

Erzeugung einer für *trans*-Fettsäuren hochselektiven Lipase durch Protein-Engineering

Henrike B. Brundiek, Andrew S. Evitt, Robert Kourist und Uwe T. Bornscheuer*

In den vergangenen beiden Jahrzehnten ist der Konsum von *trans*-Fettsäuren (TFS) als ein wichtiger beeinflussbarer Risikofaktor für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit erkannt und mit einer Verschärfung der Insulinresistenz und der viszeralen (Eingeweide-)Adipositas bei prädisponierten Personen in Verbindung gebracht worden.^[1] Daher wurde in den meisten westlichen Ländern die Verwendung von TFS in Lebensmittelformulierungen durch vielfältige politische und gesetzgeberische Maßnahmen beschränkt. Die meisten dieser TFS entstehen als unerwünschtes Nebenprodukt bei der industriellen Hydrierung von mehrfach ungesättigten pflanzlichen Ölen. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, durch den die oxidative Stabilität und die Schmelzpunkteigenschaften von pflanzlichen Ölen verbessert werden. Die katalytische Hydrierung ist seit ihrer Erfindung durch Wilhelm Norman im Jahr 1902^[2] das vorherrschende Verfahren zur Modifizierung von Speisefetten. Rund 5% der weltweiten Pflanzenölproduktion (insgesamt rund 137 Mio. Tonnen pro Jahr^[3a]) werden hydriert, obgleich Alternativverfahren wie Fraktionierung und Umesterung mehr Relevanz bei der Herstellung von „Zero-Trans“-Speisefetten gewonnen haben.^[3] Folglich ist eine selektive Entfernung von *trans*-Fettsäuren aus partiell hydrierten Pflanzenölen (PHPOs) ein vielversprechender Downstream-Prozess für die industrielle Hydrierung. Allerdings sind bisher weder chemische noch enzymatische Katalysatoren beschrieben worden, die eine hochselektive Entfernung von *trans*-Fettsäuren aus PHPO ermöglichen. Laut einer Studie weist die Lipase A aus *Candida antarctica* (CAL-A) jedoch eine 15-mal höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei der Veresterung von Elaidinsäure (C18:1Δ9-*trans*-Fettsäure) mit *n*-Butanol als der von Ölsäure (C18:1Δ9-*cis*-Fettsäure) auf.^[4] Bisher sind die Ursachen für diese *cis/trans*-Selektivität noch nicht aufgeklärt worden, und es fehlt ein Erklärungsmodell für diese Art der Fettsäureselektivität.

Wie alle Lipasen weist CAL-A eine typische α/β -Hydrolase-Faltung auf, und im aktiven Zentrum befindet sich eine Triade aus Serin, Histidin und Aspartat, welche die Hydrolyse von wasserunlöslichen Estern oder deren Rückreaktion (die Veresterung) ermöglicht.^[5] CAL-A ist eine ungewöhnliche Lipase mit interessanten Eigenschaften, die sehr sperrige

Substrate, einschließlich stark verzweigten Acylgruppen, sterisch gehinderte Alkohole, Amine und Amide akzeptiert.^[6] Nachdem die Kristallstruktur der CAL-A von Ericsson et al. 2008^[7] gelöst worden war, konnte die Enantioselektivität der CAL-A für sterisch anspruchsvolle Substrate durch Protein-Engineering verbessert werden.^[8]

Darüber hinaus offenbarte die Röntgenstrukturanalyse der CAL-A (PDB-Einträge: 2VEO und 3GUU) eine ungewöhnliche Lidstruktur, was darauf schließen lässt, dass die CAL-A der Prototyp einer neuen Lipaseunterfamilie ist. Durch diese einzigartige Lidstruktur wird ein sehr langer und schmaler Acyl-Bindungstunnel mit einer kleinen Abzweigung gebildet, von dem angenommen wird, dass er eine hohe Passgenauigkeit für langkettige Fettsäuren aufweist.

Daher wählten wir CAL-A als Ausgangspunkt, um hoch *trans*-selektive Varianten für die effiziente Entfernung von TFS aus PHPO zu erzeugen. Dies erforderte: 1) eine funktionelle Expression von CAL-A in *Escherichia coli*, die ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) im Mikrotiterplatten-(MTP)-Maßstab ermöglicht, 2) eine geeignete HTS-Assay-Methode für die Durchmusterung von Mutanten-Bibliotheken und 3) die Identifizierung von Aminosäureresten, die mutmaßlich die *trans*- oder *cis*-Fettsäureselektivität beeinflussen, als Ziele für die Mutagenese.

Um die Proteinproduktion im MTP- und Deepwell-Platten(DWP)-Maßstab zu ermöglichen, wurden zunächst vier genetische Konstrukte erzeugt, denn die zuvor publizierten Expressionssysteme für CAL-A,^[9] *P. pastoris* und *E. coli*, erwiesen sich als ungeeignet für dieses Vorhaben. Deren Untersuchung zeigte, dass die periplasmatische Expression der CAL-A (in *E. coli*) zu signifikant höheren Enzymaktivitäten im Kulturüberstand führte als die cytoplasmatische. Eine Autolyse der Zellen bewirkte nämlich, dass sich die Lipase im Kulturüberstand anreicherte, wodurch eine zeitsparende und günstige Methode zur Durchmusterung etabliert werden konnte (siehe Hintergrundinformationen, Abbildungen S1 und S2). Als Nächstes wurde ein Hochdurchsatz-Assay entwickelt. Dieser basierte auf der Freisetzung von *p*-Nitrophenol entweder von einem Elaidinsäureester (*p*NP-C18:1Δ9-*trans*) oder von einem Ölsäureester (*p*NP-C18:1Δ9-*cis*), da es sich bei diesen Substraten um die am häufigsten vorkommenden ungesättigten Fettsäuren in PHPO handelt. Mit diesem Paar repräsentativer *trans*- und *cis*-Fettsäuren wurde die „*trans*-über-*cis*“-Selektivität (ToC-Wert) des CAL-A-Wildtyps und der Mutanten bestimmt, indem die Hydrolysegeschwindigkeit in separaten Vertiefungen der Mikrotiterplatte verfolgt wurde. Enzymvarianten mit der gewünschten verbesserten Selektivität konnten dadurch schnell identifiziert und einer detaillierten GC-Analyse mit partiell hydriertem Pflanzenöl unterzogen werden. Mit diesem Assay

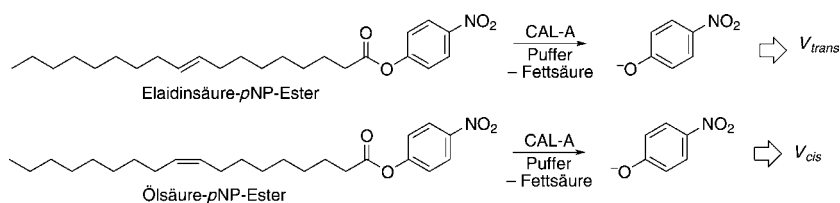
[*] Dr. H. B. Brundiek, Dr. A. S. Evitt, Dr. R. Kourist,
Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse,
Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106126> zu finden.

wurde ein ToC-Wert für den CAL-A-Wildtyp von 2.5 für Elaidinsäure/Ölsäure bestimmt. Der Unterschied in der Selektivität zu dem bereits früher veröffentlichten Wert^[4] kann auf das Reaktionssystem (Veresterung gegenüber Hydrolyse) und die unterschiedlichen Ester (*p*NP- gegenüber *n*-Butyl-Ester) zurückgeführt werden. Darüber hinaus wurde der *p*NP-Vaccensäureester (*p*NP-C18:1Δ11-*trans*) synthetisiert und ein ToC-Wert von 3.0 (gegenüber *p*NP-Ölsäure) bestimmt (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S3).

Die Identifizierung von Aminosäureresten, die bei der Selektivität der CAL-A für die *trans*- oder *cis*- Konfiguration einer Fettsäure-Doppelbindung eine Rolle spielen, ist anspruchsvoll und bisher noch nicht durch Protein-Engineering untersucht worden. Daher wurden alle Reste, die den ca. 30 Å langen Acyl-Bindungstunnel umfassen, als relevant betrachtet, besonders solche, die innerhalb eines Radius von 5 Å lagen und der gedockten C18:1-Fettsäure zugewandt waren (Abbildung 1). Dies führte zur Identifizierung von zwölf Positionen entlang des gesamten Fettsäure bindenden Tunnels: F149, I150, A218, T221, F222, L225, F233, G237, L241, M248, I301 und L305. Auf diese Weise wurden nicht nur die Reste in der Nähe der wahrscheinlichen Position der Δ9-Doppelbindung, sondern auch Aminosäuren am Anfang und am Ende des Acyl-Bindungstunnels einer Mutagenese unterzogen. Das NDT-Codon wurde für eine ortsspezifische Sättigungsmutagenese ausgewählt, da es zum einen nur für zwölf der 20 proteinogenen Aminosäuren kodiert, zum anderen aber alle funktionellen Gruppen der Aminosäuren umfasst. Folglich



Schema 1. Durch die Hydrolyse der *p*-Nitrophenylester (*p*NP-Ester) der Elaidinsäure (*trans*) oder der Ölsäure (*cis*) durch CAL-A oder deren Mutanten wird *p*-Nitrophenol freigesetzt, das spektrophotometrisch quantifiziert werden kann. Die jeweilige Geschwindigkeit der Hydrolyse-reaktion ermöglicht die Bestimmung des ToC-Wertes ($\text{ToC} = v_{trans}/v_{cis}$).

wurde eine viel kleinere Zahl von Klonen für jede Position benötigt, ohne dass die Qualität der Bibliothek beeinträchtigt wurde.^[10]

Nach der Erstellung der zwölf NDT-Codon-basierten Bibliotheken und der Expression der Varianten in *E. coli* in DWP wurden die Bibliotheken (ca. 5000 Klone) mit dem in Schema 1 skizzierten Assay durchmustert. Die Mutagenese von sieben der zwölf Positionen (I150, A218, L225, F233, G237, L241, M248) lieferte Varianten mit ToC-Werten, die niedriger als der Wert für den CAL-A-Wildtyp oder ihm ähnlich waren. Für die Positionen F149, T221, F222, I301 und L305 wurden jedoch mehrere Varianten mit zwei- bis sechsfach höheren ToC-Werten identifiziert (Tabelle 1), wenn auch die spezifische Aktivität teilweise verringert war, wie bei den Varianten T221H, F222C und I301H. Von besonderem Interesse waren die Mutanten F149D und F222S, denn ihre Hydrolysegeschwindigkeit *v* war nur mäßig beeinträchtigt, und sie zeigten eine stark erhöhte Präferenz für das *trans*-Isomer. Als Nächstes wurde die Relevanz dieser erhöhten ToC-Werte in einem Test, der repräsentativ für die gewünschte Anwendung des Enzyms ist, überprüft: die Hydrolyse von PHPO, das ein komplexes Gemisch aus Triglyceriden mit über 70 gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge, Zahl und Position von Doppelbindungen ist.

Das in dieser Studie verwendete PHPO (partiell hydriertes Sojabohnenöl: PHSO) enthält etwa 20 *trans*-Fettsäuren, was ungefähr 18% der gesamten Fettsäuren im Öl entspricht. Daher können die ToC-Werte, die mit den *p*NP-Estern bestimmt wurden, von denjenigen, die bei der Hydrolyse dieses komplexen Öls bestimmt wurden, abweichen. Die Produktion der sechs besten CAL-A-Varianten in größerem Maßstab erfolgte mithilfe von *P. pastoris* X33 oder *E. coli* (DE3). Der Kulturüberstand wurde danach bei der Hydrolyse von PHSO eingesetzt, gefolgt von einer gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren, die im Glycerin gebunden blieben. Anstelle des ToC-Wertes, wie oben beschrieben, musste eine alternative Möglichkeit gefunden werden, um die Chemo-selektivität der CAL-A-Mutanten bei der Hydrolyse des hochkomplexen PHSO zu bestimmen, da im Öl eine Vielzahl verschiedener *trans*-, *cis*- und gesättigter Fettsäuren enthalten ist. Daher wurde ein Selektivitätsfaktor (α_G -Faktor) eingeführt, der die Chemo-selektivität der CAL-A-Mutanten für verschiedene Fettsäuretypen reflektiert (z. B. Σ_{trans} und $\Sigma_{gesättigt}$ gegenüber Σ_{cis}). Dieser erweiterte α -Faktor ist identisch mit dem *E*-Wert, der von Chen et al. definiert wurde,^[11] um die vom Umsatz unabhängige Enantio-

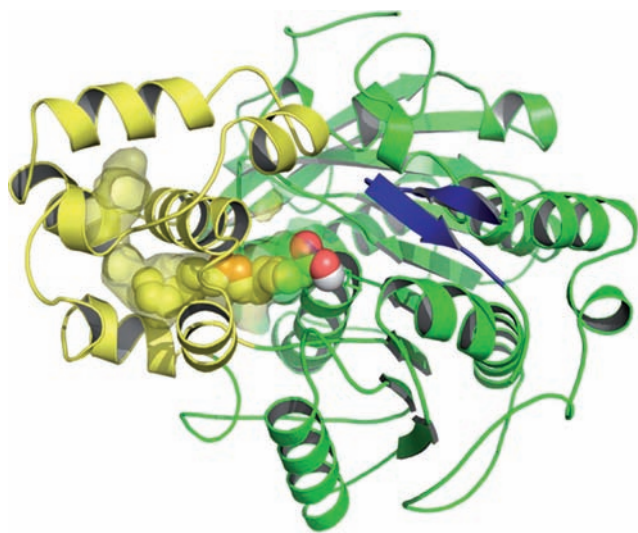


Abbildung 1. Kristallstruktur der CAL-A (PDB-Einträge: 2VEO, 3GUU). Eine C18:1-Fettsäure wurde in den Acyl-Bindungstunnel der CAL-A gedockt. Die zwölf Aminosäurereste, die für die NDT-Codon basierte Sättigungsmutagenese ausgewählt wurden, sind darunter dargestellt.

Abbildung 1. Kristallstruktur der CAL-A (PDB-Einträge: 2VEO, 3GUU). Eine C18:1-Fettsäure wurde in den Acyl-Bindungstunnel der CAL-A gedockt. Die zwölf Aminosäurereste, die für die NDT-Codon basierte Sättigungsmutagenese ausgewählt wurden, sind darunter dargestellt.

Tabelle 1: Beste Mutanten, die während der anfänglichen Durchmusterung der CAL-A-Varianten mit pNP-Estern der Elaidin- und Ölsäure gefunden wurden.

| CAL-A-Variante | ToC-Wert | ν [$\mu\text{mol min}^{-1}$] C18:1 Δ 9- <i>trans</i> ^[a] | | | ν [$\mu\text{mol min}^{-1}$] C18:1 Δ 9- <i>cis</i> ^[a] | | |
|----------------|----------|---|------------|---------|---|------------|---------|
| WT | 2.5 | 14 188 | ± 2838 | (100 %) | 5675 | ± 1135 | (100 %) |
| I305N | 4 | 2696 | ± 539 | (19 %) | 454 | ± 91 | (8 %) |
| T221H | 5 | 709 | ± 142 | (5 %) | 114 | ± 23 | (2 %) |
| I301H | 6 | 1135 | ± 227 | (8 %) | 170 | ± 34 | (3 %) |
| F222C | 8 | 1135 | ± 227 | (8 %) | 114 | ± 23 | (2 %) |
| F149D | 12 | 2412 | ± 482 | (17 %) | 170 | ± 34 | (3 %) |
| F222S | 15 | 2979 | ± 596 | (21 %) | 170 | ± 34 | (3 %) |

[a] Enzymatische Hydrolysegeschwindigkeiten der pNP-Ester der CAL-A-Mutanten und relative Geschwindigkeiten der Mutanten im Vergleich der des Wildtyps.

Tabelle 2: Hydrolyse eines partiell hydrierten Pflanzenöls (PHPO) durch verschiedene CAL-A-Varianten.

| CAL-A-Variante | Umsatz [%] | Akt. Σ <i>cis</i> [$\mu\text{U mL}^{-1}$] ^[a] | Akt. Σ <i>trans</i> [$\mu\text{U mL}^{-1}$] ^[a] | Akt. Σ sat [$\mu\text{U mL}^{-1}$] ^[a] | $\nu \Sigma$ <i>trans</i> / $\nu \Sigma$ <i>cis</i> ^[b] | $\nu \Sigma$ sat/ $\nu \Sigma$ <i>cis</i> ^[b] | α_{C1} ^[c] | α_{C2} ^[d] |
|----------------|------------|---|---|--|---|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Wildtyp | 22 | 883 | 1203 | 1076 | 1.36 | 1.22 | 3.5 | 6.7 |
| L305N | 14 | 120 | 299 | 239 | 2.50 | 2.00 | 4.5 | 9.6 |
| F149D | 11 | 3 | 78 | 74 | 27.77 | 26.20 | 4.6 | 28.5 |
| F222S | 16 | 16 | 111 | 117 | 7.02 | 7.37 | 4.5 | 32.2 |
| F222C | 20 | 46 | 163 | 164 | 3.53 | 3.54 | 4.6 | 36.6 |
| T221H | 5 | 0 | 48 | 47 | >100 | >100 | 9.8 | >100 |
| I301H | 12 | 0 | 107 | 87 | >100 | >100 | 11.2 | >100 |

[a] Volumetrische Aktivität der CAL-A-Varianten bei der Freisetzung verschiedener Fettsäuretypen (Σ *cis*: freigesetzte Menge *cis*-Fettsäuren, Σ *trans*: freigesetzte Menge *trans*-Fettsäuren, Σ sat: freigesetzte Menge gesättigter Fettsäuren). Ein Unit ist als diejenige Enzymmenge definiert, bei der ein μmol Fettsäure pro Minute unter Assaybedingungen freigesetzt wird. [b] Hydrolysegeschwindigkeit für die Freisetzung von *trans*-Fettsäuren (Σ *trans*) oder gesättigten Fettsäuren (Σ sat) gegenüber der Hydrolysegeschwindigkeit für die Freisetzung von *cis*-Fettsäuren (Σ *cis*). [c] α_{C1} -Faktor für die Spezifität Σ *trans*_{geb.} / (Σ *cis*_{geb.} + Σ sat_{geb.}). [d] α_{C2} -Faktor für die Spezifität: (Σ *trans*_{geb.} + Σ sat_{geb.}) / Σ *cis*_{geb.}; Σ *trans*_{geb.}: gebundene Fraktion der *trans*-Fettsäuren, Σ *cis*_{geb.}: gebundene Fraktion der *cis*-Fettsäuren; Σ sat_{geb.}: gebundene Fraktion der gesättigten Fettsäuren in PHPO. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

selektivität zu beurteilen, sowie mit dem von Rangheard et al. definierten Kompetitivitätsfaktor^[12] für multi-kompetitive enzymatische Reaktionen. So zeigt ein hoher α_{G} -Faktor ein Enzym mit hoher Präferenz für die Hydrolyse von *trans*- oder gesättigten Fettsäuren an. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass in der Tat alle Varianten eine höhere Selektivität als der CAL-A-Wildtyp aufweisen. Dabei sind die Varianten T221H und I301H am selektivsten.^[13] Eine detaillierte Analyse der Fettsäuren, die von jeder Variante im Vergleich zum CAL-A-Wildtyp freigesetzt wurden, kann in den Hintergrundinformationen (Abbildung S4 und Tabelle S1) eingesehen werden. Es zeigt sich, dass jede CAL-A-Variante ein individuelles Profil von Fettsäure-Hydrolysegeschwindigkeiten aufweist (Tabelle S1). Dies deutet darauf hin, dass jede Substitution im Acyl-Bindungstunnel von CAL-A zu einem einzigartigen Satz maßgeschneiderter Fettsäurepräferenzen führt. Darüber hinaus weisen die beiden besten CAL-A-Varianten einen hervorragenden α_{C2} -Faktor von > 100 auf, was schlussfolgern lässt, dass *trans*-Fettsäuren und gesättigte Fettsäuren bevorzugt in PHPO hydrolysiert werden. Dies bedeutet einen zusätzlichen gesundheitlichen Nutzen, denn im so erhaltenen Öl bleiben die *cis*-Fettsäuren in der Glyceridfraktion gebunden.

Außerdem zeigt die Analyse der Hydrolysedaten (Tabelle 2), dass die verbesserten CAL-A-Varianten nicht zwischen

ungesättigten und *trans*-Fettsäuren unterscheiden, sondern vor allem zwischen denen, die eine lineare Struktur (gesättigte und *trans*-Fettsäuren) einnehmen können und solchen, die dazu nicht in der Lage sind (*cis*-Fettsäuren). Der gerade und enge Tunnel der *trans*-selektiven CAL-A (Abbildung 1) kann den Zugang für *cis*-Fettsäuren behindern, während *trans*-Fettsäuren und gesättigte Fettsäuren bevorzugt eintreten können. Durch diesen Mechanismus kann ein schmaler Bereich innerhalb des Tunnels eine allgemeine Spezifität für die *cis*-Doppelbindungen an einer beliebigen Stelle einer Fettsäure vermitteln, die sich tiefer im Tunnel befindet als dieser Bereich selbst. Umgekehrt wird ein *cis*-selektives Enzym (wie die *Geotrichum-candidum*-Lipase I^[14]) durch starke Krümmungen innerhalb des Substratbindetunnels den Zugang für lange, gerade *trans*-Fettsäuren behindern.

Zusammenfassend ermöglichte unser neuartiger Ansatz die *trans*-Fettsäure-Selektivität einer Lipase auf eine Weise zu beeinflussen, dass die Chemo-selektivität von CAL-A effektiv manipuliert wurde, sodass Varianten mit den gewünschten, hervorragenden Eigenschaften erzeugt wurden.

Der Einsatz der besten Varianten innerhalb eines großtechnischen Prozesses mit partiell hydrierten Pflanzenölen kann daher helfen, eine Exposition von Verbrauchern gegenüber ungesunden *trans*-Fettsäuren in Lebensmitteln in Zukunft zu vermeiden.

Eingegangen am 29. August 2011,
veränderte Fassung am 1. November 2011
Online veröffentlicht am 23. November 2011

Stichwörter: Enzymkatalyse · Fettsäuren · Hochdurchsatz-Screening · Lipasen · Protein-Engineering

- [1] a) A. Ascherio, M. B. Katan, P. L. Zock, M. J. Stampfer, W. C. Willett, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1994–1998; b) R. Micha, D. Mozaffarian, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2009**, *5*, 335–344; c) D. Mozaffarian, M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer, W. C. Willett, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 1601–1613.
- [2] W. Norman, Deutsche Patentanmeldung, Nr. 141029, **1902**.
- [3] a) U. Biermann, U. T. Bornscheuer, M. A. R. Meier, J. O. Metzger, H. J. Schäfer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3938–3956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3854–3871; b) F. Destailats, J. L. Sébédio, F. Dionisi, J.-M. Chardigny in *The Oily Press Lipid Library*, Vol. 23, 2. Aufl., The Oily Press, Bridgewater, **2009**, S. 440.

- [4] R. Borgdorf, S. Warwel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 480–485.
- [5] H. Jochens, M. Hesseler, K. Stiba, S. K. Padhi, R. J. Kazlauskas, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1508–1517.
- [6] a) P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B* **2005**, *37*, 36–46; b) S. Hari Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2693–2696; c) A. Liljeblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886–895; d) M. Schmidt, E. Barbayanni, I. Fotakopoulou, M. Höhne, V. Constantinou-Kokotou, U. T. Bornscheuer, G. Kokotos, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3737–3740.
- [7] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J. E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109–119.
- [8] a) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038–7042; b) A. G. Sandström, K. Engstrom, J. Nyhlén, A. Kasrayan, J. E. Bäckvall, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 413–420.
- [9] a) J. Pfeffer, S. Richter, J. Nieveler, C. E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, M. Rusnak, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 931–938; b) J. Pfeffer, M. Rusnak, C. E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, S. C. Maurer, *J. Mol. Catal. B* **2007**, *45*, 62–67.
- [10] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1797–1804.
- [11] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [12] M. S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides, J. Baratti, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1989**, *1004*, 20–28.
- [13] Die entsprechende Doppelmutter (T221H/I201H) wurde hergestellt, aber das Expressionsniveau war sehr niedrig, weshalb ihre Selektivität nicht untersucht werden konnte.
- [14] M. C. Bertolini, J. D. Schrag, M. Cygler, E. Ziomek, D. Y. Thomas, T. Vernet, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 863–869.