

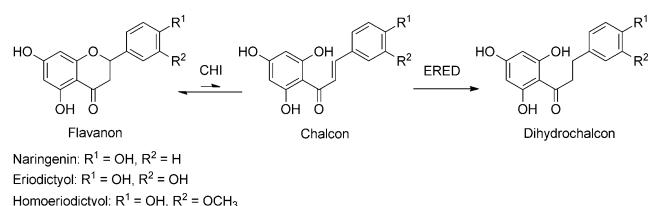
# Enzymatische Umsetzung von Flavonoiden mit einer bakteriellen Chalconisomerase und einer Enoatreduktase\*\*

Mechthild Gall, Maren Thomsen, Christin Peters, Ioannis V. Pavlidis, Patrick Jonczyk, Philipp P. Grünert, Sascha Beutel, Thomas Scheper, Egon Gross, Michael Backes, Torsten Geißler, Jakob P. Ley,\* Jens-Michael Hilmer, Gerhard Krammer, Gottfried J. Palm, Winfried Hinrichs und Uwe T. Bornscheuer\*

**Abstract:** Flavonoide stellen eine große Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite dar und haben eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Eigenschaften. Aufgrund dessen stehen sie im Interesse vieler Wissenschaftler, da sie zu vielen industriell interessanten Verbindungen führen können. Das anaerobe Darmbakterium *Eubacterium ramulus* kann über einen bislang unbekannten Abbauweg diese Flavonoide verstoffwechseln. Über eine Vollgenom-Sequenzierung wurden in dieser Arbeit die entscheidenden Enzyme, eine Chalconisomerase (CHI) und eine Enoatreduktase (ERED), identifiziert, kloniert und funktionell sogar unter aeroben Bedingungen exprimiert. Mittels Biotransformation des Flavanons zum Dihydrochalcon konnte der Flavonoid-Abbauweg bewiesen werden. Der beide Enzyme exprimierende *E. coli*-Stamm kann für die Umsetzung verschiedener Flavanone eingesetzt werden. Dies unterstreicht die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten biokatalytischen Systems.

Flavonoide sind in Pflanzen vorkommende Polyphenole, die an der Blütenfärbung beteiligt sind, als biochemische Si-

gnalmoleküle dienen, aber auch eine wichtige Rolle als Antioxidantien<sup>[1]</sup> und als Geschmacksstoffe haben.<sup>[2]</sup> Ihre Biosynthese in Pflanzen ist in der Literatur gut beschrieben, das Grundgerüst wird gebildet aus Malonyl- und Cumaroyl-Vorstufen mithilfe der 4-Cumaryl-CoA-Ligase und der Chalconsynthase. Im nächsten Schritt katalysiert die Chalconisomerase (CHI) die stereospezifische Cyclisierung zum tricyclischen Flavanon Naringenin (Schema 1). Die vielfältige



**Schema 1.** Postulierter Abbauweg für die Flavonoide. CHI = Chalconisomerase, ERED = Enoatreduktase. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt stark auf der Seite der Flavanon-Bildung.

Familie der Flavonoide wird durch zahlreiche Modifikationen wie z. B. durch Hydroxylierungen und Glykosylierung gebildet. Für pflanzliche CHIs sind sowohl ihr evolutionärer Ursprung<sup>[3]</sup> als auch ihr Reaktionsmechanismus<sup>[4]</sup> und die Struktur<sup>[5]</sup> bekannt. Erst kürzlich wurden auch in Gamma-proteobakterien und Ascomyceten CHIs gefunden, jedoch bleibt ihre physiologische Rolle unklar.<sup>[6]</sup> Eine Ausnahme stellt das anaerobe Darmbakterium *Eubacterium ramulus* dar. Für dieses wurde bereits beschrieben, dass der Stamm in der Lage ist, eine Reihe von Flavonoiden, einschließlich Naringenin-7-neohesperidosid, ein glykosyliertes Derivat des Naringenins, abzubauen.<sup>[7]</sup> Die Autoren postulierten einen möglichen Abbauweg jedoch ohne den experimentellen Nachweis der Intermediate. Zusätzlich wird das Abbauprodukt des Naringenins, Phloretin ( $R^1=OH$ ,  $R^2=H$ , Schema 1), von *E. ramulus* zu 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure und Phloroglucin hydrolysiert. Dies ist unerwünscht, da Phloretin ein wichtiger Aromastoff ist.<sup>[8]</sup> Phloretin könnte prinzipiell chemisch durch eine Reduktion des entsprechenden Chalcons oder durch eine Friedel-Crafts-ähnliche Acylation von Phenol mit Dihydrozimtsäure erhalten werden,<sup>[9]</sup> diese chemisch hergestellten Produkte dürfen aber nicht als natürliche Geschmacksstoffe nach der Europäischen Arzneiverordnung (EG Nr. 1334/2008) genutzt werden. Demzufolge hätte ein enzymatischer oder fermentativer Prozess

[\*] Dipl.-Biol. M. Gall, Dipl.-Biochem. C. Peters, Dr. I. V. Pavlidis, 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  
 Homepage: <http://biotech.uni-greifswald.de>

Dipl.-Biochem. M. Thomsen, Dr. G. J. Palm, Prof. Dr. W. Hinrichs  
 Institut für Biochemie, Abt. Strukturelle Molekularbiologie  
 Universität Greifswald  
 Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Germany)

M. Sc. P. Jonczyk, M. Sc. P. P. Grünert, Dr. S. Beutel,  
 Prof. Dr. T. Scheper  
 Institut für Technische Chemie  
 Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
 Callinstraße 5, 30167 Hannover (Deutschland)

E. Gross, Dr. M. Backes, Dr. T. Geißler, Dr. J. P. Ley, Dr. J.-M. Hilmer,  
 Dr. G. Krammer  
 Symrise, P.O. Box 1253, 37603 Holzminden (Deutschland)  
 E-Mail: jakob.ley@symrise.com

[\*\*] Wir danken dem „Bundesministerium für Bildung und Forschung“ für die finanzielle Unterstützung innerhalb des „Biokatalyse 2021“ Clusters (FKZ: 0315365 and 031A109). M.T. dankt dem „Landesgraduiertenkolleg von Mecklenburg-Vorpommern“ für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306952> zu finden.

zur Phloretin-Produktion einen zusätzlichen Wert für die Aromastoff-Industrie. Alternativ können Glykoside des Phloretins, wie das Phlorizin aus *Malus* ssp.,<sup>[10]</sup> gewonnen und nachträglich zur Gewinnung des Aglykons Phloretin hydrolysiert werden.<sup>[11]</sup> Dieser etablierte Prozess ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv und des Weiteren abhängig von der saisonalen Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials. Um diesen saisonalen Einfluss zu vermindern und gleichzeitig die Produktions- und Entsorgungskosten zu reduzieren, ist ein biotechnologischer Prozess für diesen wichtigen Aromastoff von großem Interesse.

Die Kultivierung des strikt anaeroben *E. ramulus* DSM 16296 für den Aufbau eines industriell nutzbaren Bioprozesses stellt ein Hindernis dar, da das Wachstum sehr langsam ist und die Ganzzell-Biotransformation zu einem weiteren Abbau des Phloretins führt.<sup>[12]</sup> Diese Probleme können durch eine heterologe Expression der Enzyme in Mikroorganismen überwunden werden. Diese Technik ist bereits, jedoch nur unter Verwendung von Genen pflanzlichen Ursprungs, für die Produktion von Flavonoiden ausgehend von verschiedenen Substraten, z.B. L-Phenylalanin, Tyrosin oder Zimtsäure, in Gebrauch.<sup>[13]</sup> Die Herausforderungen unserer aktuellen Arbeit waren vielfältig, beginnend mit der Bestimmung der kodierenden Gensequenzen der Enzyme aus dem Genom von *E. ramulus*, die an der biokatalytischen Transformation des Naringenins zum Phloretin beteiligt sind und der funktionalen Expression der Proteine in einem rekombinannten Wirt.

Herles und Mitarbeiter<sup>[14]</sup> bestimmten ein 15 Aminosäuren langes N-terminales Fragment der CHI aus *E. ramulus* DSM 16296 und postulierten, dass diese an der Umsetzung des Naringenins zu Phloretin beteiligt ist. Diese Peptidsequenz wurde in dieser Arbeit genutzt, um das vollständige Gen zu identifizieren. Hierfür wurde das gesamte Genom von *E. ramulus* DSM 16296 sequenziert und die resultierenden DNA-Sequenzen nach dem kodierenden Gen der CHI durchsucht. Es wurde nur an einer Position eine Übereinstimmung mit 12 aufeinanderfolgenden Aminosäuren nach dem Start-Methionin gefunden. Dieser Leserahmen (GenBank-Zugangsnummer: KF154734) kodiert für ein 32.5 kDa großes Protein und korreliert mit dem Molekulargewicht, das Herles und Mitarbeiter mittels SDS-PAGE für eine Untereinheit des Enzyms bestimmt hatten.<sup>[14]</sup> Erstaunlicherweise ergab eine BLAST-Suche<sup>[15]</sup> keine Übereinstimmungen mit anderen CHIs aus Pflanzen oder anderen Quellen mit einer Sequenzidentität  $\geq 10\%$ ; folglich ist dieses Protein einzigartig (Abbildung SI-1).

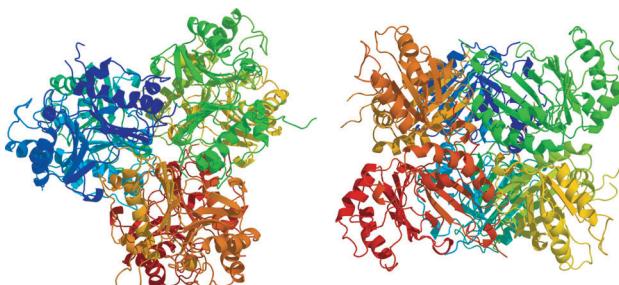
Für die Enoatreduktase (ERED) war keine Geninformation vorhanden. Aus diesem Grund verglichen wir 34 Sequenzen von bekannten EREDs und fanden ein konserviertes Motiv, das als Basis zur Identifizierung des ERED-kodierenden Gens im Genom von *E. ramulus* DSM 16296 diente. Wiederum fanden wir nur einen Leserahmen (GenBank-Zugangsnummer: KF154735) dessen Aminosäuresequenz eine geringe Identität ( $\leq 29\%$ , Abbildung SI-2) zu anderen bekannten EREDs aufwies.<sup>[16]</sup> Jedoch sind auch diese EREDs nur unzureichend charakterisiert.

Die kodierenden Gene für die bakterielle CHI und die ERED wurden in einen gewöhnlichen pET-Vektor kloniert

und funktional in *E. coli* Rosetta (DE3) exprimiert. Erfreulicherweise war die CHI aus *E. ramulus* in löslicher Form unter aeroben Bedingungen in *E. coli* Rosetta (DE3) (Abbildung SI-3) exprimierbar. Geringe Modifizierungen des Aufreinigungsprotokolls von Herles und Mitarbeitern<sup>[14]</sup> lieferten uns reine rekombinante CHI zur biochemischen Charakterisierung und nachfolgender Kristallisation (Abbildung SI-4). Dasselbe Aufreinigungsprotokoll wurde außerdem für das Wildtyp-Protein aus *E. ramulus* verwendet, jedoch wurden geringere spezifische Aktivitäten gefunden (Tabellen SI-1 und SI-2). Die Charakterisierung der CHI zeigte, dass die rekombinante CHI bei pH 6.4–7.6 mehr als 90% ihrer Aktivität behält (Abbildung SI-5) und dass die optimale Reaktionstemperatur 45°C beträgt (Abbildung SI-6). Die rekombinante CHI ist außerdem hinreichend temperaturstabil, da sie mehr als 50% ihrer Anfangsaktivität nach 6 h Inkubation bei 41°C beibehält (Abbildung SI-7).

Die ermittelten kinetischen Parameter für die rekombinante CHI unterstreichen die hohe Aktivität des Enzyms (Abbildung SI-8). Auch wenn sich der  $K_m$ -Wert der rekombinanten bakteriellen CHI (36.9 μM) im Bereich der pflanzlichen CHIs befindet, der von 2 μM bis 112 μM für die CHI aus *Glycine max*<sup>[17]</sup> bzw. *Medicago sativa*<sup>[4]</sup> variiert, ist die Wechselzahl signifikant höher. Die in der Literatur gefundenen  $k_{cat}$ -Werte für pflanzliche CHIs reichen von  $186 \text{ s}^{-1}$ <sup>[4]</sup> bis  $833 \text{ s}^{-1}$ <sup>[18]</sup> während der für die rekombinante CHI aus *E. ramulus* zu  $4483 \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurde. Folglich zeigt die rekombinante bakterielle CHI eine katalytische Effizienz von  $1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 75-fach höher als die pflanzliche CHI von *Medicago sativa*, dessen katalytische Effizienz  $1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  beträgt.<sup>[4]</sup> Als wir die rekombinant exprimierte CHI mit der nativen CHI aus *E. ramulus* verglichen, wichen die kinetischen Werte ab. Herles und Mitarbeiter bestimmten  $K_m$  mit 42.7 μM und  $k_{cat}$  mit  $2300 \text{ s}^{-1}$ , resultierend in einer katalytischen Effizienz von  $0.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,<sup>[14]</sup> welche signifikant niedriger ist als die des rekombinanten Enzyms. Die Differenz resultiert größtenteils aus dem Unterschied in der Wechselzahl. Die höhere katalytische Aktivität der rekombinanten CHI kann auf die höhere Reinheit oder die unterschiedliche Oligomerisierung zurückgeführt werden.

Die Analyse der Röntgenkristallstruktur (PDB-Code: 3zph) zeigte, dass die rekombinante CHI Hexamere, als Trimer von drei Dimeren (Abbildung 1), bildet, während Herles und Mitarbeiter angaben, nur Tetramere in *E. ramulus* zu finden.<sup>[14]</sup> Unabhängig von dieser Beobachtung unter-



**Abbildung 1.** Röntgenkristallstruktur (links: Ansicht von oben; rechts: um 90° gedreht) eines Hexamers mit  $D_3$ -Symmetrie der rekombinanten CHI aus *E. ramulus*, PDB-Code: 3zph.

scheidet sich die Struktur der bakteriellen CHI deutlich von denjenigen pflanzlicher CHIs; die Protein-Protein-Wechselwirkungen eines Dimers der rekombinanten bakteriellen CHI sind stark ausgeprägt und basieren auf der Inkorporation des C-Terminus der einen Peptidkette mit einer zweiten Peptidkette, während die pflanzlichen Proteine nur als Monomere vorkommen.<sup>[5]</sup> Darüber hinaus gibt es, im Unterschied zu den pflanzlichen CHIs, eine interne Symmetrie innerhalb der tertiären Struktur eines Monomers, das sich in zwei Domänen mit ähnlicher Faltung teilt, die um 90° gegeneinander gedreht sind.

Die Expression der ERED war anspruchsvoller als die Expression der CHI. Da das Gen der ERED mit der nativen Nukleotidsequenz nur eine geringe Expression in *E. coli* Rosetta aufwies, wurde ein synthetisches Kodon-optimiertes Gen der ERED (sERED) in den Vektor pET22b kloniert. Dies führte zu einer Überexpression von löslicher sERED bei 20°C unter aeroben Bedingungen. Das Protein hatte das mittels SDS-PAGE ermittelte erwartete Molekulargewicht von 70 kDa, welches mit der theoretischen Größe von 75 kDa korreliert. Leider konnte nur eine geringe Aktivität bei der Umsetzung von Naringeninchalcon zu Phloretin beobachtet werden. Da das Enzym aus einem strikt anaeroben Organismus stammt, führten wir eine Expression unter anaeroben Bedingungen durch. Die beste Expression unter Stickstoff-Atmosphäre wurde bei 25°C beobachtet. Nachdem alle Schritte (Zellernte, Lyse und Biokatalyse) unter einer Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt worden waren, konnte eine deutliche enzymatische Aktivität in der Reduktion des Chalcons zum Phloretin gemessen werden. Außerdem konnte der sERED-enthaltende Rohextrakt zu aufgereinigter CHI hinzugegeben und eine Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beobachtet werden. Erfreulicherweise findet der unerwünschte enzymatische Abbau des Phloretins, der bei *E. ramulus* beobachtet wurde, nicht im *E. coli*-System statt, sodass die Synthese des Zielproduktes möglich wird.

Die hohe Sauerstoff-Empfindlichkeit der ERED aus *E. ramulus* kann über die Sequenzähnlichkeit zu 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktasen und einer anaeroben Enoatreduktase aus *Clostridium* sp.<sup>[16a]</sup> erklärt werden. Diese beiden Enzyme sind als Mehrdomänenproteine beschrieben und weisen eine Fass-Domäne auf, die mit dem „Old Yellow Enzyme“ verwandt ist und eine hohe Sequenzkonservierung in einer Kernregion von ca. 40 Aminosäuren aufweist. Die zweite Domäne dieser ERED ist ebenfalls redoxaktiv und mit Glutathion-Reduktasen verwandt, die einen Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, der der sauerstoffempfindliche Teil des Proteins sein könnte. In der Sequenz sind vier Cysteine mit einem für Eisen-Schwefel-Cluster typischen Motiv CXXCXXC(X)<sub>22</sub>C gefunden worden. Dieses Motiv findet sich auch in der Sequenz der ERED aus *E. ramulus*, beginnend von C361 (Abbildung SI-2).<sup>[14b]</sup> Bemerkenswerterweise wurde das Motiv GXGXXG(X)<sub>17</sub>E für die NADH- und FAD-Bindungsstelle in der Glutathion-Reduktase<sup>[19]</sup> zweimal in der Sequenz der ERED von *E. ramulus* gefunden.

Um eine industrielle Anwendung dieses Bioprozesses zu ermöglichen, erfolgte eine simultane Expression der beiden Enzyme in einem *E. coli*-Stamm. Um dies zu erreichen, wurde das Gen der CHI einschließlich Ribosomenbindestelle

hinter das sERED-Gen in den pET22b-Vektor kloniert. Mit diesem neuen Konstrukt (pET22b sERED/CHI) war die lösliche und aktive Expression beider Enzyme unter anaeroben Bedingungen möglich. Biokatalysen mit Rohextrakt ermöglichten die Produktion von 50 µM Phloretin nach einer Stunde unter anaeroben Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen können beide Enzyme ebenfalls löslich exprimiert werden, jedoch wird ein signifikanter Anteil sERED in unlöslicher Form exprimiert (Abbildung SI-9). Der bei dieser Kultivierung gebildete Anteil an löslicher sERED ist jedoch ausreichend, um das Gleichgewicht der Reaktion zur Produktion von Phloretin zu verschieben.

Zur Untersuchung der Substratspezifität des Systems und somit dessen Vielseitigkeit wurden *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen mit dem Konstrukt pET22b\_sERED/CHI aerob kultiviert (siehe die Hintergrundinformationen) und biokatalytische Umsetzungen mittels Ganzzell-Biokatalyse mit drei strukturell ähnlichen Flavanonen unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt, da der aerobe Prozess zu geringer und rückläufiger Aktivität führte. Bereits nach kurzer Zeit konnten hohe Umsätze für Naringenin, Eriodictyol und Homoeriodictyol beobachtet werden (Tabelle 1). Die Hydroxy-

**Tabelle 1:** Umsatz [%] der Flavanone zu ihren jeweiligen Dihydrochalconen.

Substrat	Reaktionszeit		
	1 h	2 h	17 h
Naringenin	69 ± 1%	86 ± 1%	93 ± 1%
Eriodictyol	46 ± 2%	51 ± 4%	72 ± 2%
Homoeriodictyol	47 ± 3%	52 ± 1%	63 ± 2%

gruppe in *para*-Position zum Phenylring scheint eine entscheidende Rolle für die CHI-Aktivität zu haben. Docking-Experimente mit Naringenin im aktiven Zentrum der CHI zeigten, dass diese Hydroxygruppe in ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit Asp79 und Gln101 eingebunden ist; dieses scheint entscheidend für die korrekte Orientierung des Substrats zu sein. Andererseits zeigen die Ergebnisse, dass die CHI tolerant gegenüber Substituenten in *meta*-Position des Phenylringes ist. Auch wenn Naringenin das bevorzugte Substrat ist, da es an dieser Position keinen Substituenten trägt, kann das aktive Zentrum der CHI auch sterisch anspruchsvollere Substituenten wie Hydroxy- (Eriodictyol) oder Methoxygruppen (Homoeriodictyol) akzeptieren.

Zusammenfassend bestätigen unsere experimentellen Ergebnisse den von Herles und Mitarbeitern postulierten Abbauweg<sup>[14]</sup> der Flavonoide durch die Identifizierung und die erfolgreiche rekombinante Expression der Chalconoisomerase und einer Enoatreduktase aus dem anaeroben Bakterium *Eubacterium ramulus*. Der beide Enzyme exprimierende *E. coli*-Stamm kann für die Umsetzung verschiedener Flavanone eingesetzt werden. Dies unterstreicht die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten biokatalytischen Systems.

Eingegangen am 7. August 2013,  
veränderte Fassung am 14. November 2013  
Online veröffentlicht am 20. Dezember 2013

**Stichwörter:** Chalconisomerase · Enoatreduktase · Enzymkatalyse · *Eubacterium ramulus* · Flavonoide

- 
- [1] A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043.
  - [2] a) J. P. Ley, G. Krammer, G. Reinders, I. L. Gatfield, H.-J. Bertram, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6061–6066; b) S. Scharbert, T. Hofmann, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5377–5384; c) M. S. J. Simmonds, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 245–252.
  - [3] a) M. N. Ngaki, G. V. Louie, R. N. Philippe, G. Manning, F. Pojer, M. E. Bowman, L. Li, E. Larsen, E. S. Wurtele, J. P. Noel, *Nature* **2012**, *485*, 530–533; b) W. A. Peer, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 607–608.
  - [4] J. M. Jez, J. P. Noel, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1361–1369.
  - [5] J. M. Jez, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 786–791.
  - [6] M. Gensheimer, A. Mushegian, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 540–544.
  - [7] H. Schneider, M. Blaut, *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 71–75.
  - [8] „Flavor Suppression and Enhancement“: J. P. Ley, K. Reichelt, G. Krammer in *Food Flavors. Chemical, Sensory and Technological Properties* (Hrsg.: H. H. Jeleń), CRC, Boca Raton, USA, **2012**, S. 155–175.
  - [9] V. Siddaiah, C. V. Rao, S. Venkateswarlu, G. V. Subbaraju, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 841–846.
  - [10] F. Will, H. Zessner, H. Becker, H. Dietrich, *Food Sci. Technol. LEB* **2007**, *40*, 1344–1351.
  - [11] J. Ley, J.-M. Hilmer, I. L. Gatfield, European Patent 2017272, **2008**.
  - [12] P. Jonczyk, A. Schmidt, I. Bice, M. Gall, E. Gross, J.-M. Hilmer, U. Bornscheuer, S. Beutel, T. Scheper, *Chem. Ing. Tech.* **2011**, *83*, 2147–2152.
  - [13] a) M. Koffas, E. Leonard, Y. Yan, J. Chemler, Patent WO/2006/010117, **2006**; b) C. Schmidt-Dannert, K. Watts, Patent WO/2005/084305, **2005**.
  - [14] C. Herles, A. Braune, M. Blaut, *Arch. Microbiol.* **2004**, *181*, 428–434.
  - [15] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T. Madden, *BMC Bioinf.* **2009**, *10*, 421.
  - [16] a) R. E. Williams, N. C. Bruce, *Microbiology* **2002**, *148*, 1607–1614; b) F. Rohdich, A. Wiese, R. Feicht, H. Simon, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5779–5787.
  - [17] L. Ralston, S. Subramanian, M. Matsuno, O. Yu, *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 1375–1388.
  - [18] R. A. Bednar, J. R. Hadcock, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9582–9588.
  - [19] O. Dym, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1712–1728.