem Boc-geschützten Azido-G2-PAMAM-Dendron umgesetzt, und die unmittelbare Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) in Gegenwart von Triisopropylsilan als Radikalfänger lieferte das Endprodukt **5** als TFA-Salz.

Die nativen Enzyme Trypsin, Papain und DNase I präsentieren auf ihrer Oberfläche zahlreiche Lysinreste, deren primäre Aminogruppen über Kondensationsreaktionen mit zuvor aktivierter 4-Carboxyphenylboronsäure umgesetzt werden können (Schema 1a). Dieser Ansatz ist besonders attraktiv, da die katalytischen Zentren der Proteasen keine Lysinreste aufweisen, sodass die katalytische Aktivität auch nach der Einführung der Boronsäuren erhalten bleiben sollte.^[17–19] Die entsprechend chemisch modifizierten Proteine wurden mittels Ultrafiltration gereinigt und anschließend mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert (Abbildung S1). Trypsin, Papain und DNase I enthalten eine jeweils unterschiedliche Zahl an lösungsmittelzugänglichen Lysinresten, sodass durchschnittlich jeweils zehn (Trypsin, Papain) bzw. vier (DNase I) Boronsäuregruppen eingeführt werden konnten. Es wurde ein Modifizierungsgrad von 90 % für Trypsin und Papain erhalten, wohingegen nur 50 % der exponierten Aminogruppen der DNase I funktionalisiert werden konnten. Die anschließende Überprüfung der katalytischen Aktivität der boronsäurehaltigen Proteasen ergab, dass > 80 % der Aktivität der nativen Proteine erhalten blieb (Abbildung S2).

Die erfolgreiche Bildung der dendronisierten Proteine konnte über eine auf Alizarinrot S basierende Fluoreszenzuntersuchung nachgewiesen werden. Alizarinrot S komplexiert über seine Catecholgruppe jeweils eine Arylboronsäureeinheit, wodurch ein fluoreszierender Komplex gebildet wird ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$).^[20] Die Abnahme der

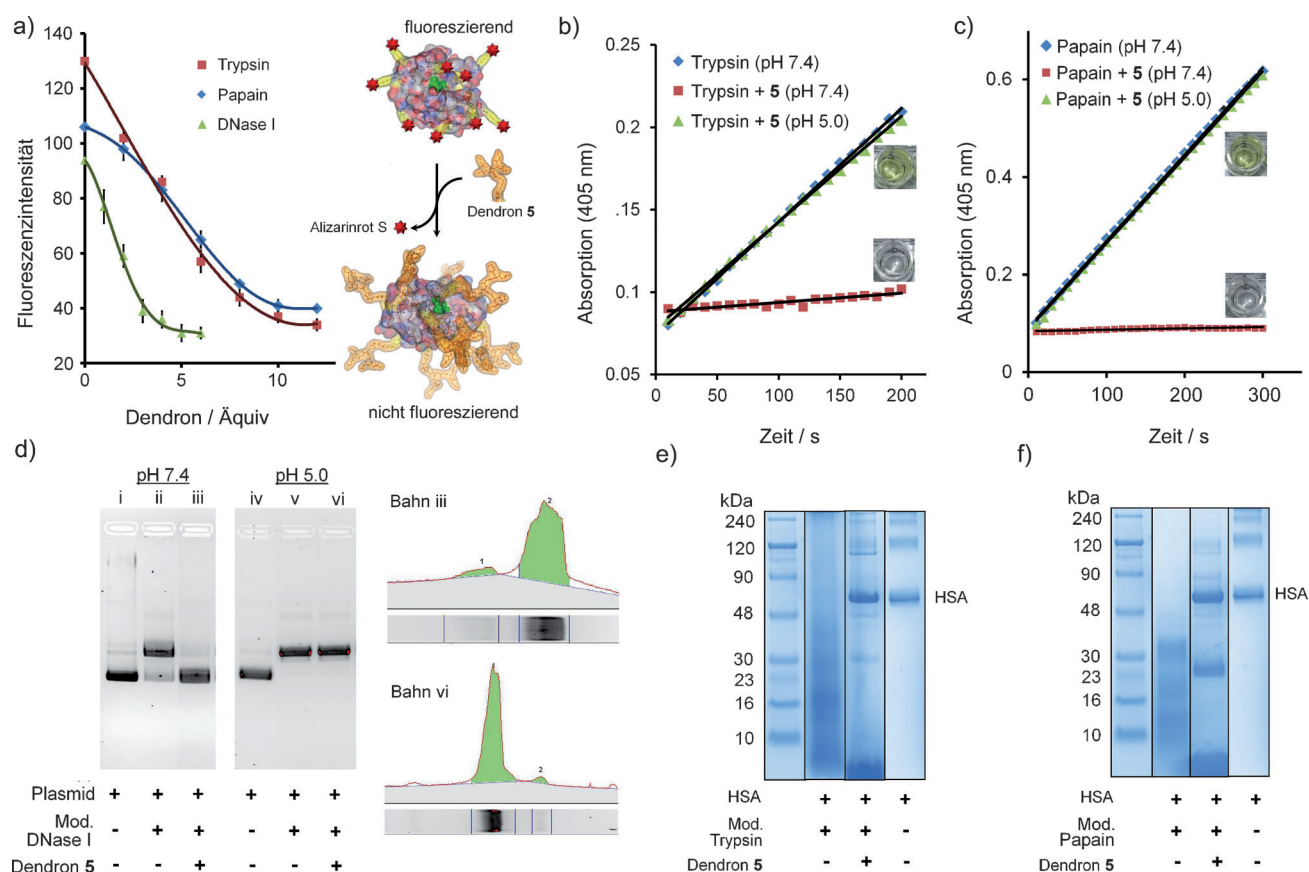


Abbildung 1. a) Fluoreszenztitrationskurven, die die stöchiometrische Substitution des fluoreszierenden Alizarinrot-S-Boronsäure-Komplexes durch Dendron 5 auf jedem Protein widerspiegeln. b),c) Kolorimetrische Enzymkinetiken für das modifizierte Trypsin und Papain basierend auf N_α -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid als molekulares Substrat. d) Agarose-Gelelektrophorese mit SYBRsafe-Färbung. DNA-Fragmente der pUC19-DNA-Plasmide werden nach Einwirkung mit der modifizierten DNase I gebildet. Die Fluoreszenzintensität der Bahnen iii und iv ist im Detail gezeigt. e),f) SDS-PAGE-Analyse des Abbaus von humanem Serumalbumin als makromolekulares Proteinsubstrat in Gegenwart von modifiziertem Trypsin und Papain.

Fluoreszenz korreliert mit der Abspaltung der Alizarinrot-S-Moleküle von der Proteinoberfläche (Abbildung 1a). Die Affinitätskonstanten der Boronsäure-Catechol- und der Boronsäure-Salicylhydroxamat-Komplexe bei pH 7.4 betragen 800 M^{-1} bzw. 17800 M^{-1} .^[16,21] Somit lässt sich die Zahl der Boronsäuregruppen und der gebundenen Dendrone auf jedem Enzymmolekül durch eine fluoreszenzbasierte Titration bestimmen. Zusammenfassend entspricht der Endpunkt der Titration des Dendrons 5 mit dem jeweiligen Protein (10 Äquiv. für Trypsin und Papain, 4 Äquiv. für DNase I) den zuvor durch MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Ergebnissen.

Die Effizienz der dendritischen Abschirmung wurde getestet, indem die proteolytische Aktivität der mit Boronsäure modifizierten Proteasen (Trypsin und Papain) in Gegenwart von N_α -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid als Substrat quantifiziert wurde. Die Dendrone wurden zuerst zu den jeweiligen Proteinen gegeben, und beide Komponenten wurden vor der Analyse bei pH 7.4 inkubiert. Die Aktivität der Hybrid-Protein-Zymogene konnte so auf $<10\%$ reduziert werden, was vermutlich durch die sterische Abschirmung der katalytischen Zentren der beiden Proteasen hervorgerufen wurde (Abbildung 1b,c). Die anschließende Senkung des pH auf 5.0 führte zu einer Abspaltung der Den-

drone, die mittels Ultrafiltration abgetrennt wurden. Anschließend wurde wiederum die Enzymaktivität bei pH 7.4 gemessen. $>90\%$ der Enzymaktivitäten konnten nach der Abspaltung der Dendrone zurückgewonnen werden, was für eine Reversibilität der Boronsäure-Salicylhydroxamat-Bindung spricht. In weiteren Versuchen wurde die Aktivität der dendronisierten Proteasen bei pH 7.4 in Gegenwart von humanem Serumalbumin (HSA) als Substrat und anschließender SDS-PAGE-Analyse untersucht. Die Zugabe des Dendron 5 zu beiden boronsäurefunktionalisierten Proteasen blockierte signifikant deren proteolytische Aktivität, sodass das unverdaute, native HSA (67 kDa) in der Gelelektrophorese deutlich zu erkennen war (Abbildung 1e,f). Danach wurde der pH auf 5 gesenkt, was die Spaltung des HSA zur Folge hatte. Hierdurch konnte die spontane und effiziente Selbstorganisation der dendritischen Schutzhülle nachgewiesen werden (Abbildung S3). Analog wurde die Aktivität der modifizierten DNase I gegen ein 200-Basenpaar-Plasmid (pUC19) getestet, wobei die Zersetzung der reinen und kompakten DNA in Gegenwart der Dendrone 5 bei pH 7.4 effektiv blockiert wurde, während die DNase bei pH 5.0 ihre Aktivität wiedererlangte und somit in der Lage war, die pUC19-DNA abzubauen (Abbildung 1d).

Die Bioorthogonalität und Selbstorganisation der Dendrone auf der Proteinoberfläche wurde ferner mittels Fluoreszenzpolarisation untersucht. Die Wechselwirkung der boronsäuremodifizierten Proteasen mit dem Dendron **5** zeigte die erwartete Größenzunahme in mit Serum angereichertem DMEM-Medium (Abbildung S4). Es konnten keine größeren Aggregate der dendronisierten Proteasen^[22] nachgewiesen werden, was auf eine unspezifische Wechselwirkung mit anderen Proteinen des DMEM-Mediums gedeutet hätte, und die hohe Spezifität der Boronsäure-Salicylhydroxamat-Wechselwirkung stimmt somit mit früheren Berichten überein.^[16]

Neben der pH-schaltbaren Selbstorganisation und Freisetzung der modifizierten Enzyme ermöglichen die positiv geladenen Dendrone weiterhin aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der positiv geladenen Dendrimershülle eine Aufnahme in Zellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PAMAM-Dendrimere über eine Clathrin-vermittelte Endozytose von Zellen aufgenommen werden, während die intrazelluläre Freisetzung über den bereits beschriebenen Protonenschwamm-Effekt erfolgt.^[14,23] Die dendronisierten Proteasen weisen ebenfalls eine effiziente, durch die Anwesenheit der Dendrone bedingte Zellaufnahme auf, die mithilfe von konfokaler Lasermikroskopie verfolgt werden konnte (Abbildung 2). Da die Abspaltung der dendritischen Hülle von einem niedrigen intrazellulären pH abhängt, war die Lokalisierung dieser Verbindungen in sauren Kompartimenten für

die Freisetzung der aktiven Proteasen notwendig. Kolokalisierungsexperimente unter Verwendung des LysoTracker, der nur in den sauren Organellen der Zelle emittiert, zeigten, dass die dendronisierten Proteine tatsächlich in den intrazellulären Kompartimenten lokalisiert waren. Dagegen wiesen die nichtdendronisierten Proteine nur eine minimale Zellaufnahme auf.

Die Dendronhülle sorgt für eine effiziente Abschirmung der Enzyme und ermöglicht ferner eine Aufnahme in Zellen. In den sauren Kompartimenten der Zelle werden die Dendrone schließlich abgespalten und die katalytisch aktiven Proteasen freigesetzt, die dann direkt den proteolytischen Abbau und somit den Zelltod auslösen. Bereits nach nur drei Stunden Inkubation von A549-Zellen mit den dendronisierten Proteasen bei 37°C und 5% CO₂ konnte ein deutlicher Einfluss auf die Zellvitalität nachgewiesen werden. In Kontrollexperimenten wurden die entsprechenden nativen Proteasen sowie das bereits publizierte HSA-Derivat G2-HSA verwendet, das zahlreiche kovalent verknüpfte Dendrone **5** aufweist (Abbildung 3). Sowohl die kovalent als auch die nichtkovalent verknüpften HSA-Derivate zeigten selbst bei sehr viel höheren Konzentrationen keine Zelltoxizität, sodass die beobachtete Zytotoxizität der Hybrid-Protein-Zymogene auf der proteolytischen Wirkung der untersuchten Proteasen beruht. Somit spielt die dendritische Hülle einerseits eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport, andererseits hat sie eine abschirmende Wirkung, worüber sich die katalytische Aktivität steuern lässt.

Hier wurden sterisch anspruchsvolle, supramolekulare dendritische Schutzgruppen synthetisiert, die über die spezifische und bioorthogonale Wechselwirkung zwischen Boronsäuren und Salicylhydroxamsäuren auf pH-Änderungen zwischen 7.4 und 5.0 spontan reagieren. Die dendritischen Schutzgruppen ermöglichen insbesondere die reversible Abschirmung ausgedehnter Substratbindungsstellen auf der Proteinoberfläche. Zusätzlich verleiht die dendritische PAMAM-Hülle die Fähigkeit zur effizienten Membrantranslokation und zur Aufnahme in saure intrazelluläre Zellkompartimente. Diese Eigenschaften sind von großer Bedeutung, da die Selbstorganisation

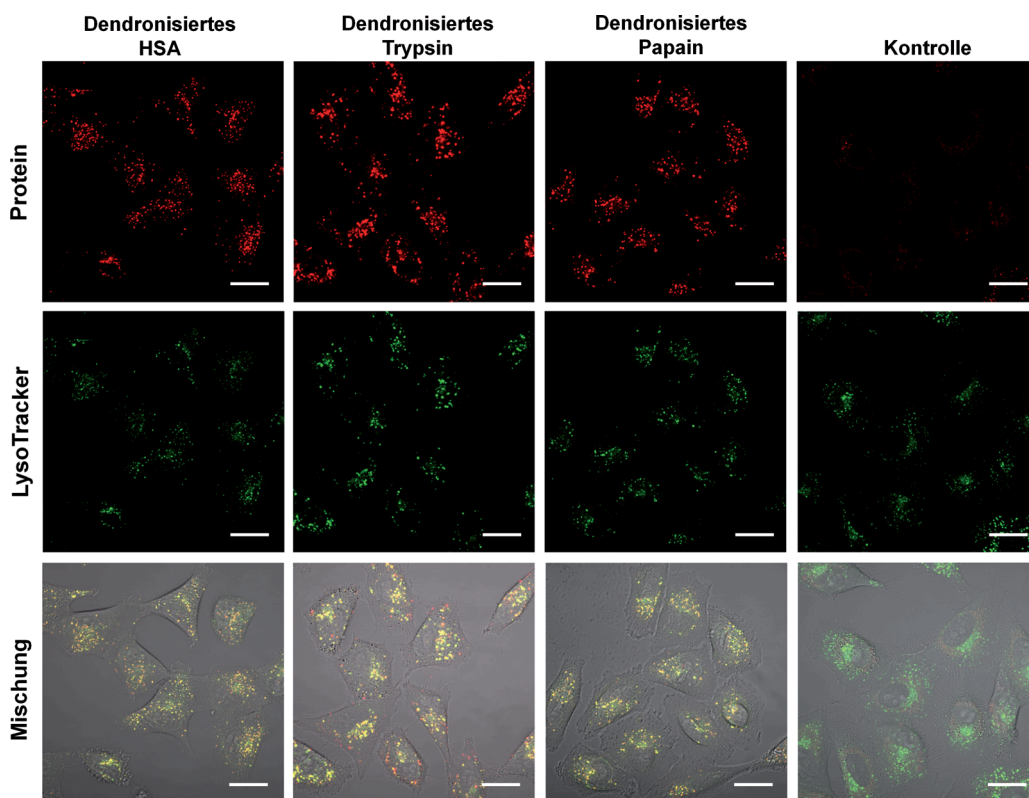


Abbildung 2. Konfokale Lasermikroskopie mit A549-Zelllinien. Kolokalisierung der dendronisierten Proteine (mit Daylight 647 konjugierte Proteine) nach Färbung mit LysoTracker. Die Kontrollbeobachtung ist repräsentativ für nichtdendronisiertes HSA, Trypsin und Papain. Maßstab: 20 µm.

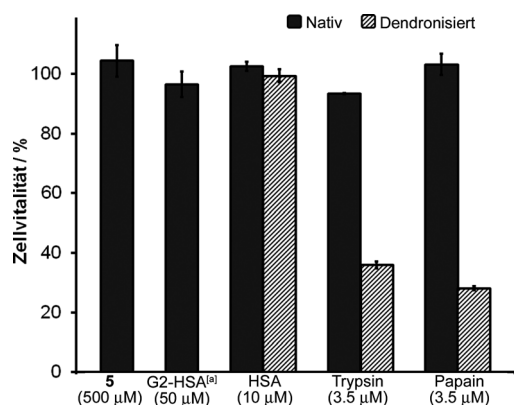


Abbildung 3. Vergleich der Zytotoxizität der nativen Proteasen sowie den PAMAM-Dendrimer-Protease-Komplexen. Die Zellvitalität wurde mit den Blindkontrollen verglichen. Die Daten sind mit arithmetischem Mittelwert $\pm$ SEM angegeben, $n=3$. [a] G2-HSA wurde wie bereits beschrieben durch kovalente Bindung von 32 G2-PAMAM-Dendronen auf der Oberfläche von HSA hergestellt.^[22]

der dendritischen Hülle unter physiologischen Bedingungen stattfindet, was eine Stabilität bei nahezu neutralem pH und eine Freisetzung in den sauren intrazellulären Lysosomen gewährleistet. Die in der Zelle freigesetzten, katalytisch aktiven Proteasen verfügen ferner über eine signifikante Zelltoxizität. Die hier vorgestellte, integrierte bioorthogonale Selbstorganisation ermöglicht ein einzigartiges Design von hocheffizienten Hybrid-Protein-Zymogenen, die als intelligente Proteintherapeutika ein großes Potenzial für biomedizinische Anwendungen besitzen.

Eingegangen am 30. September 2013,
veränderte Fassung am 5. November 2013

Stichwörter: Dendrimere · Enzyme · Supramolekulare Chemie

- [2] A. V. Karginov, F. Ding, P. Kota, N. V. Dokholyan, K. M. Hahn, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 743.
- [3] C. López-Otín, L. M. Matrisian, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 800.
- [4] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974.
- [5] Z. Ding, C. J. Long, Y. Hayashi, E. V. Bulmus, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 395.
- [6] P. De, M. Li, S. R. Gondi, B. S. Sumerlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11288.
- [7] P. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G. Ghen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature* **1995**, *378*, 472.
- [8] W. Gao, W. Liu, T. Christensen, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16432.
- [9] M. Yan, J. Du, Z. Gu, M. Liang, Y. Hu, W. Zhang, S. Priceman, L. Wu, Z. H. Zhou, Z. Liu, T. Segura, Y. Tang, Y. Lu, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 48.
- [10] A. A. Bastian, A. Marcozzi, A. Herrmann, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 789.
- [11] D. Astruc, E. Boisselier, C. Ornelas, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857.
- [12] S. K. Hamilton, E. Harth, *ACS Nano* **2009**, *3*, 402.
- [13] L. Albertazzi, B. Storti, L. Marchetti, F. Beltram, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18158.
- [14] D. Y. W. Ng, J. Fahrer, Y. Wu, K. Eisele, S. L. Kuan, H. Barth, T. Weil, *Adv. Healthcare. Mater.* **2013**, DOI: 10.1002/adhm.201200419.
- [15] M. L. Stolz, C. Ahlem, K. A. Hughes, R. J. Kaiser, E. A. Kesicki, G. Li, K. P. Lund, S. M. Torkelson, J. P. Wiley, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 229.
- [16] S. B. Y. Shin, R. D. Almeida, G. Gerona-Navarro, C. Bracken, S. R. Jaffrey, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1171.
- [17] C. Q. Pan, J. S. Umer, A. Herzka, R. A. Lazarus, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 628.
- [18] P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **1988**, *332*, 564.
- [19] H. A. Chapman, R. J. Riese, G.-P. Shi, *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, *59*, 63.
- [20] G. Springsteen, B. Wang, *Chem. Commun.* **2001**, 1608.
- [21] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291.
- [22] S. L. Kuan, B. Stöckle, J. Reichenwallner, D. Y. W. Ng, Y. Wu, M. Doroshenko, K. Koynov, D. Hinderberger, K. Müllen, T. Weil, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 367.
- [23] L. Albertazzi, M. Serresi, A. Albanese, F. Beltram, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 680.

[1] P. Plainkum, S. M. Fuchs, S. Wiyakrutta, R. T. Raines, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 115.