

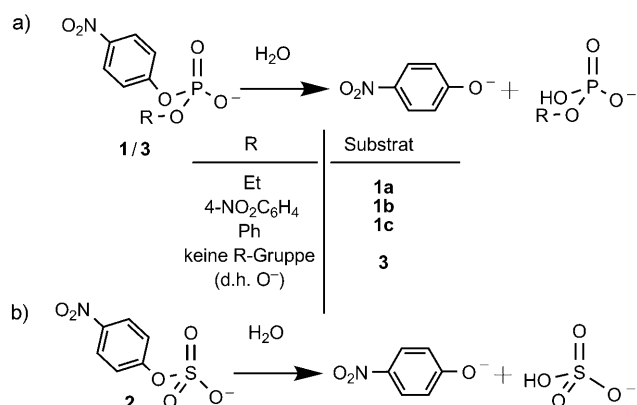
Effiziente katalytische Promiskuität für chemisch unterschiedliche Reaktionen**

Ann C. Babbie, Subhajit Bandyopadhyay, Luis F. Olguin und Florian Hollfelder*

Die außergewöhnliche Effizienz von Enzymkatalysatoren mit Reaktionsbeschleunigungen bis zu 10^{26} (berechnet als $(k_{\text{cat}}/K_m)/k_2$)^[1] wird in Lehrbüchern^[2] normalerweise mit besonderer Spezifität für einen Übergangszustand verknüpft. Vor diesem Hintergrund ist es bemerkenswert, dass Enzyme die effiziente Katalyse ihrer ursprünglichen Reaktion auch auf andere Prozesse, in denen andere Bindungen gebildet und gebrochen werden, ausdehnen können. Dieses Phänomen wird als katalytische Promiskuität bezeichnet^[3–6] und soll eine Rolle in der divergenten Enzymevolution spielen: Die Duplizierung eines Gens führt unverzüglich zu einem selektiven Vorteil, wenn die Genkopie bereits ein Protein exprimiert, das durch seine promiske Aktivität sofort eine neue Funktion einnehmen kann.^[6–9] In den meisten Fällen sind die katalytischen Leistungen (catalytic proficiencies), $(k_{\text{cat}}/K_m)/k_2$,^[10] für die promiske Aktivität deutlich geringer als für die ursprüngliche: in keinem Fall mehr als 10^{15} und normalerweise weniger als 10^{13} .^[6,11] Wir beschreiben hier eine promiske katalytische Aktivität der Arylsulfatase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAS), die einen ungewöhnlich hohen Wert für $(k_{\text{cat}}/K_m)/k_2$ von 10^{18} aufweist. Eine Reihe von experimentellen Befunden zeigt, dass PAS in vivo eine Rolle als Sulfatase spielt: PAS hydrolysiert mehrere aromatische Sulfoester,^[12] die Expression von PAS wird unter Sulfatentzug induziert und in der Gegenwart von anorganischem Phosphat herunterregelt.^[12,13] Das zu PAS gehörige Gen (*atsA*) ist Teil eines Genclusters, der auch für ein Sulfattransportsystem kodiert.^[13] Eine promiske hydrolytische Aktivität gegen Phosphomonoester ist bereits beschrieben worden,^[14] aber diese Reaktion wird sehr viel weniger effizient katalysiert als die Hydrolyse von Sulfoestern. Die hier beschriebene promiske Diesteraseaktivität übersteigt alle bisher bekannten

promisken Aktivitäten und ist vergleichbar mit der katalytischen Leistung der nativen Sulfataseaktivität (4×10^{18}),^[14] was die Annahme, dass eine effiziente Katalyse eine Spezialisierung bedingt, infrage stellt.

PAS wurde in *E. coli* exprimiert und in drei Schritten gereinigt.^[14] Das aufgereinigte Enzym erscheint als einzige Bande in der SDS-PAGE und hydrolysiert den Phosphodi-



Schema 1. PAS hydrolysiert a) Phosphodiester **1**, Phosphomonoester **3** und b) Sulfomonoester **2**.

ester **1** (Schema 1) unter Freisetzung des gelben Reaktionsproduktes 4-Nitrophenolat, das leicht detektiert werden kann, sodass der Reaktionsverlauf spektrophotometrisch verfolgt werden kann. Die Reaktion des Diesters **1b** folgt einer Sättigungskinetik und wird durch die Michaelis-Menten-Parameter k_{cat} (0.55 s^{-1}) und K_m ($2.2 \mu\text{M}$) beschrieben, wobei jedes aktive Zentrum mehrfach genutzt wird (Abbildung 1). Die kinetischen Parameter aller PAS-katalysierten Reaktionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Durch eine Reihe von Experimenten wurde sichergestellt, dass die beobachtete Phosphodiesteraseaktivität nicht von einer Enzymkontamination herrührt, sondern eine tatsächliche Eigenschaft von PAS ist. Während der Aufreinigung von PAS eluiert die Diesteraseaktivität von drei verschiedenen Trennsäulen zusammen mit der Sulfatase- wie auch mit der kürzlich beschriebenen Phosphomonoesteraseaktivität,^[14] wobei das Verhältnis aller drei Aktivitäten konstant ist (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Ein Phosphodiestersubstrat ist ein kompetitiver Inhibitor der eigentlichen Sulfataseaktivität von PAS (Abbildung S2 und S3 in den Hintergrundinformationen), was darauf schließen lässt, dass die Katalyse für beide Reaktionen im selben aktiven Zentrum stattfindet. Eine Mutante, in der das reaktive Nucleophil des

[*] A. C. Babbie, Dr. S. Bandyopadhyay,^[†] Dr. L. F. Olguin, Dr. F. Hollfelder
Department of Biochemistry, University of Cambridge
Cambridge CB2 1GA (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-766-002
E-Mail: fh111@cam.ac.uk
Homepage: <http://www.bioc.cam.ac.uk/~fh111>

[†] Gegenwärtige Adresse: Indian Institute of Science Education & Research (IISER), HC—Sector III, Salt Lake City, Kolkata 700106 (Indien)

[**] Wir danken dem EPSRC und dem EU Network „ENDIRPRO“ für finanzielle Unterstützung und Tony Kirby und anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hollfelder für kritische Durchsicht des Manuskriptes. A.B. wurde durch ein CASE-Stipendium des BBSRC und von GlaxoSmithKline unterstützt. F.H. ist ein Young Investigator des ERC.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200805843> zu finden.

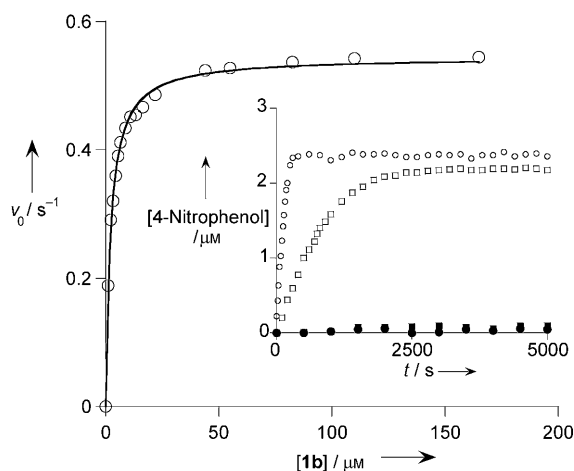


Abbildung 1. Die promiske Phosphodiesteraseaktivität von PAS. Ein typisches Michaelis-Menten-Diagramm, in dem die Anfangsgeschwindigkeit v_0 für den Phosphodiester **1b** in Abhängigkeit von dessen Konzentration dargestellt ist ([PAS] = 15 nM; [1b] = 1.1–165 µM). Einschub: Der Reaktionsverlauf der Reaktion von PAS mit dem Phosphodiester **1b** (□; [PAS] = 10 nM, [1b] = 2 µM) zeigt mehr als 200 Reaktionszyklen pro aktivem Zentrum. Zum Vergleich sind die entsprechende Reaktion des Sulfomonoesters **2** (○; [PAS] = 0.5 nM, [2] = 2.3 µM) und die jeweiligen unkatalysierten Reaktionen (■, ●) dargestellt. Reaktionsbedingungen: 25 °C, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mg mL⁻¹ Rinderserumalbumin (BSA), 0.5 M NaCl. Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Tabelle 1: Kinetische Parameter der Hydrolyse der Phosphodiester **1**, des Sulfomonoesters **2** und des Phosphomonoesters **3**.^[a]

Substrat	K_m [µM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]	$(k_{cat}/K_m)/k_2$ ^[b]
1a	617 ± 61	0.073 ± 0.004	119 ± 7	6.5 × 10 ¹⁵
1b	2.2 ± 0.3	0.55 ± 0.02	(2.5 ± 0.3) × 10 ⁵	1.3 × 10 ¹⁸
1c	25 ± 2	0.19 ± 0.01	(7.6 ± 0.5) × 10 ³	
2 ^[c]	0.29 ± 0.03	14.2 ± 0.6	(4.9 ± 0.8) × 10 ⁷	4.3 × 10 ¹⁸
3 ^[c]	29.1 ± 2.0	0.023 ± 0.001	790 ± 58	1.6 × 10 ¹³

[a] Reaktionsbedingungen: 25 °C, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mg mL⁻¹ BSA,^[15] 0.5 M NaCl (für **1a–c**). [b] Für hydrolytische Reaktionen wurde die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (k_2) der unkatalysierten Reaktion als $k_{uncat}/55$ M berechnet. Die Werte von k_{uncat} (in s⁻¹) bei 25 °C, pH 8.0^[11,14] sind: 1.0×10^{-12} (**1a**), 1.1×10^{-11} (**1b**), 6.2×10^{-10} (**2**), 2.7×10^{-9} (**3**). [c] Die Parameter für die Hydrolyse von Sulfo- (**2**) und Phosphomonoestern^[14] (**3**) sind zum Vergleich hinzugefügt.

Wildtyps durch Serin substituiert ist (C51S; siehe Schema 2) hat k_{cat} -Werte für die Reaktionen des Phosphodiester **1b** und des Sulfomonoesters **2**,^[14] die um Faktoren von $> 10^4$ bzw. 10^3 unter denen des Wildtyps liegen (Tabelle 2).^[16]

Katalytische Promiskuität ist eine bekannte Eigenschaft von PAS, die Phosphomonoester (z. B. **3**) hydrolysieren kann,

Tabelle 2: Kinetische Parameter der C51S-Mutante von PAS.^[a]

Substrat	K_m [µM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]
1b	3.7 ± 0.3	($< 5.5 \pm 0.1$) × 10 ⁻⁵	$< 15 \pm 1$
2 ^[b]	0.25 ± 0.06	(5.4 ± 0.2) × 10 ⁻³	(2.1 ± 0.5) × 10 ⁴

[a] Reaktionsbedingungen: 25 °C, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mg mL⁻¹ BSA, 0.5 M NaCl (für **1b**). [b] Die Parameter für die Hydrolyse des Sulfomonoesters **2**^[14] sind zum Vergleich hinzugefügt.

wenn auch mit geringerer Effizienz als Sulfomonoester (z. B. **2**).^[14] Die katalytischen Leistungen (k_{cat}/K_m)/ k_2 der enzymatischen Reaktionen der Substrate **3** und **2** sind 1.6×10^{13} bzw. 4.3×10^{18} (Tabelle 1). Die Phosphodiesteraseaktivität (**1b**) von PAS hat eine außergewöhnlich hohe katalytische Leistung von 1.3×10^{18} . (Eine promiske Aktivität gegen cyclische Phosphodiester ist schon früher festgestellt worden, allerdings mit geringerer Effizienz.^[17]) Dieser Wert übertrifft typische Reaktionsbeschleunigungen, die für die eigentlichen, nativen Aktivitäten von verschiedenen Enzymen berechnet wurden, und ist unseres Wissens die höchste katalytische Leistung, die bisher für promiske Enzyme gemessen wurde.^[6,11] Zum Vergleich: Zwei strukturell und evolutionär verwandte Enzyme, die derselben Superfamilie zugeordnet werden, katalysieren dieselben drei Hydrolysereaktionen, unterscheiden sich aber in ihrer Präferenz für die native gegenüber der promisken Reaktion: Alkalische Phosphatase aus *E. coli* (AP) ist eine natürliche Phosphomonoesterase, die promiske Sulfomonoester- und Phosphodiesteraktivitäten aufweist,^[18,19] deren katalytische Leistungen mehr als 10^6 -fach geringer als die der nativen Phosphataseaktivität sind ($(k_{cat}/K_m)/k_2 = 7 \times 10^{17}$). Die Nucleotid-Phosphodiesterase/Pyrophosphatase (NPP) aus *Xanthomonas axonopodis* bevorzugt die Hydrolyse von Phosphodiestern ($(k_{cat}/K_m)/k_2 = 8 \times 10^{15}$) gegenüber Sulfo- und Phosphomonoesteraseaktivitäten (mit katalytischen Leistungen unter 10^{11}).^[20,21]

Es ist bemerkenswert, dass PAS hohe und ähnliche Beschleunigungen für zwei Reaktionen mit verschiedenen Reaktionsmerkmalen erreichen kann. Beide katalysierten Reaktionen können als Hydrolysereaktionen klassifiziert werden, beruhen aber auf verschiedenen Reaktionsmechanismen, d. h., die Abfolge der Spaltung alter Bindungen und Bildung neuer unterscheidet sich. Die mechanistischen Alternativen für die Reaktionen dieser Substrate in Lösung werden durch verschiedene Übergangszustände definiert: Phosphodiester **1** durchläuft einen stärker assoziativen Übergangszustand, in dem nur geringe negative Ladung an der Abgangsgruppe akkumuliert wird.^[22–24] Die Reaktionen des Sulfo- und Phosphomonoesters dagegen sind durch dissoziative Übergangszustände mit beträchtlicher Teilladung an der Abgangsgruppe (Abbildung 2) gekennzeichnet.^[22,25,26] PAS zeigt eine höhere Selektivität für die Substratstruktur als für die Charakteristika des Übergangszustandes: Die Diester **1a–c** unterscheiden sich 10^3 -fach in k_{cat}/K_m , wobei Diester mit zwei aromatischen Ringen bevorzugt werden. Dagegen unterscheiden sich die Werte für den Phosphodiester **1b** und den Sulfoester **2** nur 100-fach. Die Ladung des Substrates scheint beträchtlichen Einfluss auf die Reaktivität zu haben: Die Zunahme der Ladung im Phosphomonoestersubstrat **3** (gegenüber jener in Sulfoester **2**) führt zu einem 6×10^4 -fach

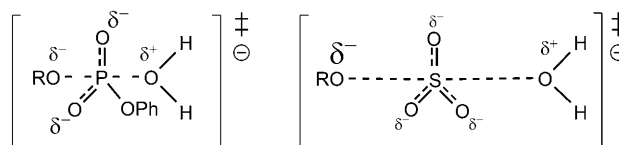
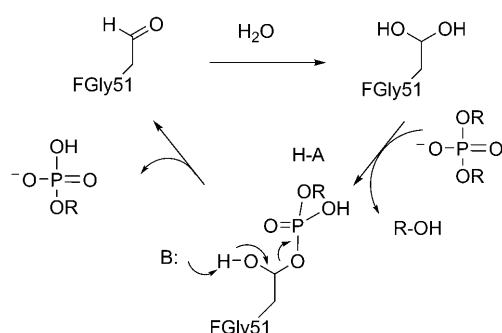


Abbildung 2. Übergangszustände der assoziativen Phosphodiester- (links) und dissoziativen Phosphomonoesterhydrolyse (rechts).

niedrigeren Wert für k_{cat}/K_m , obwohl beide Reaktionen dissoziative Übergangszustände aufweisen. Die tatsächlichen Charakteristika der Übergangszustände in der enzymatischen Reaktion sind noch zu bestimmen. AP,^[27,28] einige andere Phosphatasen^[22,29] und eine Sulfatase^[30] nutzen Übergangszustände, die auch bei der unkatalysierten Reaktion in freier Lösung dominieren. Allerdings gibt es auch Gegenbeispiele, z. B. ein promiskues Enzym, das Phospho- und Phosphonatmonoester mit Übergangszuständen hydrolysiert, die einander ähnlicher sind als die der unkatalysierten Reaktionen.^[31]

Die effiziente Hydrolyse von Phosphodiestern durch PAS könnte durch Gruppen des aktiven Zentrums unterstützt werden, die ähnliche Funktionen bei der nativen und promiskuen Reaktion ausüben. So involviert der doppelte Substitutionsmechanismus von Sulfoestern^[32] eine Lewis-Säurekatalyse durch ein Ca^{2+} -Ion, ein reaktives Nucleophil und eine effiziente Substratbindung sowie allgemeine Säurekatalyse durch verschiedene Aminosäuren im aktiven Zentrum (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Die herabgesetzte Aktivität der C51S-Mutante bestätigt ferner die wichtige Rolle, die das Formylglycin (FGly) als Nucleophil, das durch post-translationale Modifikation von Cystein 51^[33] generiert wird, bei beiden Reaktionen spielt. Dieses Nucleophil kann durch Halbacetalspaltung regeneriert werden, sodass dasselbe aktive Zentrum weitere Substratmoleküle verwerten kann (Schema 2; Einschub in Abbildung 1).



Schema 2. Die Rolle des katalytischen Nucleophils FGly51 in mehreren Reaktionszyklen während der Phosphodiesteraseaktivität von PAS. Das Intermediat wird durch Basenkatalyse, die zur Spaltung der C-O-Bindung führt, abgebaut. Dieser Mechanismus gilt in ähnlicher Form für Phosphat- oder Sulfatintermediate, die nach Reaktion mit dem FGly-Nucleophil entstehen. Aus diesem Grund ist der Schritt des Intermediatabbaus derselbe. Das Metallion und die Aminosäuren, die wichtig für die allgemeine Säure- und Basenkatalyse sind, wurden weggelassen (siehe Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).

Die ausgeprägten Reaktionsbeschleunigungen durch PAS machen deutlich, dass PAS ein hocheffizienter Katalysator für die Sulfomonoester- und Phosphodiesterhydrolyse ist, was sich in besonderer Affinität für die Übergangszustände der Substrate **1b** und **2** (mit kleinen Bindungskonstanten K_{ix} von 1.3×10^{-17} bzw. 4.2×10^{-17} M) manifestiert. Diese Kombination von hoher Effizienz und geringer Spezifität ist bemerkenswert. Es ist zu vermuten, dass dieses Enzym nur geringem Selektionsdruck gegen die promiske Aktivität ausgesetzt war und dass die zusätzlichen Aktivitäten darüber hinaus von

Vorteil gewesen sein könnten. Die Verwendung der katalytischen Gruppen für drei Reaktionen bedeutet, dass – trotz unterschiedlicher Übergangszustände, Substratstrukturen und -größen – eine evolutionäre Bifurkation relativ einfach vonstatten gehen kann. Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass die Fähigkeit eines Enzyms zur Katalyse einer zweiten Reaktion nicht nur in frühen Phasen der Evolution,^[34] die durch Katalysatoren geringer Effizienz charakterisiert sein mögen, stattfinden kann. Vielmehr scheint dies auch bei besonders guten Katalysatoren noch möglich zu sein. Ein Katalysator mit mehreren Aktivitäten (in diesem Fall mit k_{cat}/K_m -Werten, die sich nur 200-fach für zwei sowie 6×10^4 -fach für drei Reaktionen unterscheiden) hat einen Vorsprung, der in weiteren Evolutionszyklen ausgebaut werden kann. Anpassungsfähige Katalysatoren wie PAS könnten nützliche Bestandteile des zellulären Instrumentariums sein und als gleichsam universelle Katalysatoren eine Reihe von Funktionen ausführen, mit deren Hilfe ein Organismus schnell auf Umwelteinflüsse reagieren kann.

Eingegangen am 1. Dezember 2008

Online veröffentlicht am 16. April 2009

Stichwörter: Enzymkatalyse · Hydrolasen · Katalytische Promiskuität · Phosphatasen · Sulfatasen

- [1] R. Wolfenden, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3379.
- [2] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, **1999**.
- [3] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032.
- [4] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.
- [5] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498.
- [6] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91.
- [7] R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409.
- [8] S. Bershtein, D. S. Tawfik, *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 2311.
- [9] M. E. Glasner, J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 492.
- [10] Die katalytische Leistung, $(k_{\text{cat}}/K_m)/k_2$, ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die enzymatische und nichtenzymatische Reaktion. Sie ist ein Maß für Übergangszustandsstabilisierung. Im vorliegenden Fall wird die Reaktion des FGly-Nucleophils im aktiven Zentrum mit den Reaktionen von Sulfo- und Phosphoestern mit Wasser verglichen.
- [11] S. Jonas, F. Hollfelder, in *The Protein Engineering Handbook*, Vol. 1 (Hrsg.: S. Lutz, U. Bornscheuer), Wiley, Chichester, **2008**, S. 47–72.
- [12] S. Beil, H. Kehrli, P. James, W. Staudenmann, A. M. Cook, T. Leisinger, M. A. Kertesz, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *229*, 385.
- [13] J. Hummerjohann, S. Laudenbach, J. Retey, T. Leisinger, M. A. Kertesz, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2055.
- [14] L. F. Olguin, S. E. Askew, A. C. O'Donoghue, F. Hollfelder, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16547.
- [15] Reaktionsansätze wurden zur Stabilisierung von PAS mit BSA in geringer Konzentration versetzt.^[14] Obwohl BSA die Reaktion selbst nicht katalysiert, kann der K_m -Wert in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration leicht ansteigen. Ohne BSA beträgt der K_m -Wert für **1b** ca. 20 μM ; genaue Messungen waren allerdings nicht möglich, da ein Aktivitätsverlust des Enzyms die Bestimmung der kinetischen Parameter unmöglich machte.

- [16] Die tatsächliche Diesteraseaktivität der C51S-Mutante dürfte geringer als die beobachtete sein, da möglicherweise geringe Diesteraseverunreinigungen in der Enzympräparation vorhanden sind. Solche geringen Kontaminationen wurden während der Aufreinigung einer Präparates der C51A-Mutante detektiert. Dennoch ist die deutliche Aktivitätsminderung als Folge der Mutation ein klarer Beleg, dass das FGly-Nucleophil tatsächlich für die Phosphodiesteraseaktivität verantwortlich ist. Das Vorhandensein einer solchen möglichen Diesteraseaktivität in einem Präparat der Wildtyp-PAS sollte die Gültigkeit der hier präsentierten Daten nicht wesentlich beeinflussen, da diese Aktivität vernachlässigbar gering ist ($< 1/10000$ im Vergleich zum $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert von Wildtyp-PAS).
- [17] Eine Sulfatase aus Ochsenleber hydrolysiert cAMP mit $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werten, die 10^3 – 10^4 -fach unter dem Wert der Sulfataseaktivität liegen.^[35] Basierend auf einem Wert, der für die unkatalysierte Hydrolyse von cAMP^[36] abgeschätzt wurde, berechneten O'Brien und Herschlag^[6] eine katalytische Leistung $(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})/k_2$ von 1×10^{16} . Dieser Wert hängt stark von der vorgenommenen Extrapolation für die unkatalysierte Reaktion ab.
- [18] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12369.
- [19] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5691.
- [20] J. K. Lassila, D. Herschlag, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12853.
- [21] J. G. Zalatan, T. D. Fenn, A. T. Brunger, D. Herschlag, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9788.
- [22] W. W. Cleland, A. C. Hengge, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3252.
- [23] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 1165.
- [24] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 510.
- [25] S. J. Benkovic, P. A. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5504.
- [26] A. J. Kirby, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3209.
- [27] F. Hollfelder, D. Herschlag, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12255.
- [28] J. G. Zalatan, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1293.
- [29] Y. L. Zhang, F. Hollfelder, S. J. Gordon, L. Chen, Y. F. Keng, L. Wu, D. Herschlag, Z. Y. Zhang, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12111.
- [30] E. Chapman, M. C. Bryan, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 910.
- [31] C. McWhirter, E. A. Lund, E. A. Tanifum, G. Feng, Q. I. Sheikh, A. C. Hengge, N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13673.
- [32] I. Boltes, H. Czapinska, A. Kahnert, R. von Bülow, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, M. A. Kertesz, I. Uson, *Structure* **2001**, *9*, 483.
- [33] T. Dierks, C. Miech, J. Hummerjohann, B. Schmidt, M. A. Kertesz, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25560.
- [34] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, Q. G. S. Mc, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 73.
- [35] T. Uchida, F. Egami, A. B. Roy, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1981**, *657*, 356.
- [36] J. Chin, X. Zou, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1882.