

Ein alternativer Isovaleryl-CoA-Biosyntheseweg: Beteiligung einer bisher unbekannten 3-Methylglutaconyl-CoA-Decarboxylase**

Yanyan Li, Eva Luxenburger und Rolf Müller*

Myxobakterien gehören zu den schwärmenden Mikroorganismen, die durch ihr soziales Verhalten und ihren komplexen Entwicklungszyklus charakterisiert sind.^[1] Sie ernähren sich unter anderem von anderen Bakterien oder Pilzen. Unter Hungerbedingungen lagern sich die vegetativen Zellen zu einem vielzelligen Fruchtkörper zusammen. Um diesen außergewöhnlichen Lebensstil zu unterstützen, weisen Myxobakterien ein enormes metabolisches Potenzial auf, was sich in der Entdeckung neuer Substanzen und ungewöhnlicher biochemischer Stoffwechselwege in den letzten Jahren widerspiegelt.^[2] Ein Beispiel ist die Biosynthese von Isovaleryl-Coenzym A (IV-CoA), für das kürzlich ein zusätzlicher, alternativer Biosyntheseweg vorgeschlagen wurde.^[3] IV-CoA wird allgemein durch Leucin-Abbau über Transaminierung und anschließende oxidative Decarboxylierung durch den verzweigt-kettigen α -Ketosaure-Dehydrogenase (Bkd)-Komplex hergestellt.^[4] Der Bkd-Komplex ist ebenso am Abbau von Valin und Isoleucin beteiligt, wodurch Isobutyryl-CoA bzw. 2-Methylbutyryl-CoA entstehen. Diese Vorläufer bilden den Ausgangspunkt für die Synthese von verzweigt-kettigen (iso-)Fettsäuren (FA), die in Myxobakterien von besonderer Bedeutung sind. Von IV-CoA abgeleitete ungeradzahlige iso-FAs sind dabei die Hauptvertreter, wie im Modell-Myxobakterium *Myxococcus xanthus* dargelegt wurde.^[5,6] Sie erhalten die Membranfluidität, was thermische Anpassung ermöglicht. Ebenso spielen sie eine Schlüsselrolle als Signalfstoffe während des Differenzierungsprozesses der Myxobakterien.^[7–11] Neben seiner Rolle in der Biogenese ungeradzahliger iso-FAs ist IV-CoA der Vorläufer einer Reihe von myxobakteriellen Sekundärmetaboliten, wie Myxothiazol^[12,13] und Aurafuron.^[14] Während unserer Untersuchung der Myxothiazol-Biosynthese analysierten wir *bkd*-Mutanten von *M. xanthus* und *Stigmatella aurantiaca* und zeigten, dass iso-FA und Myxothiazol weiterhin in diesen Mutanten produziert wurden, wenn auch in niedrigerer Menge. Dies lie-

ferte den ersten Hinweis auf die Existenz eines alternativen Biosynthesewegs für IV-CoA. Die *bkd*-Mutanten konnten markiertes Acetat, aber kein Leucin, in die von IV-CoA abgeleiteten Substanzen inkorporieren. Durch die Analyse zeigte sich ein ähnliches Markierungsmuster, wie es bei mevalonatabhängig gebildeten Isoprenoiden vorkommt, sodass eine Verbindung zwischen dem hypothetischen IV-CoA und dem Mevalonatweg wahrscheinlich erschien.^[3,15] 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) wurde als Verzweigungspunkt vorgeschlagen, von welchem die Rückreaktionen des Leucin-Abbaus ausgehen und zu IV-CoA führen würden (Abbildung 1). Fütterungsstudien und die Analyse einer Doppelmutante *bkd*–*lmvaS*– (*mvaS* codiert die HMG-CoA-Synthase) bewiesen die Beteiligung von HMG-CoA und das Auftreten des Intermediats 3,3-Dimethylacrylyl-CoA (DMA-CoA; gezeigt durch Einbau von markierter 3,3-Dimethylacrylsäure, welche die Aktivierung zum CoA-Ester durchlaufen muss) im alternativen Syntheseweg.^[7,15] Sowohl in der *bkd*-Mutante als auch während der Fruchtkörperbildung, wenn Leucin-abgeleitetes IV-CoA begrenzt ist,^[7] war dieser Pfad hoch aktiv, was die wichtige Funktion von IV-CoA-abgeleiteten Substanzen für den Lebenszyklus von Myxobakterien widerspiegelt.

Mit dem Ziel, die Gene zu identifizieren, welche für den alternativen Pfad von Bedeutung sind, verglichen wir umfassende Genexpressionsmuster vegetativer Zellen des Wildtyps und der *bkd*-Mutante von *M. xanthus* DK1622.^[16] Dabei zeigte sich, dass *mvaS* Teil eines fünf Gene enthaltenden Operons ist (MXAN_4263 bis MXAN_4267), dessen Expression in der *bkd*-Mutante stark induziert ist. Geninaktivierung und Komplementierungsexperimente bestätigten deren Beteiligung am alternativen Syntheseweg von IV-CoA.^[16] Deshalb erfolgte eine Umbenennung zu *aib*-Operon (alternative IV-CoA-Biosynthese). Zusätzlich zur HMG-CoA-Synthase codiert das Operon Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu einem TetR-ähnlichen Transkriptionsregulator (AibR), einer Glutaconat-CoA-Transferase (Gct)-Untereinheit A und B (AibA/B) und einer Dehydrogenase (AibC). Unter Verwendung von homologen Genen aus *Pseudomonas* als Vergleichsbasis identifizierten wir weitere im Leucin-Katabolismus zum Einsatz kommende Gene und analysierten deren Funktion in vivo. So wurde gezeigt, dass *liuC* (MXAN_3757), welches eine 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase codiert, am alternativen Syntheseweg beteiligt ist.^[16] Zusammengefasst wurde vermutet, dass dieser Weg seinen Verlauf über die LiuC-katalysierte Dehydratisierung von HMG-CoA nimmt, gefolgt von einer Decarboxylierung und anschließender Reduktion zu IV-CoA (Abbildung 1). Die beiden letztgenannten Schritte würden jeweils durch ein Heterodimer, bestehend aus AibA/B bzw. durch AibC kata-

[*] Dr. Y. Li,^[†] E. Luxenburger, Prof. Dr. R. Müller
Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland,
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung und Pharmazeutische
Biotechnologie, Universität des Saarlandes
66041 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de

[†] Aktuelle Adresse: CNRS, National Museum of Natural History, Laboratory of Communication Molecules and Adaptation of Microorganisms, UMR 7245, 75005 Paris (Frankreich)

[**] Wir danken Prof. Wolfgang Buckel, Universität Marburg, für das Expressionsplasmid der rekombinanten Glutaconat-CoA-Transferase. Diese Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201207984> zu finden.

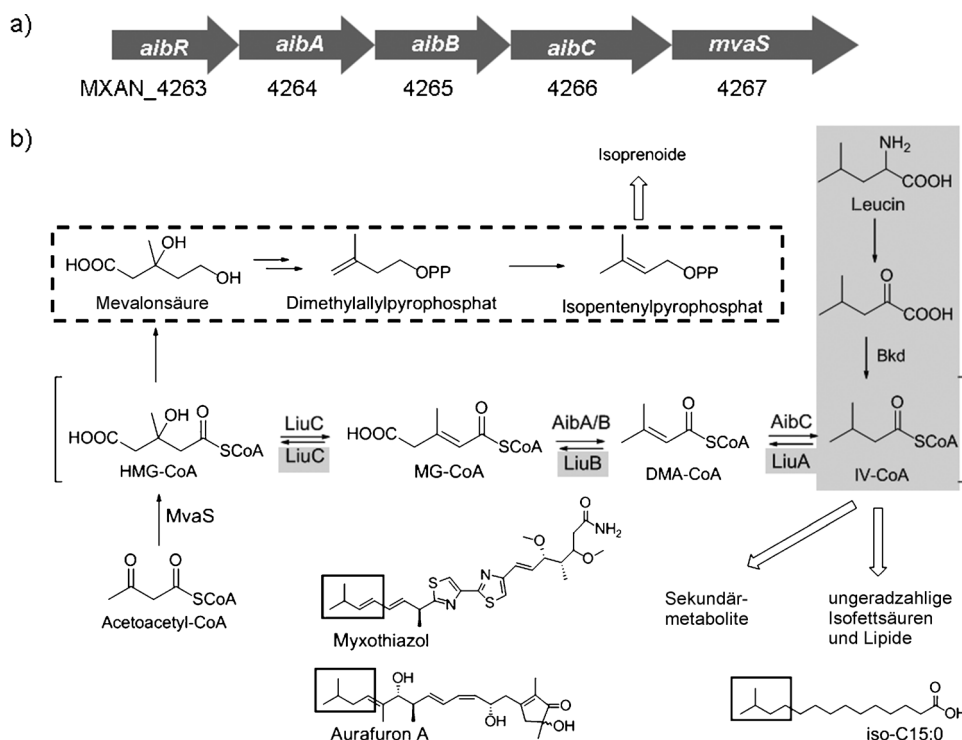


Abbildung 1. a) Genanordnung des *aib*-Operons in *M. xanthus*. b) Stoffwechselweg der alternativen IV-CoA-Biosynthese (in Klammern), des Leucin-Abbaus (grau) und der Mevalonat-abhängigen Isoprenoid-Biosynthese (Kasten mit gestrichelten Linien) in Myxobakterien. Von IV-CoA abgeleitete Strukturelemente sind eingrahmt.

lysiert. In dieser Arbeit überprüften wir die vorhergesagten Funktionen jedes Enzyms *in vitro* bis hin zur kompletten Nachstellung des alternativen Biosynthesewegs von IV-CoA. Während in vorausgegangenen Studien die Funktion von AibA/B als CoA-Transferase angenommen wurde, konnten wir diesen nun als neuartige MG-CoA-Decarboxylase charakterisieren, die vermutlich aus einer CoA-Transferase evolviert ist.

Mit dem Ziel, die Decarboxylaseaktivität des MG-CoA zu charakterisieren, synthetisierten wir MG-CoA aus (*E,Z*)-3-Methylglutaconat mittels rekombinanter Gct von *Acidaminococcus fermentans*.^[17] Aufgrund der Substratspezifität bakterieller Gcts wurde nur das (*E*)-Isomer von MG-CoA produziert, welches das in Zellen natürlich vorkommende Isomer ist.^[18] Da die Sequenzanalyse die nahe Übereinstimmung von AibA und AibB zu zwei Untereinheiten einer CoA-Transferase aufdeckte,^[16] nahmen wir an, dass die beiden Enzyme höchstwahrscheinlich als Komplex agieren. Beide Proteine wurden in *Escherichia coli* mit N-terminalen His₆-tags coexprimiert und gemeinsam mittels Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt. AibA und AibB eluierten ab einer Konzentration von 200 mM Imidazol zusammen in einem Verhältnis von nahezu 1:1 (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Mittels Größenausschlusschromatographie wurde das Molekulargewicht des Komplexes zu 57.9 Da bestimmt, was der Anordnung des Heterodimers entspricht (AibA: 30 kDa, AibB: 28 kDa). Die Aktivitätsüberprüfung erfolgte mit MG-CoA bei 37 °C für 3 Stunden. Anschließend Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

gekoppelt mit massenspektrometrischer Analyse (HPLC-MS) ließ die Produktion einer neuen Substanz in der Reaktion erkennen, deren chromatographische Eigenschaften identisch zu DMA-CoA sind (*R*_t = 17.8 min, *m/z* [*M* + *H*]⁺ 850). Hochauflösende MS-Messungen (HR-MS) bestätigten weiterhin seine Identität als DMA-CoA, dem decarboxylierten Produkt von MG-CoA (berechnete monoisotopische Masse für C₂₆H₄₃N₇O₁₇P₃S *m/z* [*M* + *H*]⁺ 850.16490, gemessene Masse 850.16336, Δ = −1.8 ppm). In der Kontrollprobe mit hitzeinaktiviertem AibA/B konnte kein DMA-CoA detektiert werden (Abbildung 2). Beim Einsatz von HMG-CoA als Substrat wurde keine Umsetzung beobachtet. Um zu verdeutlichen, dass der Zusammenschluss von AibA und AibB für die Aktivität der MG-CoA-Decarboxylase notwendig ist, wurde jedes Enzym einzeln exprimiert und aufge-

reinigt. Während rekombinantes AibA sehr gut löslich war, wurde AibB hauptsächlich als Einschlusskörper produziert, was in sehr geringem Ertrag resultierte (Abbildung S1). Wie erwartet zeigten AibA und AibB einzeln keinen Umsatz mit MG-CoA. Demgegenüber konnte die Aktivität durch Zugabe beider Enzyme in einem molaren Verhältnis von 1:1 wiederhergestellt werden, auch wenn die DMA-CoA-Produktion sehr gering war (Abbildung S2). Dies kommt wahrscheinlich durch die suboptimale Komplexbildung zustande, wenn AibA und AibB nicht gemeinsam exprimiert werden. Dennoch bestätigen diese Ergebnisse eindeutig, dass sowohl AibA als auch AibB als zwei Untereinheiten für die Bildung der MG-CoA Decarboxylase erforderlich sind.

Die größte Übereinstimmung zeigt AibA/AibB zu seinem Strukturhomolog Gct von *A. fermentans*,^[19] bei welcher Glu54 in der B-Untereinheit als katalytischer Bestandteil identifiziert wurde, der in anderen bakteriellen Gcts hochkonserviert ist.^[17,20] Sequenzvergleiche von AibB mit der B-Untereinheit von Gcts deckten den Austausch des Glu54 durch ein Cys in AibB auf (entsprechend der AibB-Bezeichnung Cys56, Abbildung 3). Daher gingen wir der Frage nach, ob Cys56 eine Rolle in der Katalyse spielt und ob wir AibA/B zu einer funktionsfähigen Gct umwandeln können. Wir führten eine zielgerichtete Mutagenese an *aibB* durch, um Expressionskonstrukte für die Mutanten AibB_C56E und AibB_C56D herzustellen. Die der MG-CoA-Decarboxylase-Aktivität der daraus resultierenden Komplexe AibA/B_C56E und AibA/B_C56D reduzierten sich auf 13 % bzw. 1.2 %, verglichen zum Wildtyp-Enzym. Um die CoA-Transferase-Aktivität zu cha-

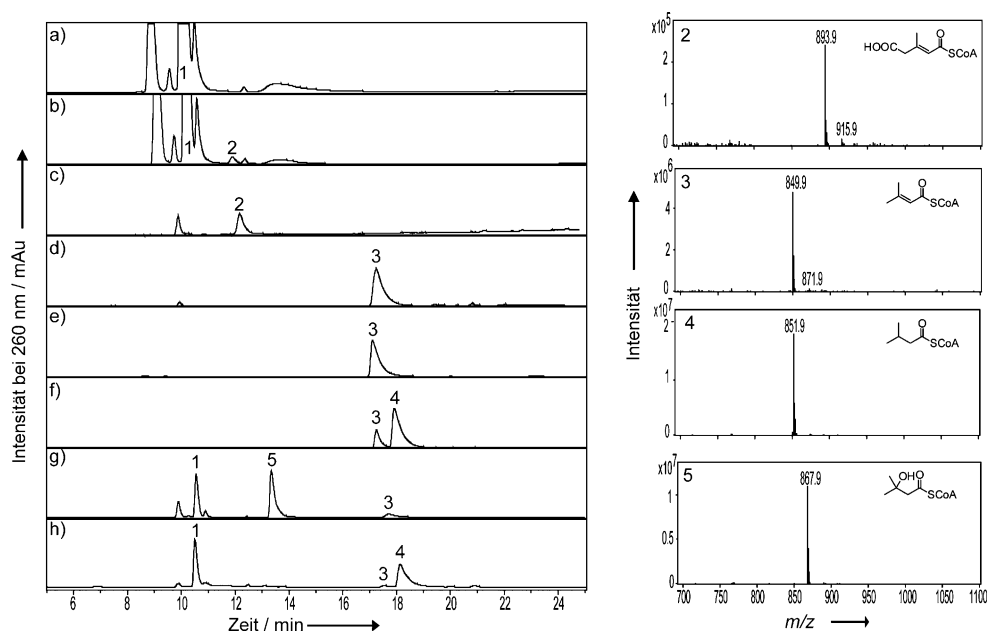


Abbildung 2. In-vitro-Charakterisierung der Aib-Enzyme. Linke Spalte: HPLC-UV-Spuren der Enzym-Versuche bei 260 nm. a) HMG-CoA; b) HMG-CoA mit LiuC; c) MG-CoA mit inaktiviertem AibA/B; d) MG-CoA mit AibA/B; e) DMA-CoA mit inaktiviertem AibC; f) DMA-CoA mit AibC; g) HMG-CoA mit LiuC und AibA/B; h) HMG-CoA mit LiuC, AibA/B und AibC. Chromatographische Intensitäten sind in (a) und (b) zehnfach erhöht. 1 HMG-CoA, 2 MG-CoA, 3 DMA-CoA, 4 IV-CoA, 5 3-Methylhydroxybutyryl-CoA. Rechte Spalte: Massenspektren der enzymatischen Produkte.

Charakterisieren, führten wir Versuche mit (*E,Z*)-Methylglutaconat (20 mM) und Acetyl-CoA (1 mM) als Substrat durch. Weder das native Enzym noch die beiden Mutanten waren zur MG-CoA-Produktion fähig. Erstaunlicherweise wurden signifikante Mengen an CoA in den Reaktionen der Mutanten-Enzyme detektiert, was auf eine Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität hindeutet. Um dies zu bestätigen, wurde Acetyl-CoA (1 mM) 3 h mit dem WT oder den mutierten AibA/B-Komplexen inkubiert. Durch die C56D- und C56E-

Mutanten wurden etwa 60 % bzw. 30 % des Acetyl-CoA hydrolysiert, während der WT nicht zur CoA-Produktion führte (Abbildung S3). Diese Experimente demonstrieren die Wichtigkeit von Cys56 für die katalytische Wirkung von AibA/B.

Rekombinantes LiuC (29 kDa) wurde in verschiedenen Puffern von pH 6–8 mit HMG-CoA inkubiert. In allen Fällen wurden winzige Mengen an MG-CoA produziert und dessen Identität anhand von synthetischem MG-CoA als Referenz bestätigt (Abbildung 2). Außerdem wurde das Produkt per HR-MS vermessen und stimmt gut mit MG-CoA überein (berechnete monoisotopische Masse für $C_{27}H_{43}N_7O_{19}P_3S$ m/z $[M+H]^+$ 894.15473, gemessene Masse 894.15351, $\Delta = -1.4$ ppm). Zugabe von AibA/B-Komplex zum LiuC-Reaktionsgemisch führte zur Bildung von DMA-CoA. Dies belegt eindeutig die HMG-CoA-Dehydratase-Aktivität von LiuC. Überraschenderweise wurde in der HPLC- und HR-MS-Analyse neben dem DMA-CoA-Peak ein weiterer Peak entdeckt, der in seiner Masse mit 3-Methylhydroxybutyryl-CoA übereinstimmt (berechnete monoisotopische Masse für $C_{26}H_{45}N_7O_{18}P_3S$ m/z $[M+H]^+$ 868.17546, gemessene Masse 868.17476, $\Delta = -0.8$ ppm). Dies ergibt sich wahrscheinlich aus einer durch LiuC katalysierten Hydratisierung von DMA-

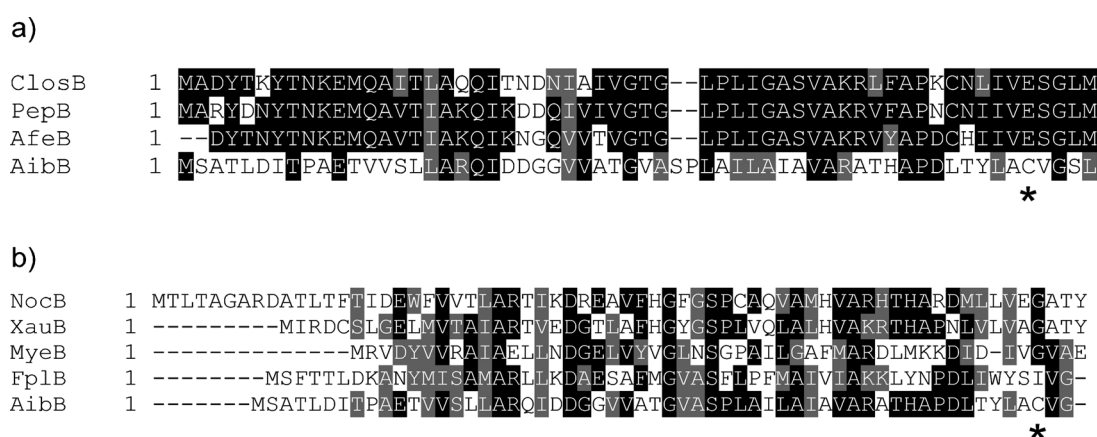


Abbildung 3. a) Sequenzabgleich von AibB mit der Untereinheit B anderer Gcts. AfeB: Gct aus *A. fermentans* Untereinheit B; CloSB: CBK77199.1 aus *Clostridium cf. saccharolyticum*; PepB: EFI41745.1 aus *Peptoniphilus* sp. Der Stern (*) markiert das Glu im aktiven Zentrum. b) Sequenzabgleich von AibB mit homologen Proteinen. NocB: YP_919290.1 aus *Nocardioides* sp. JS614; XauB: YP_001409505.1 aus *Xanthobacter autotrophicus* Py2; MyeB: ZP_09705801.1 aus *Metallosphaera yellowstonensis* MK1; FplB: YP_003435597.1 aus *Ferroplasma acidophilum* DSM10642. Der Stern (*) markiert Cys56 in AibB.

CoA. Als nächstes untersuchten wir die Substratspezifität von LiuC. LiuC konnte effizient DMA-CoA und Crotonyl-CoA hydratisieren (Abbildung S4a). Dieser Befund ist im Einklang mit Ergebnissen bisheriger Studien über verschiedene MG-CoA-Hydratasen.^[21–24] In LiuC finden sich zwei konservierte Glutamat-Reste, die entscheidend für die katalytische Wirkung sind, wie für das menschliche Enzym AUH (Gly144 bzw. 164 entsprechend der AUH-Bezeichnung, Abbildung S4b)^[23] gezeigt wurde. Daher ist das Enzym zur Aufnahme von Substraten in der Lage, denen die γ -Carboxygruppe fehlt.

Wir vermuteten, dass der letzte Schritt des alternativen Synthesewegs die Reduktion von DMA-CoA beinhaltet. Deshalb wurde rekombinantes AibC (38 kDa) in Anwesenheit von NADH mit DMA-CoA zusammengebracht, was zur Bildung eines neuen Produkts mit den Eigenschaften von IV-CoA führte ($R_t = 18.2$ min, HR-MS: berechnete monoisotopische Masse für $C_{26}H_{45}N_7O_{17}P_3S$ m/z $[M+H]^+$ 852.18055, gemessene Masse 852.17877, $\Delta = -2.1$ ppm) (Abbildung 2). Demzufolge wird AibC als IV-CoA-Dehydrogenase bezeichnet. Die Anwesenheit von EDTA (5 mM; Ethylendiamintetraessigsäure) beeinflusste die Aktivität von AibC nicht, was darauf hinweist, dass keine Metallionen als Co-faktoren für die Funktion von AibC erforderlich sind. Zur Rekonstitution der kompletten alternativen Biosynthese wurde HMG-CoA mit gleichen Mengen an LiuC, AibA/B und AibC in Anwesenheit von NADH inkubiert. Wie erwartet, resultierte daraus IV-CoA als Hauptprodukt (Abbildung 2).

Zusammengefasst führten wir die Charakterisierung des neuen Biosynthesewegs von Isovaleryl-CoA in vitro durch und lieferten so endgültige Belege für den aufgestellten neuen Pfad. Faszinierenderweise beinhaltet diese Route Umkehrschritte des Leucin-Abbaus. Gene, die für MvaS, AibA-C und auch für den vermeintlichen pfadspezifischen Regulator (AibR) codieren, sind in einem Operon angeordnet, was einen Vorteil für die koordinierte Regulation darstellt, wenn das Leucin-Angebot begrenzt ist. Dies ist z. B. bei Nährstoffmangel der Fall, welcher zur Fruchtkörperbildung führt. Auf der anderen Seite ist *liuC* an einem anderen Genort lokalisiert und unterliegt daher anderen transkriptionellen Kontrollen (z. B. ist *liuC* in der *bkd*-Mutante von *M. xanthus* nicht hochreguliert).^[16] Diese unterschiedliche Regulation des *aib*-Operons und von *liuC* kann für die Gewährleistung einer ausbalancierten Verteilung von HMG-CoA zwischen der IV-CoA-Synthese und dem Mevalonat-Pfad wichtig sein. Darüber hinaus ist LiuC eine ungewöhnliche bakterielle MG-CoA-Hydratase, und ihre geringe Aktivität gegenüber typischen Substraten ist vermutlich ein wesentliches Merkmal, welches die Bedeutung in der parallelen Regulation zweier Stoffwechselwege widerspiegelt. Um herauszufinden, ob der neue Verzweigungsweg auch in anderen Bakterien vorkommt, nutzten wir die Sequenzen von *aibA* und *aibB*, um verfügbare bakterielle Genome auf Homologe hin zu analysieren. Dies zeigte die hohe Konservierung des *aib*-Operons in Myxobakteriengruppen, von denen die meisten zur Unterordnung Cystobacterineae gehören (Tabelle S1). Die alternative Synthese von IV-CoA ist daher wahrscheinlich einzigartig für eine Reihe von Myxobakterien, eine Eigenschaft, die zu

ihrem speziellen Lebensstil passt. Dennoch können wir die Möglichkeit nicht ausschließen, dass *aib*-Gene in anderen Bakterien auf diverse Genorte verteilt sind.

Der entscheidende Schritt des neuen Pfads ist die Umwandlung von MG-CoA zu DMA-CoA, welche durch eine bislang völlig unbekannte MG-CoA-Decarboxylase (AibA/B) katalysiert wird. Die Funktion von AibA/B ähnelt der ECH2-Domäne von CurF, welche an der Biosynthese des cyanobakteriellen Stoffwechselprodukts Curacin A beteiligt ist.^[25] CurF ECH2 gehört zu der übergeordneten Familie der Crotonasen und katalysiert die Decarboxylierung einer an ein Acylcarrierprotein (ACP) gebundenen 3-Methylglutaconyl-Gruppe zu DMA-ACP. Strukturell weist AibA/B wahrscheinlich eine ähnliche Faltung wie CoA-Transferasen auf, obwohl sie unterschiedliche Oligomerisierungsgrade haben. AibA/B ist ein Heterodimer, wohingegen Gct als Tetramer aus Heterodimeren vorliegt, wie am Beispiel der Gct von *A. fermentans* gezeigt wurde.^[19] AibA/B zeigt gewisse mechanistische Ähnlichkeit zu CurF ECH2^[26] und verwandten Crotonasen. Diese weisen ein Thioesterenolat-Anion als Intermediat auf, welches durch zwei aus dem Proteinrückgrat stammenden Aminogruppen stabilisiert wird, die eine Oxyanion-Lücke bilden. Solche Wasserstoffbrücken-bildenden Reste wurden auch in der Struktur der Gct von *A. fermentans* identifiziert. Das aktive Zentrum Cys56 in AibB könnte als Protonendonator für die C-4-Position des decarboxylierten Produkts wirken (Abbildung S5). Wie genau AibA/B die CoA-Transferase-Struktur adaptiert hat, um die CoA-Decarboxylierung zu katalysieren, ist eine fesselnde Frage, die weiterer Arbeiten der Strukturanalyse motiviert. Gcts setzen ein katalytisches Glutamat ein, um während des Reaktionszyklus abwechselnd die Bildung eines Enzym-gebundenen Anhydrids und eines Thioesters zu ermöglichen.^[27] Der Austausch des entsprechenden Restes in AibB (Cys56) gegen Glu oder Asp reduzierte die MG-CoA-Decarboxylase-Aktivität enorm, hatte aber eine Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität zur Folge, welche auf einen Anhydrid-Mechanismus zurückgeführt werden könnte, der dem von Gcts ähnelt (Abbildung S6). Allerdings war der Ersatz einer einzelnen Aminosäure nicht ausreichend, um AibA/B in eine CoA-Transferase umzuwandeln. Dieser Befund lässt vermuten, dass AibA/B wahrscheinlich einer Umgestaltung des aktiven Zentrums ausgesetzt war, um die Decarboxylierung zu ermöglichen, wobei die allgemeine CoA-Transferase-Struktur erhalten blieb. AibB zeigt moderate Homologien zu anderen in der Datenbank als CoA-Transferase-Untereinheit B annotierten Proteinen (etwa 30 % Sequenzübereinstimmung), von denen keines ein Glu im aktiven Zentrum enthält. Dies deutet darauf hin, dass all diese Proteine wahrscheinlich keine CoA-Transferase-Reaktionen katalysieren.

Diese Untersuchung verdeutlicht die Bedeutung tiefgreifender biochemischen Studien, welche dringend erforderlich sind, um das enorme Potenzial verfügbarer Genomsequenzen auszunutzen. Dies gilt nicht nur, um die zugrundeliegenden biochemischen Prinzipien zu verstehen, sondern auch um neue Biokatalysatoren zu identifizieren. In dieser Hinsicht sind unsere Ergebnisse auch für die Forschung hin zur Herstellung von biobasierten Treibstoffen von Bedeutung, da der neue Weg zu IV-CoA Möglichkeiten für syn-

thetisch-biologische Herangehensweisen bietet, um Isobuten als Vorläufer erneuerbarer Kraftstoffe und Chemikalien ausgehend von Glucose herzustellen.^[28]

Eingegangen am 3. Oktober 2012

Online veröffentlicht am 6. Dezember 2012

Stichwörter: Biosynthese · Decarboxylase · Isovaleryl-CoA · Leucin-Abbau · Myxobakterien

- [1] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [2] S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1211–1224.
- [3] T. Mahmud, H. B. Bode, B. Silakowski, R. M. Kroppenstedt, M. Xu, S. Nordhoff, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32768–32774.
- [4] G. Michal in *Biochemical Pathways*, Spektrum, Heidelberg, **1999**.
- [5] H. B. Bode, J. S. Dickschat, R. M. Kroppenstedt, S. Schulz, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 532–533.
- [6] J. S. Dickschat, H. B. Bode, R. M. Kroppenstedt, R. Müller, S. Schulz, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2824–2831.
- [7] H. B. Bode, M. W. Ring, G. Schwar, R. M. Kroppenstedt, D. Kaiser, R. Müller, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 6524–6528.
- [8] J. Downward, D. Toal, *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 171–175.
- [9] E. Hoiczky, M. W. Ring, C. A. McHugh, G. Schwar, E. Bode, D. Krug, M. O. Altmeyer, J. Z. Lu, H. B. Bode, *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 497–517.
- [10] M. W. Ring, G. Schwar, V. Thiel, J. S. Dickschat, R. M. Kroppenstedt, S. Schulz, H. B. Bode, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36691–36700.
- [11] D. R. Toal, S. W. Clifton, B. A. Roe, J. Downard, *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 177–189.
- [12] B. Silakowski, H. U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blocker, G. Höfle, S. Beyer, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37391–37399.
- [13] W. Trowitzsch, G. Reifensahl, V. Wray, K. Gerth, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1480–1490.
- [14] B. Kunze, H. Reichenbach, R. Müller, G. Höfle, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 244–251.
- [15] T. Mahmud, S. C. Wenzel, E. Wan, K. W. Wen, H. B. Bode, N. Gaitatzis, R. Müller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 322–330.
- [16] H. B. Bode, M. W. Ring, G. Schwar, M. O. Altmeyer, C. Kegler, I. R. Jose, M. Singer, R. Müller, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 128–140.
- [17] M. Mack, K. Bendrat, O. Zelder, E. Eckel, D. Linder, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 41–51.
- [18] B. Messner, H. Eggerer, J. Cornforth, R. Mallaby, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *53*, 255–264.
- [19] U. Jacob, M. Mack, T. Clausen, R. Huber, W. Buckel, A. Messerschmidt, *Structure* **1997**, *5*, 415–426.
- [20] M. Mack, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1995**, *357*, 145–148.
- [21] L. E. Brennan, J. Nakagawa, D. Egger, K. Bienz, C. Moroni, *Gene* **1999**, *228*, 85–91.
- [22] K. Kurimoto, S. Fukai, O. Nureki, Y. Muto, S. Yokoyama, *Structure* **2001**, *9*, 1253–1263.
- [23] M. Mack, U. Schniegler-Mattox, V. Peters, G. F. Hoffmann, M. Liesert, W. Buckel, J. Zschocke, *FEBS J.* **2006**, *273*, 2012–2022.
- [24] B. J. Wong, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4646–4654.
- [25] L. Gu, J. Jia, H. Liu, K. Hakansson, W. H. Gerwick, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9014–9015.
- [26] T. W. Geders, L. Gu, J. C. Mowers, H. Liu, W. H. Gerwick, K. Hakansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35954–35963.
- [27] W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *64*, 263–267.
- [28] A. Dhar, K. Dhar, J. P. Rosazza, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 81–87.