



Quantitative Beladung eines Proteinkäfigs mit aktiven Enzymen

Yusuke Azuma, Reinhard Zschoche, Matthias Tinzl und Donald Hilvert*

Abstract: Proteine, die genetisch mit einer super-positiv geladenen Variante des grün fluoreszierenden Proteins verbunden wurden, können quantitativ in ein Lumazin-Synthase-Kapsid geladen werden, das mit einer negativ geladenen Innenfläche ausgestattet ist. Dieses einfache System ist eine ebenso robuste wie vielseitige Methode, um hierarchisch geordnete Proteinkomplexe herzustellen, die dann als Nanoreaktoren verwendet werden können. Die allgemeine Anwendbarkeit dieser Beladungsstrategie und ihre Auswirkung auf die Enzymaktivität wurden mit acht strukturell und mechanistisch verschiedenen Enzymen untersucht.

Damit mehrere nichtkompatible biosynthetische Prozesse gleichzeitig ablaufen können, werden in Lebewesen viele Enzyme auf spezialisierte zelluläre Kompartimente beschränkt. Die Aktivität der Enzyme, die in die Kohlenstofffixierung oder den Abbau organischer Moleküle involviert sind, wird in Bakterien beispielsweise innerhalb von Proteinhüllen koordiniert.^[1] Ähnlich wie die Phospholipidmembranen eukaryotischer Organellen beschränken die Proteinschalen die Diffusion zwischen diesen Komplexen und ihrer Umgebung und ermöglichen somit die Regulierung der eingeschlossenen Enzyme, die Konzentration flüchtiger Moleküle, den Einschluss giftiger Zwischenstufen und die Vermeidung ungewünschter Nebenreaktionen.^[1]

Bisher wurden Liposomen,^[2] synthetische Polymere^[3] und Proteinkäfige^[4] als künstliche Mikrokompartmente verwendet, um zu untersuchen, wie sich Isolation und räumliche Beengung auf die Enzymaktivität auswirken. Leere Viruspartikel sind diesbezüglich besonders vielversprechend, weil sie biokompatibel sind, spontan hochgradig organisierte Strukturen mit definierter Größe und Form bilden und außerdem einfach mit genetischen oder chemischen Methoden modifiziert werden können.^[5] Virale Kapside wurden bereits mittels etlicher Strategien beladen, darunter Diffusionsmethoden,^[4a] Coiled-Coils,^[4b] elektrostatische Tags,^[4c] RNA-Aptamere^[4d] sowie gentechnische Kupplung von Gästen an Gerüstproteine der Virushülle.^[4e–g] Weil der Stoffwechsel durchsatz vom stöchiometrischen Verhältnis der Enzyme abhängen kann,^[6] ist es wichtig, die Beladung genau kontrollieren zu können. Bei der Beladung des Kapsids des Augenbohnen-Mosaikvirus konnte die Packungsdichte mit kovalenten und nichtkovalenten Methoden gesteuert werden.^[7]

Basierend auf dem nichtviralen, kapsidbildenden Enzym Lumazin-Synthase aus *Aquifex aeolicus* (AaLS) haben wir

kürzlich eine alternative Strategie für die Bildung von Gast-Wirt-Komplexen, die nur aus genetisch kodierten Proteinen zusammen gesetzt sind, entwickelt.^[8] Nachdem vier Glutamatreste auf der Innenseite des Proteins eingefügt worden waren, konnte die resultierende Variante, AaLS-neg, in vivo Gastmoleküle einschließen, die mit einem Deka-Argininpeptid (R10) versehen wurden.^[8a] AaLS-neg wurde anschließend durch zielgerichtete Evolution optimiert. Daraus ist die Variante AaLS-13 mit einer höheren Ladekapazität unter physiologischen Bedingungen hervorgegangen.^[8b] Außer Proteinen, die ein R10-Peptid tragen, kann AaLS-13 auch super-positiv geladenes, grün fluoreszierendes Protein, GFP(+36), in vitro aufnehmen.^[8c] Nun zeigen wir, dass GFP(+36) als genetisch kodierbare Bindungsdomäne genutzt werden kann, um Enzyme in den Innenraum des AaLS-13-Kapsids zu dirigieren (Abbildung 1 A,B).

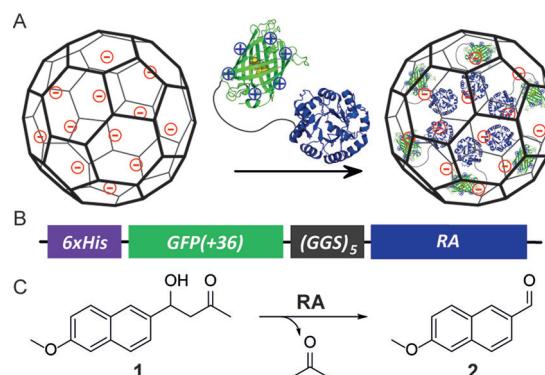


Abbildung 1. Strategie zur Beladung eines Proteinkäfigs mit aktiven Enzymen. A) GFP(+36) (grün) fungiert als Bindungsdomäne, um gekoppelte Frachtproteine in leere AaLS-13-Kapside zu dirigieren. B) Schema des Gens, das für das GFP(+36)-Retroaldolase-Fusionsprotein kodiert. C) Die von RA katalysierte Retroaldolreaktion.

Als Modellenzym haben wir eine Retroaldolase (RA) gewählt, die zuerst mit computergestützten Methoden entworfen und anschließend im Labor optimiert wurde, um die Spaltung von (\pm) -4-Hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthyl)-2-butanon (Methodol, **1**) in 6-Methoxy-2-naphthaldehyd (**2**) und Aceton zu katalysieren (Abbildung 1C).^[9] Der N-Terminus der Variante RA95.5–8 K210M^[9] ($k_{cat} = 0.18 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) wurde über einen (Gly-Gly-Ser)₅-Linker genetisch mit GFP(36+) verbunden (Abbildung 1B). Obwohl dadurch die katalytische Aktivität um das Zehnfache abnahm ($k_{cat} = 0.018 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 170 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), konnte das nichtoptimierte GFP(+36)-RA-Konstrukt das chromogene Substrat, mit dem die Reaktion photometrisch verfolgt werden kann, immer noch effizient spalten.

Analog zu GFP(+36) wird GFP(+36)-RA problemlos von aufgereinigten AaLS-13-Kapsiden aufgenommen.^[10]

[*] Dr. Y. Azuma, R. Zschoche, M. Tinzl, Prof. Dr. D. Hilvert
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: hilvert@org.chem.ethz.ch

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508414> zu finden.

Entsprechend dem Verfahren für die Beladung mit GFP(+36)^[8c] wurde GFP(+36)-RA mit leeren AaLS-13-Kapsiden in wässrigem Puffer (pH 8.0; Ionenstärke 0.34 M) in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die Bildung eines Komplexes zwischen AaLS-13 und GFP(+36)-RA wurde durch Größenausschlusschromatografie der Mischungen und anschließende SDS-PAGE-Analyse gezeigt (Abbildung 2A,B sowie Abbildung S1 der Hintergrundinformationen).

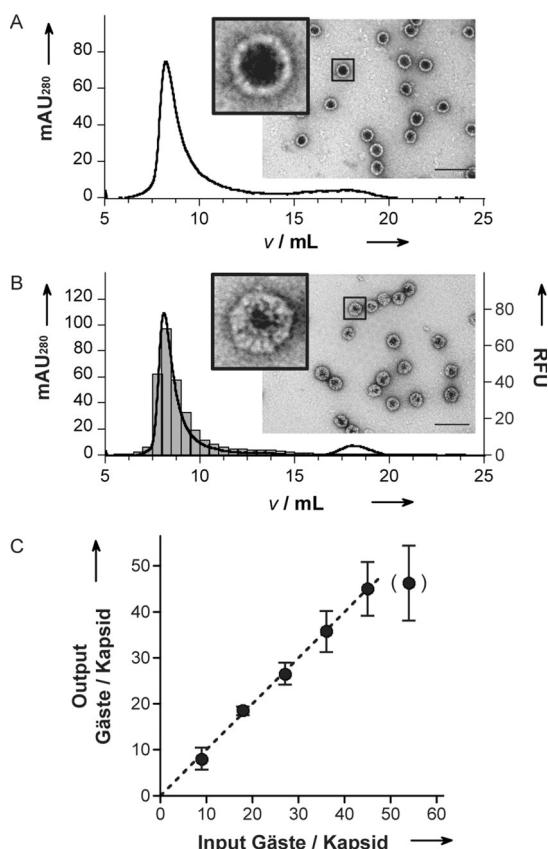


Abbildung 2. Quantitative Beladung leerer AaLS-13-Kapside mit GFP(+36)-RA. Größenausschlusschromatogramme A) von leeren Kapsiden und B) von Kapsiden, die mit 45 Äquivalenten GFP(+36)-RA beladen wurden. Schwarze Linien geben die Absorption bei $\lambda = 280$ nm wieder, und graue Säulen zeigen die Fluoreszenz einzelner Fraktionen. Die Einschübe zeigen TEM-Aufnahmen A) leerer und B) gefüllter Kapside (Maßstabsbalken 100 nm); ein repräsentativer Komplex ist vergrößert dargestellt. C) Durchschnittliche Zahl eingeschlossener GFP(+36)-RA-Fusionsproteine pro AaLS-13-Kapsid in Abhängigkeit vom Mischverhältnis. Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die lineare Regression (ohne den eingeklammerten Messpunkt) ergab eine Steigung von 0.995 (----).

RA allein bindet nur unwesentlich an das Kapsid (Abbildung S2). Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-)Aufnahmen nach Negativkontrastierung der aufgereinigten Partikel haben bestätigt, dass sich das Fusionsprotein tatsächlich im Inneren des Kapsids befindet (Abbildung 2B, Einschub). Die Stöchiometrie zwischen Wirt und Gast wurde durch das Verhältnis der Absorption bei $\lambda = 280$ /488 nm bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass bis zu einer

Obergrenze von 45 GFP(+36)-RA pro Kapsid (unter der Annahme, dass AaLS-13 eine $T=3$ -Struktur aus 180 Untereinheiten einnimmt)^[8b] das Verhältnis von Wirt und Gast linear vom Verhältnis abhängt, in dem die beiden Komponenten gemischt wurden (Abbildung 2C). Eine weitere Erhöhung des Mischverhältnisses führte nicht zu höheren Ladungsdichten, sondern zu einer Fällung beider Proteine. Diese Befunde zeigen, dass der Einschluss von bis zu etwa 45 Gästen pro $T=3$ -Kapsid quantitativ ist. Diese Beladungseffizienz ist mit der von GFP(+36) vergleichbar.^[11] Untersuchungen des Beladungsmechanismus lassen vermuten, dass GFP(+36) an die Innenfläche der AaLS-13-Kapsidhülle bindet.^[12] Im Zentrum des Kapsids bleibt dabei genügend Platz für dessen Fusionspartner (Einschub in Abbildung 2B). Ungefähr 1.5 GFP-Moleküle finden auf der Innenseite einer pentameren Untereinheit von AaLS Platz (Abbildung S4). Dies stimmt gut mit dem beobachteten Verhältnis von ca. 45 Gästen pro Kapsid, bestehend aus 180 Untereinheiten, überein (1.25 Gäste pro Pentamer).

Obwohl R10-Peptide erfolgreich verwendet wurden, um GFP und HIV-Protease *in vivo* in den Innenraum des Kapsids zu dirigieren, sind sie im Vergleich zu GFP(+36) für die *In-vitro*-Beladung weniger geeignet. Wenn 18 Äquivalente einer Retroaldolase, die mit einem R10-Peptid versehen ist (RA-R10), mit aufgereinigten AaLS-13-Kapsiden gemischt werden, erhält man lediglich 2.7 ± 1.1 Enzyme pro Kapsid. Diese vergleichsweise schlechte Beladungseffizienz liegt wahrscheinlich in der niedrigen Gesamtladung von RA-R10 begründet (+4.3 bei pH 8.0 im Vergleich zu +29.9 für GFP(+36)-RA und +20.0 für das ursprünglich untersuchte dimere HIV-Protease-R10).

Die Aktivität der eingeschlossenen Retroaldolase hängt von der Packungsdichte ab. Bei niedriger Beladung (z. B. ca. 8 Gäste pro Kapsid) ist der k_{cat} -Wert der GFP(+36)-RA im Kapsid [(0.018 ± 0.001) s⁻¹] gegenüber dem des freien Enzyms nahezu unverändert. Der K_m -Wert ist hingegen etwa 4.5-fach erhöht [(470 ± 120) μ M]. Während sich der k_{cat}/K_m -Wert bei höherer Beladung nur geringfügig ändert, nimmt der k_{cat} -Wert allmählich ab (Abbildung 3B). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Produktinhibierung des Enzyms durch den Aldehyd 2, der ein kovalentes Iminaddukt mit dem katalytischen Lysinrest bilden kann.^[13] Dieser Effekt wird womöglich durch die Erzeugung hoher lokaler Konzentrationen dieser reaktiven Verbindung in der unmittelbaren Umgebung der dichtgepackten Enzyme verstärkt. Analog zu den Kaskadenreaktionen, die in natürlichen bakteriellen Mikrokompartmenten realisiert werden,^[1] sollte es jedoch möglich sein, den Aldehyd mit geeigneten zusätzlichen Enzymen direkt im Kapsid abzubauen.

Die Allgemeingültigkeit der Beladungsstrategie wurde mit sieben weiteren Fusionsenzymen untersucht: eine im Labor evolvierte Kemp-Eliminase (KE),^[14] TEM- β -Lactamase (β Lac),^[15] Cyclohexylamin-Oxidase (CHAO),^[16] Katalase-Peroxidase (KatG),^[17] NADH-Oxidase (NOX),^[18] Aldehyd-Dehydrogenase (AldH)^[19] und Monoamin-Oxidase (MAO).^[20] Diese Proteine decken ein breites Spektrum von Eigenschaften ab, etwa Molekulargewicht (29–78 kDa), quartäre Struktur (Monomer, Dimer und Tetramer) und Gesamtladung (−23.9 bis +2.5 bei pH 8.0; Tabelle S1). Mo-

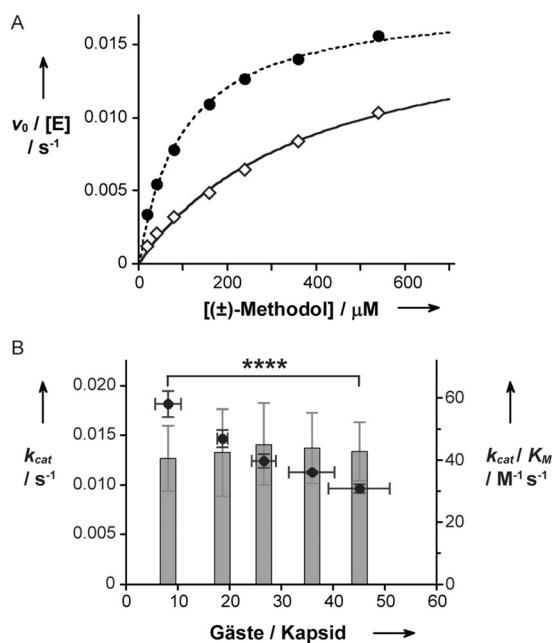


Abbildung 3. Retroaldolase-Aktivität in AaLS-13. A) Michaelis-Menten-Graph für freie GFP(+36)-RA (●) und GFP(+36)-RA in AaLS-13 (○; 8.6 GFP(+36)-RA pro Kapsid). B) k_{cat} (●) und k_{cat}/K_m (graue Säulen) für eingeschlossene GFP(+36)-RA in Abhängigkeit von der Ladungsdichte. Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ****: $P < 0.001$.

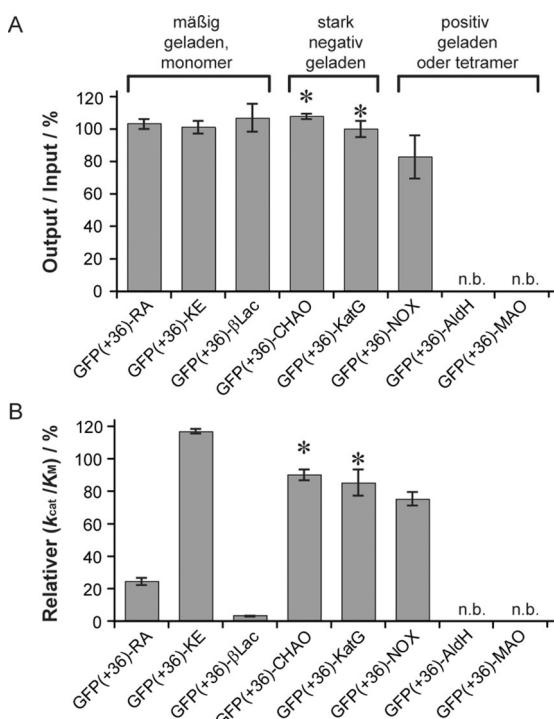


Abbildung 4. Allgemeingültigkeit der Beladungsstrategie. A) Prozent-Output/Input (%) verschiedener GFP(+36)-Fusionsenzyme, die an AaLS-13 binden. B) Relative Aktivität der GFP(+36)-Enzyme/AaLS-13-Komplexe im Vergleich zum freien Fusionsezym. *: Bei diesen Fusionsezymen befinden sich einige Gäste auf der Außenseite des Kapsids (siehe Abbildung S6 C,D). n.b.: nicht bestimmt, da das Protein ausgefallen ist. Details zu den Experimenten sind in den Tabellen S1 und S2 zusammengefasst.

nomere Fusionsenzyme mit gemäßiger Ladung, etwa GFP(+36)-KE und GFP(+36)-βLac, wurden von AaLS-13 ebenso effektiv aufgenommen wie GFP(+36)-RA (Abbildungen 4A und S6A,B, Tabelle S1). Der Einschluss von sehr negativ geladenen Proteinen, wie CHAO und KatG (Tabelle S1), war hingegen weniger eindeutig. Obwohl sowohl GFP(+36)-CHAO als auch GFP(+36)-KatG quantitativ an AaLS-13 binden (Abbildung 4A), sprechen die TEM-Bilder der aufgereinigten Komplexe dafür, dass sich die Gäste – zumindest teilweise – an der Außenwand des Kapsids befinden (Abbildung S6C,D). Dem gegenüber stehen stark positiv geladene Gastproteine, wie das dimere GFP(+36)-NOX mit einer berechneten Gesamtladung von +78.2 bei pH 8.0, deren Ladungseffizienz durch teilweise Präzipitation vermindert wird (Abbildung 4A und Tabelle S1). Im Fall der tetrameren Enzyme AldH und MAO, die jeweils mit vier Molekülen GFP(+36) ausgestattet sind, ist die Proteinfällung sogar noch schwerwiegender. Um diese Proteine erfolgreich einschließen zu können, muss man womöglich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Gästen und Kapsid modulieren.^[21]

Die Substrate der Modellenzyme haben nicht nur sehr verschiedene Molekulargewichte, sondern auch unterschiedliche Ladungen. Erstaunlicherweise behalten GFP(+36)-KE, GFP(+36)-CHAO, GFP(+36)-KatG und GFP(+36)-NOX – im Unterschied zu GFP(+36)-RA – beinahe ihre volle enzymatische Aktivität nach ihrer Beladung in AaLS-13 bei (Abbildung 4B und Tabelle S2). Wenngleich der Mechanismus des molekularen Transports noch nicht verstanden ist, ist die hohe Wechselzahl der eingeschlossenen Kemp-Eliminase (GFP(+36)-KE, $k_{cat} = 380 \text{ s}^{-1}$) bemerkenswert, weil sie darauf schließen lässt, dass das ungeladene Substrat 5-Nitrobenzisoxazol schnell durch die Kapsidhülle diffundieren kann. Die Aktivität von NOX innerhalb des Kapsids zeigt außerdem, dass die Aufnahme negativ geladener Substrate, z.B. NADH, nicht durch die negativ geladene Proteinhülle behindert wird. Problematisch sind allerdings Verbindungen, die direkt mit dem Wirt oder den Gastproteinen reagieren können, so wie Aldehyd 2. Ungünstige Wechselwirkungen zwischen Gastenzymen und der negativ geladenen Kapsidinnenfläche könnten zudem die aktive Tasche blockieren oder inaktive Enzymkonformationen begünstigen und somit die Enzymaktivität beeinträchtigen. Derartige Effekte sind möglicherweise für den >10-fachen Rückgang der katalytischen Effizienz verantwortlich, der bei βLac beobachtet wurde (Abbildung 4B). Trotz dieser Einschränkungen ist die unkomplizierte Beladung von AaLS-13 mit einem breiten Spektrum von Frachtproteinen ein vielversprechender Schritt in Richtung künstlicher Mikrokompartmente für neuartige Anwendungen.

Zusammenfassend wurde hier ein genetisch kodierbares Proteinfragment vorgestellt, mit dessen Hilfe AaLS-13-Proteinkäfige effizient mit aktiven Enzymen beladen werden können. Das entsprechende Verfahren ist einfach und robust. Ohne auf pH- oder Temperaturänderungen zurückgreifen zu müssen, führt das Mischen von Wirt und Gästen unter milden, wässrigen Bedingungen zur Bildung stabiler Komplexe. Bis zu ca. 45 Gästen pro $T=3$ -Kapsid ist der Einschluss jeweils nahezu vollständig, wodurch die Beladungsdichte entspre-

chend präzise kontrolliert werden kann. Während die Beladung der meisten monomeren Enzyme unproblematisch ist, könnte für die Beladung mit negativ geladenen oder oligomeren Proteinen eine Anpassung der Oberflächenladung der Enzyme oder des GFP-Fragments erforderlich sein. Dennoch können nun mithilfe dieses Beladungssystems komplexere Nanoreaktoren durch den gemeinsamen Einschluss verschiedener Enzyme realisiert werden. Gegenwärtig wird in unserem Labor untersucht, inwiefern derartige Kaskaden einen kompetitiven Vorteil erbringen können.

Danksagung

Wir danken Peter Tittmann vom Scientific Center for Optical and Electron Microscopy (ScopeM), ETH Zürich, für seine Hilfe bei der Elektronenmikroskopie. Diese Arbeit wurde von der ETH Zürich und dem Europäischen Forschungsrat (Advanced ERC Grant ERC-dG-2012-321295 für D.H.) gefördert. Y.A. bedankt sich für ein Forschungsstipendium der Uehara Memorial Foundation und ein Postdoktoranden-Stipendium der ETH Zürich (gemeinsam mit dem Marie Curie Aktionsprogramm). R.Z. erhielt ein Stipendium des Stipendienfonds der Schweizerischen Chemischen Industrie (SSCI).

Stichwörter: Enzyme · Lumazin-Synthase · Nanotechnologie · Protein-Engineering · Synthetische Biologie · Wirt-Gast-Systeme

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1531–1534
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1555–1558

- [1] a) A. H. Chen, P. A. Silver, *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 662–670; b) T. O. Yeates, C. A. Kerfeld, S. Heinhorst, G. C. Cannon, J. M. Shively, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 681–691; c) T. O. Yeates, M. C. Thompson, T. A. Bobik, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 223–231.
- [2] a) P. Walde, S. Ichikawa, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 143–177; b) B. Chaize, J.-P. Colletier, M. Winterhalter, D. Fournier, *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* **2004**, *32*, 67–75.
- [3] a) M. Marguet, C. Bonduelle, S. Lecommandoux, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 512–529; b) R. J. R. W. Peters, M. Marguet, S. Marais, M. W. Fraaije, J. C. M. van Hest, S. Lecommandoux, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 146–150; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 150–154.
- [4] a) M. Comellas-Aragonès, H. Engelkamp, V. I. Claessen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. E. Rowan, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, B. J. M. Verduin, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 635–639; b) I. J. Minten, L. J. A. Hendriks, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17771–17773; c) J. E. Glasgow, S. L. Capehart, M. B. Francis, D. Tullman-Ercek, *ACS Nano* **2012**, *6*, 8658–8664; d) J. D. Fiedler, S. D. Brown, J. L. Lau, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9648–9651; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9842–9845; e) A. O’Neil, C. Reichhardt, B. Johnson, P. E. Prevelige, T. Douglas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7425–7428; f) D. P. Patterson, B. Schwarz, K. El-Boubou, J. van der Oost, P. E. Prevelige, T. Douglas, *Soft Matter* **2012**, *8*, 10158–10166; g) D. P. Patterson, P. E. Prevelige, T. Douglas, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5000–5009.
- [5] a) C. Ludwig, R. Wagner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 537–545; b) T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, *312*, 873–875.
- [6] a) J. E. Dueber, G. C. Wu, G. R. Malmirchegini, T. S. Moon, C. J. Petzold, A. V. Ullal, K. L. J. Prather, J. D. Keasling, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 753–759; b) C. J. Delebecque, A. B. Lindner, P. A. Silver, F. A. Aldaye, *Science* **2011**, *333*, 470–474.
- [7] W. F. Rurup, F. Verbij, M. S. T. Koay, C. Blum, V. Subramaniam, J. J. L. M. Cornelissen, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 558–563.
- [8] a) F. P. Seebeck, K. J. Woycechowsky, W. Zhuang, J. P. Rabe, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4516–4517; b) B. Wörsdörfer, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Science* **2011**, *331*, 589–592; c) B. Wörsdörfer, Z. Pianowski, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 909–911.
- [9] L. Giger, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, N. Ban, D. Hilvert, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 494–498.
- [10] Anders als bei GFP(+36) ist die Ausbeute von Kapsid-Gast-Komplexen ausgehend von Kapsidfragmenten für GFP(+36)-RA gering (Abbildung S3). Wahrscheinlich wird die Kapsidbildung durch die Fusionsproteine behindert.
- [11] Wir hatten berichtet, dass AaLS-13 bis zu 100 GFP(+36)-Proteine einschließen kann. Diese Zahl wurde durch die Bestimmung des Proteingehalts mit der Bradford-Methode sowie die Messung der Konzentration von GFP(+36) anhand seiner Fluoreszenz ermittelt.^[8c] Eine unabhängige Bestimmung der Beladungsdichte auf der Basis des Verhältnisses der Absorption bei $\lambda = 280/488$ nm spricht dafür, dass diese damals bestimmten Werte um einen Faktor von ca. 2 zu hoch geschätzt wurden. Ursache ist wahrscheinlich die unterschiedliche Färbung der stark positiv bzw. negativ geladenen GFP(+36)- und AaLS-13-Proteine relativ zu Rinderalbumin, das als Referenz für die Bradford-Bestimmung verwendet wurde.
- [12] R. Zschoche, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.*, DOI: 10.1021/jacs.5b10588..
- [13] J. K. Lassila, D. Baker, D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4937–4942.
- [14] R. Blomberg, H. Kries, D. M. Pinkas, P. R. E. Mittl, M. G. Grüttner, H. K. Privett, S. L. Mayo, D. Hilvert, *Nature* **2013**, *503*, 418–421.
- [15] X. Raquet, J. Lamotte-Brasseur, E. Fonzé, S. Goussard, P. Courvalin, J. M. Frère, *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 625–639.
- [16] H. Iwaki, M. Shimizu, T. Tokuyama, Y. Hasegawa, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 264–268.
- [17] H. Forkl, J. Vandekerckhove, G. Drews, M. H. Tadros, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 251–258.
- [18] H.-J. Park, C. O. A. Reiser, S. Kondruweit, H. Erdmann, R. D. Schmid, M. Sprinzl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 881–885.
- [19] J.-E. Jo, S. M. Raj, C. Rathnasingh, E. Selvakumar, W.-C. Jung, S. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 51–60.
- [20] N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073–4087.
- [21] T. Beck, S. Tetter, M. Künzle, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 937–940; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 951–954.

Eingegangen am 8. September 2015,
veränderte Fassung am 3. November 2015
Online veröffentlicht am 23. Dezember 2015