

Enzymkatalyse

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201605197
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201605197

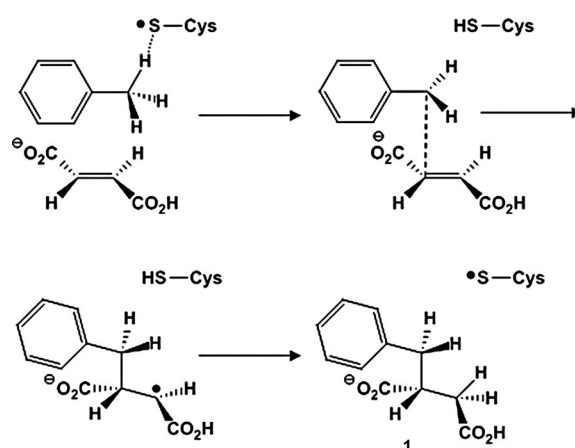
Stereochemischer Verlauf der enzymatischen Synthese von Benzylsuccinat mit chiral markiertem Toluol

Deniz Seyhan, Peter Friedrich, Maciej Szaleniec, Markus Hilberg, Wolfgang Buckel, Bernard T. Golding und Johann Heider*

Abstract: Benzylsuccinat-Synthase ist ein Glycylradikal-Enzym, das den anaeroben Toluolstoffwechsel durch Addition von Fumarat an die Methylgruppe des Toluols unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat einleitet. Zur Aufklärung der Frage, ob die Reaktion unter Retention oder Inversion der Konfiguration der Methylgruppe des Toluols verläuft, wurden beide Enantiomere von chiral markiertem Toluol synthetisiert. Diese Enantiomere, die jeweils alle drei H-Isotope in ihren Methylgruppen enthalten, wurden zu Benzylsuccinaten umgesetzt. Aufgrund eines kinetischen Isotopeneffekts, der die Abstraktion von ^1H von den Methylgruppen begünstigt, enthielten diese Produkte an ihren benzyllischen C-Atomen vorwiegend ^2H und ^3H . Die Analyse ihrer Konfiguration erfolgte durch CoA-Thioester-Synthese und stereospezifische Oxidation mit Enzymen, die am Abbau von Benzylsuccinat beteiligt sind. Die Analyse der Konfigurationen der Benzylsuccinat-Isomere über den Verlust oder die Beibehaltung von Tritium zeigte, dass die Reaktion der beiden Enantiomere mit Fumarat unter Inversion der Konfiguration der Methylgruppen verläuft.

Das Glycylradikal-Enzym Benzylsuccinat-Synthase (BSS) leitet den bakteriellen Toluol-Abbau unter anaeroben Bedingungen ein und ersetzt dabei Sauerstoff-abhängige Mono- oder Dioxygenasen aerober Toluol-abbauender Organismen. BSS gehört zu einer Vielzahl von kürzlich entdeckten Enzymen, die radikalische Mechanismen für die Katalyse von chemisch anspruchsvollen Reaktionen nutzen. Darüber hinaus stellt die BSS einen Modellfall dar, wie radikalbasierte biochemische Reaktionen mit strikter Stereospezifität ablaufen können.^[1] BSS wird durch ein spezifisches aktivieren-

des Enzym, das zur Familie der „Radikal-SAM“-Enzyme gehört und S-Adenosylmethionin benötigt, in die Radikal-Form konvertiert. Dabei wird ein konserviertes Glycin in der katalytischen Untereinheit zu einem Glycylradikal oxidiert. Die aktivierte BSS katalysiert anschließend die radikalische Addition eines Fumarat-Cosubstrats an die Methylgruppe von Toluol, die zur stereospezifischen Synthese von (*R*)-Benzylsuccinat führt (**1**; Schema 1).^[1] Der Reaktionsweg be-



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus der BSS.

ginnt mit dem Transfer eines Wasserstoff-Atoms von einem konservierten Cystein im aktiven Zentrum auf das Glycyl-Radikal, wodurch ein reaktives Thiol-Radikal entsteht. Im Fall von BSS wird angenommen, dass das Thiol-Radikal ein Wasserstoff-Atom von der Methylgruppe des Toluols abstrahiert und damit als Intermediat ein enzymgebundenes Benzyl-Radikal erzeugt. Dieses addiert nachfolgend an die *Re-Re*-Seite der Doppelbindung eines gebundenen Fumarats, wobei als weiteres Intermediat ein (*R*)-Benzylsuccinyl-Radikal entsteht. Dieses Radikal wird durch den Transfer eines Wasserstoff-Atoms vom Cystein des aktiven Zentrums aufgelöst. Danach werden durch einen weiteren Wasserstoff-Transfer der stabile Glycylradikal-Status der BSS wiederhergestellt, das Produkt abgegeben und neue Substrate gebunden (Schema 1).^[2] Passend zum vorgeschlagenen Mechanismus wird das zu Anfang abstrahierte Wasserstoff-Atom auf das intermediäre Produkt-Radikal im Modus einer *syn*-Addition zurücktransferiert.^[3]

In den letzten Jahren ist die BSS zu einem Modellfall für viele paraloge Fumarat-addierende Enzyme geworden, die aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe umsetzen.^[4] Hier untersuchen wir die „kryptische Stereochemie“^[5]

[*] D. Seyhan, Dr. M. Hilberg, Prof. Dr. J. Heider
Laboratorium für Mikrobielle Biochemie und
Synmikro-Zentrum für synthetische Mikrobiologie
Philipps Universität Marburg
35043 Marburg an der Lahn (Deutschland)
E-Mail: heider@biologie.uni-marburg.de

Dr. P. Friedrich, Prof. Dr. B. T. Golding
School of Chemistry, Bedson Building
Newcastle University
Newcastle upon Tyne NE1 7RU (Großbritannien)

Dr. M. Szaleniec
Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry
Polish Academy of Science
30-239 Krakau (Polen)

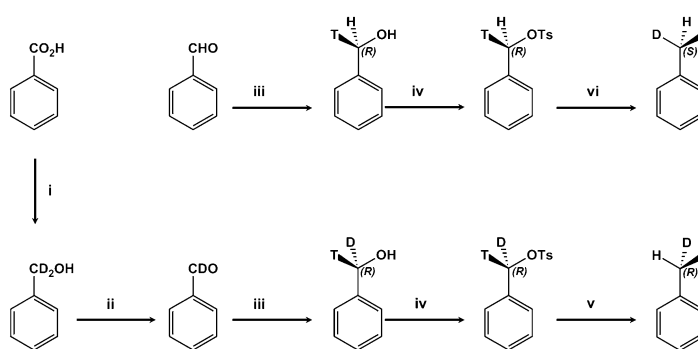
Prof. Dr. W. Buckel
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
35043 Marburg an der Lahn (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605197> zu finden.

der BSS gegenüber der Methylgruppe des Toluols, d. h., ob die Reaktion zu einer Retention oder Inversion der Konfiguration an dieser Gruppe führt. Diese Art von Studien wurde erstmals 1969 mit chiralen Acetaten durchgeführt, die alle drei H-Isotope in ihren Methylgruppen enthielten.^[6] Für diese Studie haben wir beide Enantiomere von chiral markiertem Toluol (chirale Toluole) synthetisiert und mit ^{14}C -markiertem Fumarat enzymatisch zu Benzylsuccinat umgesetzt. Die Analyse der jeweiligen stereochemischen Konfigurationen der Benzylsuccinate erfolgte durch ihre weitere Umsetzung mit den nächsten beiden Enzymen des Toluol-Abbaus, Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BS-CT) und Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (BS-DH), die entweder mit der Beibehaltung oder der Abspaltung des radioaktiven ^3H -Atoms verbunden ist.

Unsere Experimente setzen einen starken primären kinetischen Isotopeneffekt (KIE) für die Reaktion der BSS mit den beiden Toluol-Enantiomeren voraus, wobei vorzugsweise der (^1H)-Substituent abstrahiert wird und stereochemisch definierte Isomere von [$1\text{-}^3\text{H}$], [$1\text{-}^2\text{H}$] Benzylsuccinat angereichert werden. (Runde Klammern bezeichnen volle Isotopen-Besetzung, eckige zeigen lediglich partielle Besetzung an.) Da KIE-Werte bisher nur von einem anderen BSS-Isoenzym von *Thauera aromatica* Stamm T1 bekannt waren,^[7] haben wir den KIE der BSS von *T. aromatica* Stamm K172 bestimmt, die in dieser Studie verwendet wurde. Mit ($^2\text{H}_8$)- und unmarkiertem Toluol wurden spezifische BSS-Aktivitäten von 4.0 bzw. 16 $\text{nmol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen, was einen KIE-Wert von 4.0 ergibt. Kontrollen mit unmarkiertem Toluol und (2,3- $^2\text{H}_2$) Fumarat ergaben eine spezifische Aktivität von 18 $\text{nmol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$. Wir verwenden deshalb im Weiteren einen KIE-Wert zwischen ^1H und ^2H von 4.0 anstelle der etwas niedrigeren Werte von 2.9 bis 3.1, die für die BSS vom Stamm T1 berichtet wurden.^[7] Nach der Swain-Schaad-Gleichung ist damit zwischen ^1H und ^3H ein KIE-Wert von 7.4 zu erwarten.^[8] Die durchgeführten Experimente hängen tatsächlich vom intramolekularen KIE der Toluol-Enantiomere ab, deren Werte etwas von den intermolekularen KIE-Werten abweichen, aber nicht zugänglich sind.^[9] Dennoch sollten die relativ hohen Werte des intermolekularen KIE eine verlässliche Basis darstellen, um signifikante Unterschiede zwischen den Umsetzungsprodukten der beiden Toluol-Enantiomere zu erhalten und zu interpretieren (siehe auch die Hintergrundinformationen für eine QM-basierte Abschätzung der KIE-Werte).

(*R*)- und (*S*)-[$1\text{-}^3\text{H}$], [$1\text{-}^2\text{H}_1, 1\text{-}^1\text{H}_1$] Toluol (in der Folge (*R*)- und (*S*)-Toluol genannt) wurden über mehrere aufeinanderfolgende chemische und enzymatische Reaktionen synthetisiert (Schema 2). ($1\text{-}^2\text{H}_1$) Benzaldehyd wurde als Ausgangsmaterial für (*R*)-Toluol durch Reduktion von Benzoesäure zu dideutiertem Benzylalkohol synthetisiert, gefolgt von MnO_2 -vermittelter Oxidation, die bei einer Ausbeute von 70.5 % relativ zur eingesetzten Benzoesäure zu ($1\text{-}^2\text{H}_1$) Benzaldehyd mit einem hohen Gehalt an ^2H (99.3 %) führte (siehe Hintergrundinformationen). Um beide Toluol-Enantiomere zu erhalten, führten wir zwei parallele Synthesewege durch, die entweder von unmarkiertem oder von ($1\text{-}^2\text{H}_1$) Benzaldehyd ausgingen, die in einer Reaktionssequenz von drei Stufen



Schema 2. Synthese der Enantiomere von chiral markiertem Toluol. Reagenzien und Lösungsmittel: i) $\text{LiAlD}_4/\text{Diethylether}$; ii) $\text{MnO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; iii) Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe und Formiat-Dehydrogenase/ $[\text{H}]^3\text{Formiat}/\text{NAD}^+/\text{aq. Phosphat-Puffer (pH 7.0) unter Argon}$; iv) *p*-Toluolsulfonylchlorid/ K_2CO_3 ; v) $\text{LiAlH}_4/\text{Tetraglym}$; vi) $\text{LiAlD}_4/\text{Tetraglym}$ (detaillierte Beschreibung in den Hintergrundinformationen). NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid.

zu den jeweiligen Toluol-Enantiomeren umgesetzt wurden. Die erste Reaktion bestand in einer stereoselektiven Reduktion mit [^3H]NADH durch Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe, die eine *Re*-Addition von ^3H an die jeweiligen Benzaldehyd-Isotopologen katalysiert.^[10] [^3H]Formiat und Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* wurden zur Generierung von [^3H]NADH in situ eingesetzt (siehe die Hintergrundinformationen). Die erhaltenen Produkte aus dieser Umsetzung waren die *R*-Enantiomere von [$1\text{-}^3\text{H}$], [$1\text{-}^1\text{H}$] bzw. [$1\text{-}^3\text{H}$], [$1\text{-}^2\text{H}$] Benzylalkohol, jeweils in einer Ausbeute von 72 %. Anschließend wurden die jeweiligen isotopenmarkierten Benzylalkohole mit unmarkiertem Benzylalkohol verdünnt, um genügend Stoffmenge für die folgenden Stufen bereitzustellen. Diese Verdünnung hat keine Auswirkung auf die geplanten weiteren Experimente, da die ^3H -markierten Stereozentren, die für die Auswertung der Versuche gebraucht werden, bereits zuvor etabliert waren. Die markierten Benzylalkohole wurden anschließend zu den entsprechenden Tosylaten aktiviert, die unter Inversion ihrer Konfiguration zu den gewünschten Toluol-Enantiomeren reduziert wurden.^[11] Als Reduktionsmittel wurde dafür entweder LiAlH_4 (für (*R*)-Toluol) oder $\text{LiAl}(\text{H})_4$ (für (*S*)-Toluol) eingesetzt (Schema 2). Die Endausbeuten waren 0.51 g (5.4 mmol) (*S*)-Toluol mit 32.2 kBq Radioaktivität (spezifische Aktivität 6.0 kBq mmol^{-1}) und 0.45 g (4.8 mmol) (*R*)-Toluol mit 38.9 kBq Radioaktivität (spezifische Aktivität 8.1 kBq mmol^{-1}). Dies entspricht ca. 24 % in Bezug auf die Ausgangsmengen an Benzaldehyd-Isotopologen. Die Mengen und spezifischen Aktivitäten der erhaltenen Toluol-Enantiomere reichten aus, um bei der Reaktion der BSS klare Unterschiede zwischen Retention und Inversion zu erhalten.

Die beiden Toluol-Enantiomere (100 Bq) wurden mit je 33 Bq ^{14}C -markiertem Fumarat, wie bereits früher berichtet, durch 16-stündige Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur mit Extrakten von *T. aromatica*-Zellen, die anaerob auf Toluol gewachsen waren, zu Benzylsuccinat umgesetzt.^[12] Danach wurden die Proben durch Zugabe von HCl auf pH 1.5 eingestellt, und das gebildete Benzylsuccinat wurde über Festphasenextraktion über eine Kieselgel-basierte C_{18} -Säule extrahiert. In verschiedenen Durchläufen der

Versuche wurden spezifische Aktivitäten an BSS zwischen 10 und 20 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹ ermittelt; die Benzylsuccinat-Ausbeuten pro Ansatz bewegten sich zwischen 0.32 und 0.54 μ mol. Diese Produkte (**2a/2b**) sollten hauptsächlich die ²H- und ³H-Atome der ehemaligen Methylgruppen der Toluol-Enantiomere enthalten (Abbildung 1), und ihre Gehalte an ³H und ¹⁴C wurden durch Szintillationszählung gemessen. Die relative Beibehaltung oder Abspaltung von ³H während der weiteren Umsetzungsreaktionen (Abbildung 1) war damit auf der Basis der enthaltenen ³H/¹⁴C-Verhältnisse einfach zu verfolgen.

Um die Konfigurationen der extrahierten Benzylsuccinate (**2a/2b**) zu bestimmen, wurden sie anhand des Stoffwechselwegs der β -Oxidation von Benzylsuccinat weiter umgesetzt. Inkubation mit den gereinigten Enzymen BS-CT^[13] und BS-DH^[14a] (Abbildung 1 A) führte zur Aktivierung zu den jeweiligen CoA-Thioestern **3a/3b** und der anschließenden Oxidation zu den Benzylidensuccinyl-CoA-Thioestern **4a/4b**. Für diese Umsetzung wurde ein Gemisch aus BS-CT der Toluol-abbauenden Bakterienart *Geobacter metallireducens* und BS-DH aus *T. aromatica* eingesetzt. Die extrahierten, doppelt markierten Benzylsuccinate (**2a/2b**) aus den umgesetzten Toluol-Enantiomeren wurden auf ihren Gehalt an ³H und ¹⁴C überprüft und unter Bedingungen, die eine komplette Konversion zu Benzylidensuccinyl-CoA (**4a/4b**) ermöglichen, mit den beiden Hilfsenzymen umgesetzt (siehe Hintergrundinformationen). Die Reaktion war nach 3 h komplett abgelaufen, was durch HPLC-Analyse der Produkte bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Aus den mit HCl auf pH 1.5 angesäuerten Proben wurden die organischen Produkte durch eine weitere Festphasenextraktion erhalten und wieder auf ihren Gehalt an ³H und ¹⁴C überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass 75 % des ³H-Gehalts von **2b**, das sich von (*R*)-Toluol ableitet, im entsprechenden Intermediat **4b** verloren gingen, während Intermediat **4a**, das sich von (*S*)-Toluol ableitet, noch 79 % des ³H-Gehalts von **2a** beibehielt (Abbildung 1 B). Da BS-DH eine *anti*-Eliminierung der Wasserstoff-Atome an C2 und C3 katalysiert,^[14] zeigt dieser

Befund, dass die Konfiguration der Methylgruppe von Toluol während der Synthese von Benzylsuccinat invertiert wird. Bei KIE-Werten von 4.0 bzw. 7.4 für ¹H/²H bzw. ¹H/³H wäre ein initialer Angriff der BSS auf 72 % der ¹H-, 18 % der ²H- und 10 % der ³H-Substituenten der Toluol-Enantiomere zu erwarten.

Weil jeder anfangs abstrahierte ³H-Substituent im Verlauf der BSS-Reaktion wieder auf Benzylsuccinat zurückübertragen wird und von BS-DH dann nicht mehr abgespalten wird, betragen die erwarteten Werte der ³H-Retention in Benzylidensuccinyl-CoA 82 % (**4a**) und 28 % (**4b**) für reines (*S*)- bzw. (*R*)-Toluol. Die experimentell erhaltenen Werte von 79 und 25 % (Abbildung 1 B) sind völlig konsistent mit den erwarteten Werten bei einer Enantiomerenreinheit der eingesetzten Toluol-Enantiomere von > 90 % (siehe Hintergrundinformationen). Die mittleren Werte der ³H/¹⁴C-Verhältnisse beider Paare der jeweiligen Benzylsuccinat- und Benzylidensuccinyl-CoA-Intermediate (**2a** und **4a** gegenüber **2b** und **4b**) wurden mithilfe eines gepaarten zweiseitigen t-Tests als signifikant unterschiedlich bewertet (*P* < 0.05; Abbildung 1 B).

Dieselbe Stereospezifität der Fumarataddition an Toluol, wie in dieser Studie nachgewiesen, war bereits aus der kürzlich aufgeklärten Röntgenstruktur der BSS mit beiden gebundenen Substraten und durch eine quantenmechanische (QM-)Modellierungsstudie des BSS-Mechanismus vorhergesagt worden^[15] (siehe Hintergrundinformationen, Abbildungen S1 und S2). Das erhaltene Ergebnis ist ebenfalls konsistent mit einer Studie zur Methylpentylsuccinat-Synthase, einem Paralog der BSS, das am anaeroben Alkan-Abbau beteiligt ist und Fumarat an die C2-Methylengruppe von *n*-Hexan addiert.^[4c] Mithilfe von chiral markiertem *n*-Hexan, das an den C-2- und C-5-Positionen jeweils ¹H- und ²H-Liganden enthielt, wurde nachgewiesen, dass das gebildete Methylpentylsuccinat-Addukt unter Inversion der Konfiguration an C-2 bzw. C-5 entstanden ist.^[16]

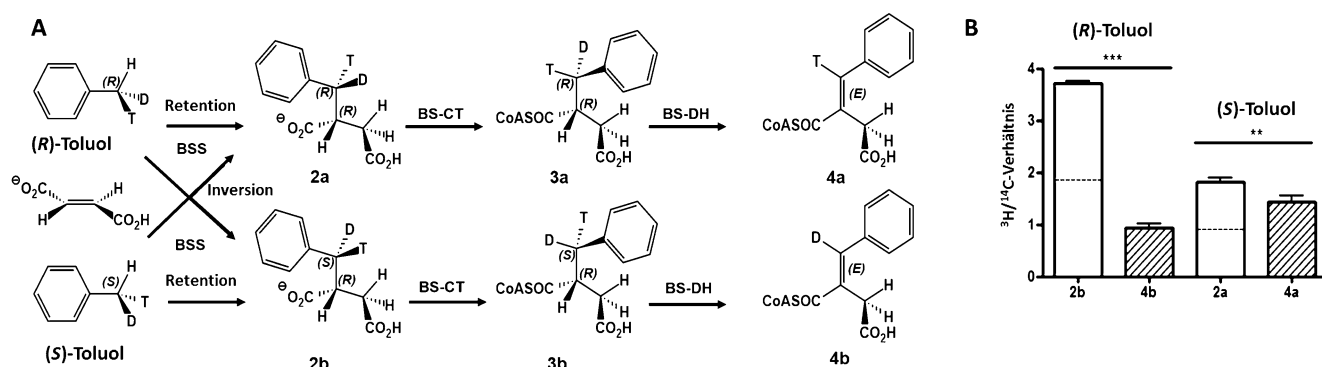


Abbildung 1. Analyse der Konfigurationen von Benzylsuccinaten aus chiral markierten Toluolen. A) Mögliche Ergebnisse der Benzylsuccinat-Synthese mit den Toluol-Enantiomeren und der weiteren enzymatischen Umsetzung. B) ³H/¹⁴C-Verhältnisse in den Benzylsuccinaten und Benzylidensuccinyl-CoA-Thioestern, die sich von den jeweiligen Toluol-Enantiomeren ableiten. Mittelwerte und Standardfehler stammen von vier unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils drei parallele Messungen durchgeführt wurden. Die mittleren relativen Werte für die Beibehaltung von Tritium in Benzylidensuccinyl-CoA entsprechen 25 % für (*R*)- bzw. 79 % für (*S*)-Toluol. Gestrichelte Linien zeigen die erwarteten Werte in den jeweiligen Produkten für eine nicht-stereoselektive Reaktion oder eine Umsetzung mit racemischem **2a/2b**. Die gesamte Radioaktivität in den gemessenen Proben variierte zwischen 12–18 Bq ³H und 2–5 Bq ¹⁴C mit (*R*)-Toluol und zwischen 13–21 Bq ³H und 2–12 Bq ¹⁴C mit (*S*)-Toluol.

Danksagung

Diese Studie wurde finanziell unterstützt durch Beihilfen von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (über SPP 1319) und dem Synmikro LOEWE-Zentrum an J.H., W.B. und B.T.G., durch das COST Action 1201 Programm (Biomimetic radical chemistry) an B.T.G. und W.B. sowie durch das Marian Smoluchowski Krakow Research Consortium und die Datenverarbeitungs-Beihilfen MNiSW/SGI4700/PAN/038/2007 und MNiSW/IBM_BC_HS21/PAN/038/200 an M.S. Wir danken Karola Schühle für die Bereitstellung des Plasmids zur Überproduktion von BS-CT.

Stichwörter: Chirale Methylgruppe · Enzymkatalyse · Glycylradikal · Stereochemie · Toluol

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 11664–11667
Angew. Chem. **2016**, 128, 11836–11839

-
- [1] a) W. Buckel, B. T. Golding, *Microbiology* **2006**, 60, 27; b) T. Selmer, A. J. Pierik, J. Heider, *Biol. Chem.* **2005**, 386, 981; c) G. Fuchs, M. Boll, J. Heider, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9, 803.
- [2] a) J. Heider, A. M. Spormann, H. R. Beller, F. Widdel, *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, 22, 459; b) F. Himo, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, 1707, 24.
- [3] C. Qiao, E. N. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8608.
- [4] a) D. J. Hopper, I. D. Bossert, M. E. Rhodes-Roberts, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 1298; b) A. Strijkstra, K. Trautwein, R. Jarling, L. Wöhlbrand, M. Dörries, R. Reinhardt, M. Drozdowska, B. T. Golding, H. Wilkes, R. Rabus, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 7592; c) R. Rabus, H. Wilkes, A. Behrends, A. Armstroff, T. Fischer, A. J. Pierik, F. Widdel, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 1707; d) A. V. Callaghan, L. M. Gieg, K. G. Kropp, J. M. Suflita, L. Y. Young, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 4274; e) O. Kniemeyer, T. Fischer, H. Wilkes, F. O. Glöckler, F. Widdel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 760.
- [5] H. G. Floss in *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Vol. 7 (Hrsg.: E. E. Conn), Academic Press, New York, **1981**, S. 177–212.
- [6] a) J. W. Cornforth, J. W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel, C. Gutschow, *Nature* **1969**, 221, 1212; b) J. Lüthy, J. Rétey, D. Arigoni, *Nature* **1969**, 221, 1213.
- [7] L. Li, E. N. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16056.
- [8] J. P. Klinman in *Enzyme mechanism from isotope effects* (Hrsg.: P. F. Cook), CRC, Boca Raton, **1991**, S. 127–149.
- [9] H. Lenz, H. Eggerer, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 65, 237.
- [10] S. A. Benner, K. P. Nambiar, G. K. Chambers, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5513.
- [11] V. Baillif, R. J. Robins, I. Billault, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11180.
- [12] K. Verfürth, A. J. Pierik, C. Leutwein, S. Zorn, J. Heider, *Arch. Microbiol.* **2004**, 181, 155.
- [13] C. Leutwein, J. Heider, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 4288.
- [14] a) C. Leutwein, J. Heider, *Arch. Microbiol.* **2002**, 178, 517; b) J. Rétey, J. A. Robinson, *Stereospecificity in organic chemistry and enzymology*, Verlag Chemie, Weinheim, **1982**.
- [15] a) M. A. Funk, E. T. Judd, E. N. Marsh, S. J. Elliott, C. L. Drennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 10161; b) M. A. Funk, E. N. Marsh, C. L. Drennan, *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 22398; c) M. Szaleniec, J. Heider, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 514.
- [16] R. Jarling, M. Sadeghi, M. Drozdowska, S. Lahme, W. Buckel, R. Rabus, F. Widdel, B. T. Golding, H. Wilkes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1334; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1362.
-

Eingegangen am 27. Mai 2016,
veränderte Fassung am 1. Juli 2016
Online veröffentlicht am 9. August 2016