

Klassifizierung und Manipulation des synthetischen Potenzials carboxylierender Reduktasen aus dem Zentralmetabolismus und der Polyketid-Biosynthese

Dominik M. Peter, Lennart Schada von Borzyskowski, Patrick Kiefer, Philipp Christen, Julia A. Vorholt und Tobias J. Erb*

Abstract: Die kürzlich entdeckte Enzymklasse carboxylierender Enoylthioester-Reduktasen (ECRs) katalysiert die Addition von molekularem CO₂ an die Doppelbindung α,β -ungesättigter CoA-Thioester. ECRs besitzen zwei bekannte biologische Funktionen. Im Primärstoffwechsel einer Vielzahl Bakterien katalysieren sie die Bildung von Ethylmalonyl-CoA zur Assimilierung des Zentralmetaboliten Acetyl-CoA. Im Sekundärstoffwechsel katalysieren sie die Bildung einer Vielzahl verschiedener α -carboxylierter Acylthioester, die dazu dienen, Variationen in der chemischen Grundstruktur von Polyketid-Naturstoffen zu erzeugen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Substratspezifität verschiedener ECRs mithilfe einer Substratbibliothek systematisch untersucht. Es wurden drei Aminosäuren im aktiven Zentrum von ECRs identifiziert, die ECRs mit eingeschränktem Substratspektrum von ECRs mit einem flexiblen Substratspektrum unterscheiden. Dies wurde experimentell durch das gezielte Design des aktiven Zentrums einer ausgewählten ECR bestätigt. Die vorliegende Studie erklärt die molekulare Grundlage einer Schlüsselreaktion in der Biosynthese von Naturstoffen, was es erlaubt, die Spezifität von ECRs zukünftig nicht nur vorherzusagen, sondern auch gezielt zu manipulieren.

Das biosynthetische Potential der Natur wird eindrucksvoll durch die Diversität des Sekundärmetabolismus demonstriert, aus dem bis heute mehr als 325 000 verschiedene Naturstoffe isoliert werden konnten.^[1] Obwohl sekundäre Naturstoffe sich stark in ihrem chemischen Aufbau und ihrer biologischen Wirkung unterscheiden,^[2] wird das komplexe Grundgerüst dieser Verbindungen aus letztendlich chemisch einfachen Bausteinen, sogenannten Extender-Einheiten aufgebaut.^[3] Ein bekanntes Beispiel sind die Polyketide, die durch mehrere Claisen-Kondensationen aus α -carboxylierten Acylthioester-Einheiten synthetisiert werden.^[4] Die Stan-

dardbausteine, die in der Polyketid-Biosynthese Verwendung finden, sind Malonyl-Coenzym A (CoA) und Methylmalonyl-CoA, welche durch Enzyme des Fettsäurestoffwechsels, die Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA in der α -Position carboxylieren, bereitgestellt werden.^[5] Eine stetig wachsende Anzahl an Polyketiden scheint von diesem Prinzip abzuweichen, indem sie Variationen im chemischen Grundgerüst zeigen, die durch den Einbau nicht-kanonischer Bausteine erzeugt wurden.^[6] Als nicht-kanonische Extender-Einheiten dienen unter anderem Ethylmalonyl-CoA^[7] Chlorethylmalonyl-CoA,^[8] Propylmalonyl-CoA^[9] und weitere längerkettige Abkömmlinge,^[10] sowie Isobutylmalonyl-CoA^[7b] und andere Analoge mit verzweigter Fettsäurekette.^[11]

Diese ungewöhnlichen Polyketid-Extender-Einheiten werden durch die reduktive Carboxylierung α,β -ungesättigter Acyl-CoA-Thioester synthetisiert. Die an diesem Prozess beteiligte Enzymklasse carboxylierender Enoylthioester-Reduktasen (ECRs) wurde erst kürzlich identifiziert. Der bekannteste und beststudierte Vertreter ist die Crotonyl-CoA-Carboxylase/Reduktase (Ccr), die die NADPH-abhängige Carboxylierung von Crotonyl-CoA zu Ethylmalonyl-CoA katalysiert und gleichzeitig das effizienteste CO₂-fixierende Enzym repräsentiert, das bis heute entdeckt wurde.^[12] Aktuell zählen mehr als 900 Homologe zur ECR-Familie, die aus physiologischer Sicht in zwei Unterfamilien eingeteilt werden kann: eine Unterfamilie von „Primärstoffwechsel-Ccrs“ (ECR-1), welche im Ethylmalonyl-CoA-Weg, einem kürzlich entdeckten Zentralstoffwechselweg zur Acetyl-CoA-Assimilierung dienen,^[13] sowie eine Unterfamilie von „Sekundärstoffwechsel-ECRs“ (ECR-2), welche mit der Polyketid-Biosynthese assoziiert sind.^[6]

Obwohl ECRs Schlüsselenzyme in der Variation des chemischen Grundgerüsts von Polyketiden darstellen, ist erstaunlich wenig über ihre Struktur und ihren Reaktionsmechanismus bekannt.^[14] Solche Informationen sind jedoch notwendig, 1) um zu verstehen, welche Faktoren den Einbau und die Kontrolle nicht-kanonischer Extender-Einheiten in der Polyketid-Kette bestimmen, 2) um neuentdeckten ECR-Genen die korrekte biosynthetische Funktion zuzuweisen und Polyketid-Strukturen durch genomische Analyse vorhersagen zu können und 3) um die ECR-Reaktion und damit die Biosynthese von Polyketiden gezielt modifizieren zu können.

Aus diesen Gründen wurden hier die molekularen Grundlagen der ECR-Substratspezifität genauer untersucht. Dazu wurde zunächst eine Bibliothek verschiedener Enoyl-CoA-Thioester synthetisiert, die das Spektrum natürlicher

[*] M. Sc. D. M. Peter, M. Sc. L. Schada von Borzyskowski, Dr. T. J. Erb
Biochemie & Synthetische Biologie des Mikrobiellen Metabolismus,
Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)
E-Mail: toerb@mpi-marburg.mpg.de

M. Sc. D. M. Peter, M. Sc. L. Schada von Borzyskowski, Dr. P. Kiefer,
P. Christen, Prof. J. A. Vorholt, Dr. T. J. Erb
Institut für Mikrobiologie
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich
Vladimir-Prelog-Weg 4, 8050 Zürich (Schweiz)

Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem
Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505282> zu finden.

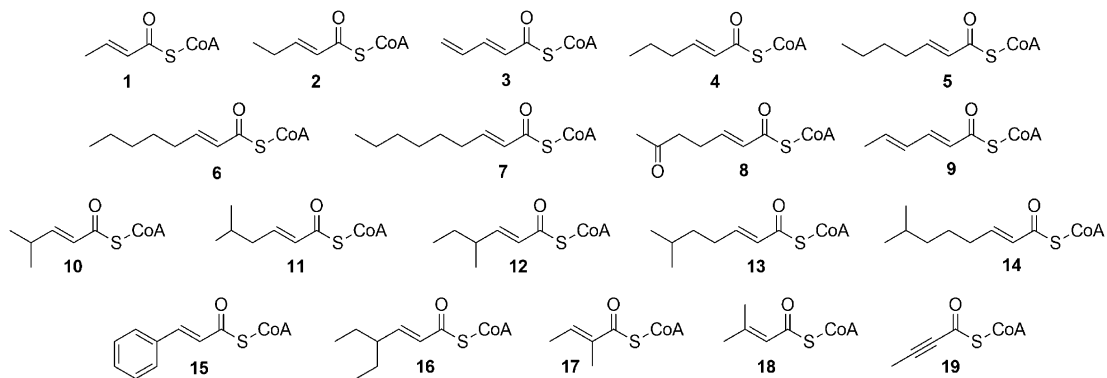


Abbildung 1. Bibliothek der Enoyl-CoA-Thioester, die in dieser Studie als ECR-Substrate getestet wurden.

und nicht-natürlicher Polyketid-Extender-Einheiten abdecken (**1–19**, Abbildung 1). Diese Bibliothek wurde mit acht phylogenetisch diversen ECR-Homologen getestet. Aus der ECR-1-Subfamilie, die durch ihre Funktion im Primärstoffwechsel spezifisch für Crotonyl-CoA (**1**) zu sein scheint, wurden vier Homologe gewählt: CcrCc aus *Caulobacter crescentus*, CcrSg aus *Streptomyces griseus*, CcrSb aus *Streptomyces bottropensis* und CcrPd aus *Paracoccus denitrificans*. Aus der ECR-2-Subfamilie wurden CinF aus *Streptomyces* sp. JS360, RevT aus *Streptomyces* sp. SN-593, SalG aus *Salinispora tropica* und EcrSh aus *Streptomyces hygroscopicus* gewählt, die die reduktive Carboxylierung von Octenoyl-CoA (CinF),^[14a] Hexenoyl-CoA (RevT)^[11a] sowie Chlorcrotonyl- bzw. Pentenoyl-CoA (SalG) katalysieren.^[8] Die entsprechenden Kandidaten wurden heterolog in *Escherichia coli* BL21 exprimiert, aufgereinigt und anschließend einzeln gegen die Substratbibliothek in einem HPLC-MS-basierten Testverfahren getestet (siehe Hintergrundinformationen (SI), Abbildung S1).

Unabhängig von ihrem ursprünglichen physiologischen Kontext akzeptierten alle ECRs der beiden Unterfamilien Crotonyl-CoA als Substrat. Neben dieser Gemeinsamkeit gab es aber auch distinkte Unterschiede zwischen den zwei Unterfamilien: ECRs-1 besaßen ein enges Substratspektrum. Außer mit Crotonyl-CoA reagierten sie nur noch mit Pentenoyl-CoA und Pent-2,4-dienoyl-CoA. Im Gegensatz dazu zeigten ECRs-2 eine überraschend breite Substrattoleranz. ECRs-2 akzeptierten unverzweigte CoA-Thioester verschiedener Längen (C₄ bis C₉), sowie verzweigte Enoyl-CoA-Analoga. Eine Ausnahme bildete lediglich SalG, das (Chlor)ethylmalonyl-CoA und Propylmalonyl-CoA in der

Verbindung / Enzym	ECR-2s				ECR-1s			
	RevT	CinF	EcrSh	SalG	CcrSg	CcrCC	CcrSb	CcrPd
Crotonyl-CoA (1)								
Pentenoyl-CoA (2)								
2,4-Pentadienoyl-CoA (3)								
Hexenoyl-CoA (4)								
Heptenoyl-CoA (5)								
Octenoyl-CoA (6)								
Nonenoyl-CoA (7)								
6-Oxoheptenoyl-CoA (8)								
Sorbityl-CoA (9)								
4-Methylpentenoyl-CoA (10)								
5-Methylhexenoyl-CoA (11)								
4-Methylhexenoyl-CoA (12)								
6-Methylheptenoyl-CoA (13)								
7-Methyloctenoyl-CoA (14)								
Cinnamoyl-CoA (15)								
4-Ethylhexenoyl-CoA (16)								
2,3-Dimethylacrylyl-CoA (17)								
3,3-Dimethylacrylyl-CoA (18)								
Butinoyl-CoA (19)								






	80 % - 100 %		20 % - 39 %
	60 % - 79 %		< 20 %
	40 % - 59 %		

Abbildung 2. Ergebnisse des HPLC-MS-basierten Aktivitätstests von ECR-Varianten mit der Substratbibliothek. Alle Enzym-Substrat-Kombinationen wurden als unabhängige Messungen mit 1 mM Substrat, 0,4–2,5 μ M Enzym für drei Stunden durchgeführt, um die Detektion schwacher Substrate zu maximieren und gleichzeitig die Decarboxylierung von Produkten zu minimieren (eine ausführliche Erklärung ist in den Hintergrundinformationen zu finden); die Inkubationszeit für CinF-Versuche mit **5**, **6** und **7** wurden auf zehn Minuten verkürzt. Gezeigt ist die relative Produktbildung mit detektiertem Carboxylierungsprodukt über einem Schwellenwert von 10^4 (ca. 10 μ M Reaktionsprodukt). Der Originaldatensatz ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Biosynthese von Salinosporamid bereitstellt.^[8] SalG akzeptierte CoA-Thioester nur bis zu einer Länge von C₇ und als verzweigtes Substrat lediglich 4-Methylpentenoyl-CoA. Während ECRs-1 also scheinbar beschränkt auf kurze, unverzweigte CoA-Ester sind, besitzen ECRs-2 eine breite Substratspezifität und akzeptieren diverse langkettige und sogar verzweigte Substrate (Abbildung 2).

Aufgrund dieser Beobachtung wurde im Weiteren die molekulare Grundlage des Substratspektrums in der ECR-Familie studiert. Durch Analyse des katalytischen Zentrums mehrerer ECR-Kristallstrukturen konnten Aminosäurekandidaten im aktiven Zentrum identifizieren werden, die an der Substratelektivität der einzelnen Enzyme beteiligt zu sein scheinen. Durch Sequenzvergleiche mit 925 ECR-Homologen wurden letztendlich drei Schlüsselaminosäuren identifiziert, die für die enge Selektivität von ECRs-1 verantwortlich zeigen: C146, I169 und F373 (Nummerierung gemäß ECR-1 CcrCc, Abbildung 3).

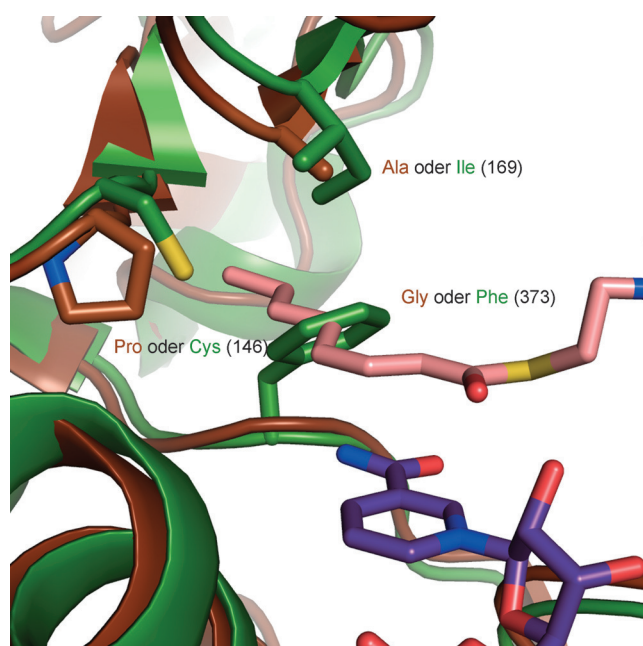


Abbildung 3. Vergleich der CinF-Kristallstruktur (braun) im Komplex mit Octenoyl-CoA (lachsfarben) und NADPH (violett)^[14a] und einer Ccr-Kristallstruktur von *S. collinus* (pdb-Code: 3HZZ; nicht veröffentlicht). Die drei an der Substratelektivität beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums, Pro oder Cys 146, Ala oder Ile 169 und Gly oder Phe 373 sind beschriftet.

Um die Rolle dieser Aminosäuren in der Substraterkennung zu verifizieren, wurden diese Reste in CcrCC mit den entsprechenden konservierten Aminosäuren aus der ECR-2-Unterfamilie ersetzt (C146P, I169A und F373G). Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen CcrCc-Mutanten inklusive aller möglichen Doppel- und Dreifachkombinationen gegen die vorhandene Substratbibliothek getestet. Das Substratspektrum der mutierten Enzyme vergrößerte sich schrittweise mit der Anzahl kombinierter Mutationen (Abbildung 4). Die Dreifachmutante von CcrCC zeigte ein Substratspektrum, das praktisch nicht mehr von einem echten

Verbindung / Enzym	CcrCc	CP	FG	CP / FG	IA	IA / CP	IA / FG	IA / CP / FG
Crotonyl-CoA (1)								
Pentenoyl-CoA (2)								
2,4-Pentadienoyl-CoA (3)								
Hexenoyl-CoA (4)								
Heptenoyl-CoA (5)								
Octenoyl-CoA (6)								
Nonenoyl-CoA (7)								
6-Oxoheptenoyl-CoA (8)								
Sorbityl-CoA (9)								
4-Methylpentenoyl-CoA (10)								
5-Methylhexenoyl-CoA (11)								
4-Methylhexenoyl-CoA (12)								
6-Methylheptenoyl-CoA (13)								
7-Methyloctenoyl-CoA (14)								
Cinnamoyl-CoA (15)								
4-Ethylhexenoyl-CoA (16)								
2,3-Dimethylacrylyl-CoA (17)								
3,3-Dimethylacrylyl-CoA (1z8)								
Butinoyl-CoA (19)								

80 % - 100 %

60 % - 79 %

40 % - 59 %

20 % - 39 %

< 20 %

Abbildung 4. Ergebnisse des HPLC-MS-basierten Aktivitätstests von CcrCc-Wildtyp, Ccr-Einfach-, Doppel- und Dreifachmutanten mit der Substratbibliothek. Alle Enzym-Substrat-Kombinationen wurden als unabhängige Messungen mit 1 mM Substrat, 0,4–2,5 µM Enzym für drei Stunden durchgeführt, um die Detektion schwacher Substrate zu maximieren und gleichzeitig die Decarboxylierung von Produkten zu minimieren (eine ausführliche Erklärung ist in den Hintergrundinformationen zu finden); die Inkubationszeit für CcrCc-CP mit **1** wurde auf zehn Minuten verkürzt. Gezeigt ist die relative Produktbildung mit detektiertem Carboxylierungsprodukt über einem Schwellenwert von 10⁴ (ca. 10 µM Reaktionsprodukt). Der Originaldatensatz ist in den Hintergrundinformationen zu finden. Für fett markierte Substrate wurden detaillierte Kinetiken unter Zuhilfenahme spektrophotometrischer Tests erfasst (Abbildung 5).

Mitglied der ECR-2-Familie zu unterscheiden war. Im Gegensatz zum ursprünglichen Wildtyp setzte dieses Enzym kurzkettige (**1**), langkettige (**11**), verzweigte (**8**) und sterisch anspruchsvolle Substrate (**16**) um, was die Rolle der drei Aminosäuren in der Öffnung des katalytischen Zentrums bestätigte.

Um den Beitrag der drei identifizierten Aminosäuren zur Substratspezifität zu quantifizieren, wurden die kinetischen Parameter der sieben verschiedenen CcrCc-Mutanten, des Wildtyps und EcrSh, eines ECR-2-Vertreters, in spektrophotometrischen Versuchen erfasst. Als Modellsubstrate dienten ein kurzkettiges (**1**), ein langkettiges (**6**) und ein verzweigtes (**11**) Substrat (Tabelle 1 und SI Abbildung S2).

Tabelle 1: Verhältnis der katalytischen Effizienz von CcrCc-Wildtyp und mutierten Varianten zur Verdopplungszeit im Δccr -Komplementierungssystem *Methylobacterium extorquens* AM1.^[a]

Mutation	k_{cat}/K_M [$\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$]	Verdopplungszeit [h]
wt	$27 \pm 10 \times 10^5$	5.3 ± 0.3
CP	$32 \pm 11 \times 10^4$	5.4 ± 0.2
FG	$15 \pm 9 \times 10^4$	5.3 ± 0.1
IA	$18 \pm 8 \times 10^3$	5.6 ± 0.3
CP/FG	$39 \pm 16 \times 10^3$	6.2 ± 1.3
FG/IA	$92 \pm 2 \times 10^2$	13 ± 2
CP/IA	$18 \pm 6 \times 10^2$	50 ± 27
CP/IA/FG	$14 \pm 6 \times 10^2$	27 ± 5

[a] Die kinetischen Parameter wurden spektrophotometrisch bestimmt und geben die katalytische Effizienz im Bezug auf den K_M für Crotonyl-CoA wieder. Die gezeigten Daten entsprechen dem arithmetischen Mittel mit 95 % Vertrauensintervall.

Die katalytische Effizienz für das kurzkettige Modellsubstrat **1** nahm vom CcrCc-Wildtyp ($27 \pm 10 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) bis zur CcrCc-Dreifachmutante ($14 \pm 6 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) um einen Faktor von ca. 2000 kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu stieg die katalytische Effizienz für das langkettige Modellsubstrat **6** und erreichte einen Maximalwert von $11 \pm 2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ für die CcrCc-Dreifachmutante, was vergleichbar mit der katalytischen Effizienz des echten ECR-2-Vertreters EcrSh ($13 \pm 4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) war. Das sterisch anspruchsvolle Substrat **11** wurde durch die CcrCc-Dreifachmutante ($6 \pm 2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) verglichen mit dem echten ECR-2-Vertreter EcrSh ($44 \pm 7 \times 10^1 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) sogar um einen Faktor 10 effizienter umgesetzt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich in CcrCc (und vermutlich der gesamten ECR-Familie) die katalytische Effizienz gegenüber kurzen Substrate und eine erhöhte Substrattoleranz gegenüber langkettigen und sterisch anspruchsvollen Substanzen umgekehrt proportional verhalten (Abbildung 5).

Die Relevanz dieser postulierten Austauschbeziehung wurde in einem letzten Experiment untersucht. Dazu wurden der CcrCc-Wildtyp und die sieben Mutanten in ihren physiologischen Kontext des Primärstoffwechsels zurückversetzt. Als Grundlage zu diesen Versuchen diente ein Ccr-in-vivo-Komplementierungssystem das in einem Δccr -Stamm von *Methylobacterium extorquens* AM1 etabliert worden war, der den Ethylmalonyl-CoA-Weg zum Wachstum auf C_1 -Substraten verwendet.^[15] Solange der Δccr -Stamm nicht mit einem funktionellen Ccr-Homolog komplementiert wird, ist er zwar in der Lage auf Succinat, nicht aber Methanol als angebotene Kohlenstoffquelle zu wachsen.^[16]

Die Wachstumsraten der komplementierten Stämme für den CcrCc-Wildtyp, alle CcrCc-Einfachmutanten sowie die

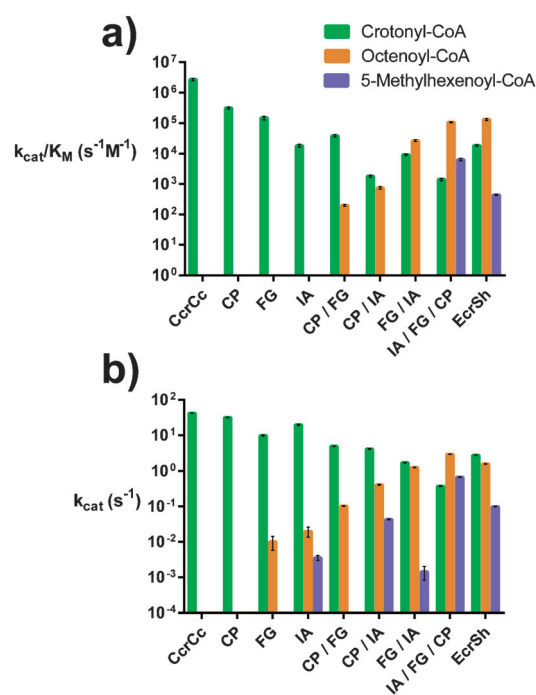


Abbildung 5. a) Katalytische Effizienz k_{cat}/K_M und b) Umsatzrate k_{cat} von CcrCc-Wildtyp und mutierten Varianten sowie EcrSh für die drei Modellsubstrate Crotonyl-CoA (**1**), Octenoyl-CoA (**6**) und 5-Methylhexenoyl-CoA (**11**). Die Werte wurden spektrophotometrisch in Form von Steady-State-Kinetiken bestimmt. Die scheinbaren katalytischen Effizienzen für CcrCc IA und Ccr FG mit **6**, sowie für CcrCc FG/IA, CcrCc CP/IA und CcrCc IA mit **11** wurden aufgrund extrem niedriger Umsatzraten für diese Substrate in Triplikaten mit 1 mM Substratkonzentration bestimmt. Alle kinetischen Parameter sind in SI Tabelle S1 aufgeführt, die entsprechenden Michaelis-Menten-Kurven sind in SI Abbildung S2 abgebildet.

C146P/F373G-Doppelmutante waren von vergleichbarer Größenordnung, während die beiden anderen Doppelmutanten und die CcrCc-Dreifachmutante in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt waren (Tabelle 1). Eine katalytische Effizienz von $20\text{--}30 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ erscheint daher ausreichend, um eine Wildtyp-ähnliche Wachstumsrate zu erzielen. Die Wachstumsrate verlangsamt sich aber erheblich, sobald die katalytische Effizienz unter diese Marke fällt. Bei vergleichbarem Expressionsniveau (SI Abbildung S3) scheint dies also der minimale evolutionäre Druck zu sein, der die Substratbindetasche von ECRs im Zentralstoffwechsel geschlossen hält.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente haben mehrere Konsequenzen: Zum ersten Mal konnten drei Aminosäuren im aktiven Zentrum von ECRs identifiziert werden, die eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Substratspezifität spielen. Dies ermöglicht es, das ECR-Substratspektrum auf rationaler Basis gezielt zu verändern, was im Rahmen der vorliegenden Studie mit CcrCc bereits demonstriert werden konnte. Die vorgestellten Ergebnisse erlauben es aber auch, ECRs, die in einem Polyketid-Biosynthese-Gencluster codiert sind, funktionell zu annotieren. Anhand der drei charakteristischen Aminosäuren können generelle Aussagen getroffen werden, ob ein entsprechendes Polyketid-Produkt strukturelle Diversität besitzen kann, wie

z.B. langkettige, verzweigte oder sterisch anspruchsvolle Substituenten (P146, A169, G373), oder ob das Grundgerüst auf kurzkettige Substituenten begrenzt ist (C146, I169, F373).

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen darüber hinaus vermuten, dass die Synthese und der Einbau ungewöhnlicher Extender-Einheiten in Polyketide nicht auf dem Level der ECR-Reaktion kontrolliert werden. Die in dieser Studie untersuchte Substrattoleranz von ECRs-2, die zwar im Reagenzglas, aber nicht im Polyketid-Produkt beobachtet wird, zeigt, dass es wahrscheinlich biosynthetische Zwänge sind, wie z.B. die intrazelluläre Verfügbarkeit der Enoyl-CoA-Thioester (d.h. der eigentlichen ECR-Substrate), die die Produktion der α -carboxylierten Extender-Einheiten bestimmen.^[17] Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass zusätzliche Einbaukontrollen und Prüfreaktionen während der Polyketid-Biosynthese als weitere Kontrollmechanismen dienen.

Zu guter Letzt können unter Zuhilfenahme dieser Ergebnisse nun prinzipiell alle Polyketid-Gencluster identifiziert werden, die sich für biokombinatorische Ansätze eignen.^[17] Alle Gencluster, die ein Mitglied der ECR-2-Familie mit flexiblem Signaturmotiv tragen, sollten grundsätzlich für solche Ansätze zugänglich sein, die es ermöglichen, durch Zufüttern nicht-natürlicher Vorläuferverbindungen Polyketide mit modifizierten Strukturen zu erzeugen.

Danksagung

Diese Studie wurde durch die Gebert-Rüf-Stiftung (GRS 062-12) und das SNF-Ambizione-Programm (PZ00P3_136828/1) unterstützt. Wir danken R. Müller (Saarbrücken) und B. Moore (San Diego) für das Überlassen von *cinF*- und *salG*-Genen.

Stichwörter: Biotechnologie · CO₂-Fixierung · Crotonyl-CoA-Carboxylase/Reduktase · Naturstoff-Engineering · Polyketide

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13457–13461
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13659–13663

- [1] P. Banerjee, J. Erehman, B. O. Gohlke, T. Wilhelm, R. Preissner, M. Dunkel, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D935–939.

- [2] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
[3] C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469–2493.
[4] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
[5] Y. A. Chan, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 90–114.
[6] M. C. Wilson, B. S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 72–86.
[7] a) H. Liu, K. A. Reynolds, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6806–6813; b) Z. Xu, L. Ding, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4667–4670; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4763–4766; c) S. F. Haydock, A. N. Appleyard, T. Mironenko, J. Lester, N. Scott, P. F. Leadlay, *Microbiology* **2005**, *151*, 3161–3169.
[8] A. S. Eustaquio, R. P. McGlinchey, Y. Liu, C. Hazzard, L. L. Beer, G. Florova, M. M. Alhamadsheh, A. Lechner, A. J. Kale, Y. Kobayashi, K. A. Reynolds, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12295–12300.
[9] H. Motamedi, A. Shafiee, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 528–534.
[10] S. Rachid, L. Huo, J. Herrmann, M. Stadler, B. Kopcke, J. Bitzer, R. Müller, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 922–931.
[11] a) S. Takahashi, A. Toyoda, Y. Sekiyama, H. Takagi, T. Nogawa, M. Uramoto, R. Suzuki, H. Koshino, T. Kumano, S. Panthee, T. Dai, I. Ishikawa, H. Ikeda, Y. Sakaki, H. Osada, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 461–468; b) L. Laureti, L. Song, S. Huang, C. Corre, P. Leblond, G. L. Challis, B. Aigle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6258–6263.
[12] a) T. J. Erb, I. A. Berg, V. Brecht, M. Müller, G. Fuchs, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10631–10636; b) T. J. Erb, V. Brecht, G. Fuchs, M. Müller, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8871–8876.
[13] T. J. Erb, G. Fuchs, B. E. Alber, *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 992–1008.
[14] a) N. Quade, L. Huo, S. Rachid, D. W. Heinz, R. Müller, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 117–124; b) R. G. Rosenthal, M. O. Ebert, P. Kiefer, D. M. Peter, J. A. Vorholt, T. J. Erb, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 50–55.
[15] R. Peyraud, P. Kiefer, P. Christen, S. Massou, J. C. Portais, J. A. Vorholt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4846–4851.
[16] L. Schada von Borzyskowski, M. Remus-Emsermann, R. Weishaupt, J. A. Vorholt, T. J. Erb, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 430–443.
[17] I. Koryakina, J. B. McArthur, M. D. Matthew, G. J. William, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4449–4458.
[18] Y. Yan, J. Chen, L. Zhang, Q. Zheng, Y. Han, H. Zhang, D. Zhang, T. Awakawa, I. Abe, W. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12308–12312; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12534–12538.

Eingegangen am 9. Juni 2015

Online veröffentlicht am 18. September 2015