

Produktion der Isochromanon-Antimykotika Ajudazol A und B in *Chondromyces crocatus* Cm c5: Biosynthesemaschinerie und Cytochrom-P450-Modifikationen**

Kathrin Buntin, Shwan Rachid, Maren Scharfe, Helmut Blöcker, Kira J. Weissman und Rolf Müller*

Schon seit mehr als 25 Jahren sind Myxobakterien als eine reichhaltige Quelle für biologisch aktive Naturstoffe bekannt.^[1] Dabei ist besonders der Stamm *Chondromyces crocatus* Cm c5 erwähnenswert, der mindestens sechs verschiedene Sekundärmetabolitklassen produziert.^[2-5] Darunter befinden sich einige mit einzigartigen Strukturelementen, wie auch die antimykotisch wirksamen Ajudazole A (1) und B (2) (Abbildung 1), die den mitochondrialen Elektronentransport inhibieren.^[6] Die Ajudazole sind neue Isochromanonderivate mit einer verlängerten Seitenkette, die einen Oxazolring, ein Z,Z-Dien und ein 3-Methoxybutensäureamid enthält.^[2] Während Ajudazol A (1) an C-15 eine *exo*-Methylengruppe aufweist, befindet sich an dieser Stelle in Ajudazol B (2) eine Methylgruppe. Die Entstehung des Ajudazolgerüsts kann durch ein gemischtes Biosynthesesystem aus Typ-I-Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) vorhergesagt werden.^[7] Allerdings kann die Biosynthese einiger Strukturelemente, wie des Isochromanon-Ringsystems und der *exo*-Methylengruppe von Ajudazol A, nicht durch die Beteiligung einer solchen Megasynthase erklärt werden. Daher war es unsere Zielsetzung, das Biosynthesegencluster von Ajudazol aus *C. crocatus* Cm c5 zu identifizieren, um die zugrunde liegenden biosynthetischen Prozesse zu untersuchen und eine gezielte Herstellung neuer Ajudazolanaloga zu ermöglichen.

Da die beiden Aminosäuren Glycin und Serin in die Struktur der Ajudazole inkorporiert werden, gingen wir davon aus, dass die Biosynthesemaschinerie zwei NRPS-Module enthält. Die Identifizierung des zugehörigen Bio-

synthesegenclusters sollte durch Inaktivierung von NRPS-Adenylierungs(A)-Domänen und anschließendes Screening auf Verlust der Ajudazolproduktion in den Mutanten erfolgen. Interne Sequenzen der A-Domänen (Motive A3–A10)^[8] wurden mithilfe degenerierter Primer von genomischer Cm c5-DNA amplifiziert. Die Sequenzierung resultierte in der Identifizierung von elf Fragmenten aus unterschiedlichen A-Domänen, die alle für insertionelle Mutagenese in Cm c5 verwendet wurden (siehe die Hintergrundinformationen). Die Insertion eines solchen Fragments führte in der Tat zum Verlust der Ajudazolproduktion. Basierend auf diesem Fragment wurde eine DNA-Sonde generiert, mit der die 2304 Klone enthaltende chromosomale Genbank von *C. crocatus* Cm c5 nach entsprechenden Cosmiden durchsucht wurde.^[9] Die Endsequenzen des positiven Cosmids D:D11 zeigten Homologien zu PKS-Genen. Für beide Enden von D:D11 wurden Sonden generiert und damit abermals die chromosomal Genbank durchsucht, wobei das restliche Gencluster auf den überlappenden Cosmiden C:B8 und B:A15 lokalisiert wurde. Die Sequenzierung der drei Cosmide (gesamt 104 292 bp) führte zur Beschreibung des Biosynthesegenclusters von Ajudazol, das einen kontinuierlichen Abschnitt von 70 839 bp auf dem Genom von *C. crocatus* umfasst (das Gencluster wurde in der EMBL-Datenbank unter der Zugangsnummer AM946600 hinterlegt).

Der durchschnittliche (Guanin+Cytosin)-Gehalt des Genclusters beträgt 70.3 %, was charakteristisch für Myxobakterien ist.^[10] Das Cluster besteht aus zwölf Genen; acht codieren für Typ-I-PKS (*ajuA-ajuC*, *ajuE-ajuH* und *ajuK*), eines für eine NRPS (*ajuD*) und eines für ein NRPS-PKS-Hybridprotein (*ajuL*) (Tabelle 1). Die Definition des Genanfangs basierend auf der Analyse der Ribosombindestellen ist in Myxobakterien oft schwierig, daher wurden die Startcodons mehrerer Gene mithilfe von Sequenzvergleichen translatierter N-terminaler Protein-Interaktionsdomänen („docking domains“) bestimmt.^[11] Die Sequenzanalyse der NRPS-Module ergab, dass die Inaktivierungsmutagenese in der A-Domäne von *ajuD* erfolgte.

Der gemischte PKS-NRPS-Biosyntheseweg der Ajudazole weist ein hohes Maß an Kolinearität zwischen der Anordnung und Anzahl der Module und der benötigten Menge an biochemischen Reaktionen auf, was sehr ungewöhnlich für myxobakterielle Systeme ist.^[12,13] Die einzige Abweichung von dieser kolinearen Beziehung ist die Lage der Gene *ajuK* und *ajuL*, die sich am Ende des Genclusters befinden, aber die ersten Biosyntheseschritte katalysieren (Abbildung 1). *AjuK* besteht aus einem ungewöhnlichen – für myxobakte-

[*] M.Sc. K. Buntin, Dr. S. Rachid, Dr. K. J. Weissman, Prof. Dr. R. Müller
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+ 49) 681-302-5473
E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de
Homepage: <http://www.myxo.uni-saarland.de>
M. Scharfe, Dr. H. Blöcker
Institut für Genomanalyse
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Josef Zapp vom Institut für Pharmazeutische Biologie für die Aufnahme der NMR-Spektren. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

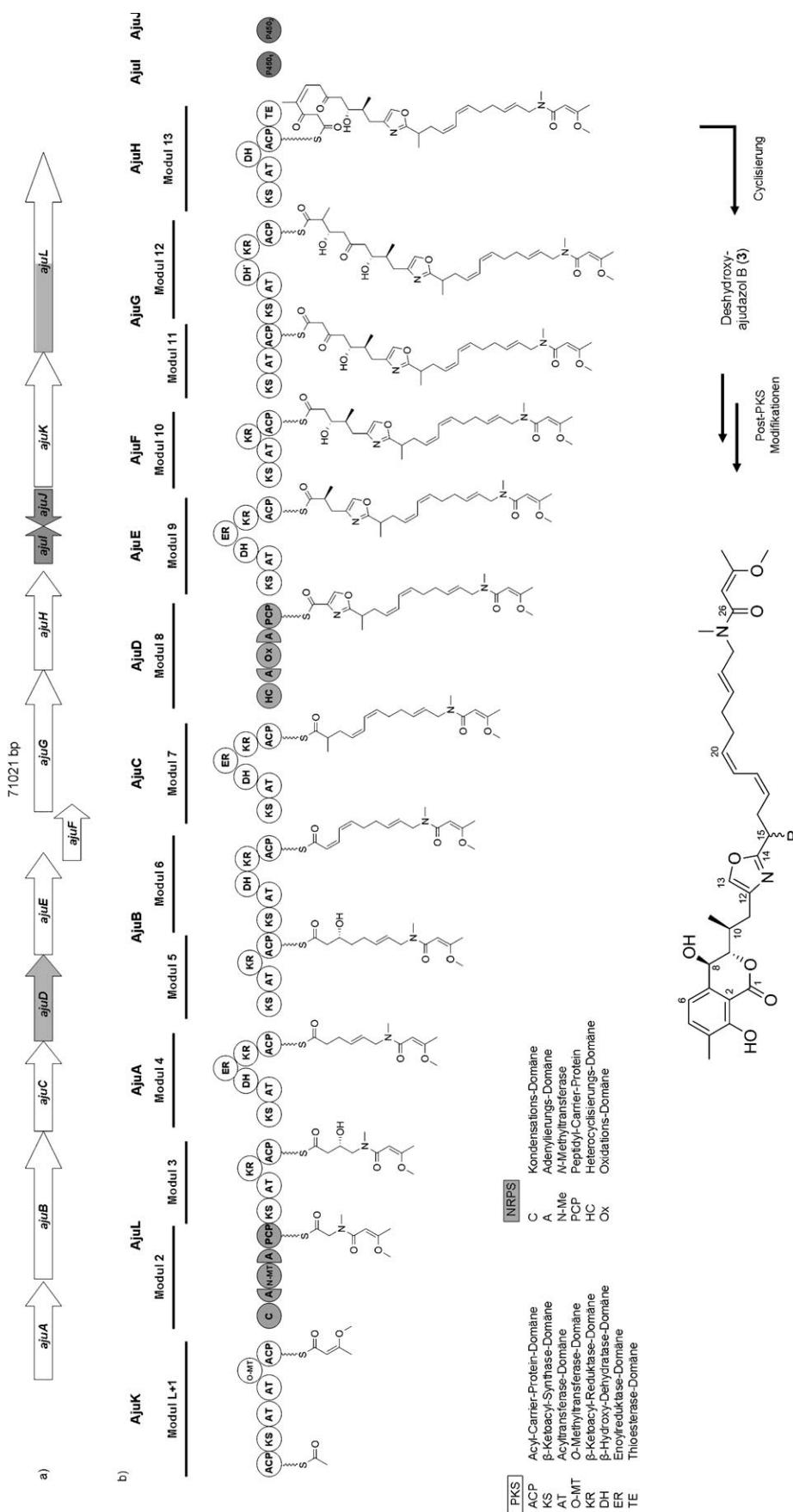


Abbildung 1. Biosynthese von Ajudazol A (1) und B (2) in *C. crocatus* Cm c5, a) Organisation des Biosynthesegenclusters. b) Modell für die Biosynthese auf der gemischten PKS-NRPS-Ajudazolsynthase. Die Strukturen von Ajudazol A (1) und B (2) sind dargestellt. Die DH-Domänen in den Modulen 4, 6 und 13 werden vermutlich iterativ genutzt (siehe Text), während die DH mit Stern wahrscheinlich inaktiv ist.

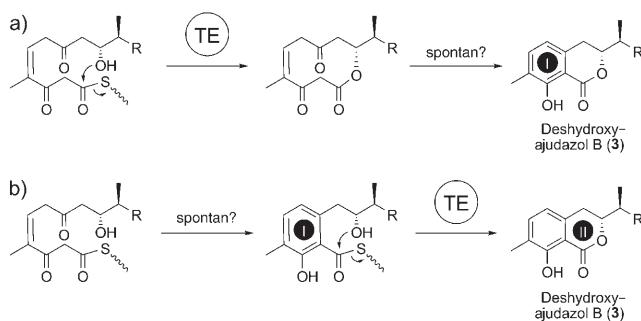
Tabelle 1: Identität und vorgeschlagene Funktion der im Ajudazolbiosynthesegencluster codierten Proteine.

PKS/NRPS-Teil		Proteindomänen (Position in der Sequenz)
Protein (Gen)	Größe (in Da, bp)	
AjuA (<i>ajuA</i>)	230 480/6519	KS (87–1367), AT (1695–2586), DH (2763–3279), ER (4359–5280), KR (5307–5844), ACP (6141–6339)
AjuB (<i>ajuB</i>)	361 780/10212	KS (123–1401), AT (1722–2604), KR (3471–4008), ACP (4326–4536), KS (4596–5883), AT (6204–7086), DH (7287–7818), KR (8970–9507), ACP (9819–10023)
AjuC (<i>ajuC</i>)	236 540/6669	KS (108–1401), AT (1710–2607), DH (2811–3324), ER (4485–5425), KR (5481–6018), ACP (6324–6525)
AjuD (<i>ajuD</i>)	155 250/4227	HC (201–1503), A (1539–3869), Ox (3213–3724), PCP (3939–4134)
AjuE (<i>ajuE</i>)	232 410/6537	KS (27–1290), AT (1605–2502), DH (2694–3204), ER (4356–5289), KR (5352–5889), ACP (6180–6381)
AjuF (<i>ajuF</i>)	167 740/4743	KS (105–1389), AT (1701–2592), KR (3537–4074), ACP (4380–4584)
AjuG (<i>ajuG</i>)	312 570/8841	KS (111–1392), AT (1695–2592), ACP (2928–3132), KS (3198–4491), AT (4806–5697), DH (5877–6426), KR (7539–8097), ACP (8400–8607)
AjuH (<i>ajuH</i>)	172 740/4743	KS (108–1392), AT (1704–2598), DH (2817–3345), ACP (3828–4029), TE (4167–4842)
AjuK (<i>ajuK</i>)	312 570/8841	ACP (75–276), KS (348–1605), AT (1848–2736), AT (3171–4065), O-MT (4332–5378), ACP (5382–5529)
AjuL (<i>ajuL</i>)	337 710/9384	C (174–1497), A (1521–4278), N-MT (2933–4149), PCP (4344–4539), KS (4623–5895), AT (6207–7125), KR (8121–8658), ACP (8955–9159)
Modifizierende Enzyme		
Protein (Gen)	Größe (in Da, bp)	Homologes Protein, Ursprung (Identität [%], Ähnlichkeit [%]; Zugangsnummer)
Ajul (<i>ajul</i>)	51 700/1377	Cytochrome P450 TaH, <i>Myxococcus xanthus</i> (37, 58; CAB40542)
AjuJ (<i>ajuj</i>)	54 910/1470	Cytochrome P450 TaH, <i>Myxococcus xanthus</i> (36, 56; CAB4054)

rielle Systeme jedoch bereits beschriebenen – ersten Modul, das Domänen sowohl für den Kettenstart als auch die Kettenverlängerung enthält.^[7,14] Teil dieses Moduls ist auch eine SAM-abhängige *O*-Methyltransferase, deren Funktion wahrscheinlich die Methylierung der Enolform des Diketides ist. Dieser Reaktionsmechanismus wurde bereits für die Entstehung der β -Methoxy-Acrylatfunktionalitäten in Myxothiazol und Melithiazol postuliert.^[15,16] Die restlichen Schritte der Biosynthese können leicht in Einklang mit den einzelnen Modulen der Unterheiten AjuA–AjuH gebracht werden. Diese enthalten sowohl AT- bzw. A-Domänen mit entsprechenden Spezifitäten als auch die benötigten Domänen für reduzierende Reaktionen. Die einzige Ausnahme stellen hier die DH-Domänen dar. Während die DH-Domänen in Modul 3 und 5 komplett fehlen, sind in der DH aus Modul 12 nur wenige der notwendigen konservierten Aminosäurereste im aktiven Zentrum vorhanden. Daher ist diese DH vermutlich inaktiv. Wie bereits für andere myxobakterielle Systeme beschrieben, kann die Funktion der fehlenden DHs eventuell durch eine iterative Nutzung der DH-Domänen in den nachfolgenden Modulen 4, 6 und 13 komplementiert werden.^[14,17,18] Die Ajudazole enthalten eine *E*- und zwei *Z*-Doppelbindungen. Im Unterschied zu anderen myxobakteriellen Biosynthesensystemen^[17] korreliert hier die vorhergesagte Stereochemie des Vorläuferalkohols nicht in jedem Fall mit der beobachteten Doppelbindungsgeometrie (siehe

die Hintergrundinformationen),^[19] So entstehen aus den erwarteten B-Typ-Alkoholen in den Modulen 5 und 6 *Z(cis)*-Doppelbindungen. Daher bleibt in diesen Fällen der Kontrollmechanismus für die Doppelbindungskonfiguration im Unklaren.

Aromatische Strukturen werden in der Regel in Bakterien von Typ-II- oder Typ-III-PKS gebildet, nicht aber von modularen Typ-I-PKS. Eine Ausnahme stellt das Chromonring-System von Stigmatellin dar, dessen Vorläufer von einer Typ-I-PKS synthetisiert und dann vermutlich mittels einer C-terminalen Cyclasedomäne aromatisiert wird.^[20] Am Ende der PKS-Untereinheit AjuH befindet sich keine analoge Cyclasedomäne, die das Ajudazolisochroman-Ringsystem bilden könnte, sondern eine Thioesterase(TE)-Domäne. Diese Domäne ist charakteristisch für PKS- und NRPS-Systeme und katalysiert normalerweise die Produktfreisetzung vom Carrierprotein, entweder durch Hydrolyse oder durch intramolekulare Lactonisierung.^[21] Somit ergeben sich zwei alternative Mechanismen für die Produktfreisetzung und gleichzeitige Bildung des Isochromanringesystems, die in dem vermuteten Zwischenprodukt Deshydroxyajudazol B (3) (Schema 1) resultieren: a) TE-katalysierter Angriff des C-9-Alkohols auf den ACP-gebundenen Thioester, wobei der freie zehngliedrige Lactonring entsteht und nachfolgend eine C2–C7-Aldoladdition zur Aromatisierung von Ring I führt; oder b) Aldoladdition/Aromatisierung zur Bildung von



Schema 1. Vorgeschlagene Reaktionsmechanismen für die Entstehung des Isochromanringssystems und der Produktfreisetzung. a) Die TE katalysiert die Bildung des Lactonrings; anschließend Aldoladdition und Aromatisierung von Ring I. b) Bildung von Ring I durch Aldoladdition und Aromatisierung; anschließend TE-katalysierte Lactonisierung und Produktfreisetzung, bei der Ring II entsteht.

Ring I – wobei das Zwischenprodukt am ACP gebunden bleibt –, und anschließende TE-katalysierte Lactonisierung und Produktfreisetzung, bei der Ring II entsteht. Die Sequenzanalyse zeigte überraschenderweise, dass die Ajudazol-TE eine höhere Ähnlichkeit zu frei stehenden (Typ-II)-TEs aufweist als zu den charakteristischen Typ-I-TE-Domänen (siehe die Hintergrundinformationen). Typ-II-TEs sind vermutlich an der Regenerierung blockierter Assemblierungslinien durch hydrolytische Freisetzung fehlacylierter^[22,23] und im Fall von NRPS falsch aminoacylierter^[24] Carrierproteine beteiligt. Im Falle des Ajudazols ist die Freisetzung der Kette vermutlich eine spontane Reaktion, da weder die vorhergesagte Spezifität der *aju*TE (für kurzkettige Fettsäurereste oder Aminosäuren) noch die Chemie der Produktfreisetzung mit den vorgeschlagenen Mechanismen für die Bildung des Isochromanringssystems übereinstimmen. Allerdings ist die volle Kettenlänge, die für die Bildung des Isochromanons notwendig ist, erst nach der letzten Esterkondensation vorhanden (Abbildung 1). Nach unserem Modell würde die TE die Rolle eines „Chaperons“ für die carrierprotein eingebundene Polyketidkette übernehmen, vergleichbar mit der Funktion von Cyclasedomänen bei der Biosynthese aromatischer Polyketide.^[25] Eine Substanz mit der vorhergesagten Masse von Deshydroxyajudazol B (3) (Schema 1 und 2) ist in der Tat in den Wildtypextrakten von *C. crocatus* (siehe die Hintergrundinformationen) detektierbar. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, wonach Deshydroxylajudazol B ein Zwischenprodukt der Ajudazolbiosynthese ist.

Für die Einführung der Hydroxygruppe an C-8 und der *exo*-Methylengruppe C-15 in Ajudazol A (1) werden Biosynthesereaktionen benötigt, die vermutlich nach der Assemblierung von Deshydroxyajudazol B ablaufen. Die einzigen möglichen Kandidaten für die Katalyse dieser Reaktionen sind die von *ajuI* und *ajuJ* codierten Proteine, deren Gene zwischen den PKS-Genen *ajuH* und *ajuK* im Cluster liegen. AjuI zeigt hohe Homologie zu P450-Enzymen aus den Myxobakterien *Myxococcus xanthus*^[26,27] und *Sorangium cellulosum*,^[14,28] während uncharakterisierte P450-Enzyme von den Cyanobakterien *Nostoc punctiforme* PCC 73102 und *Nodularia spumigena* CCY 9414 hohe Ähnlichkeit zu AjuJ aufweisen. Die beiden Proteine weisen eine Sequenzhomolo-

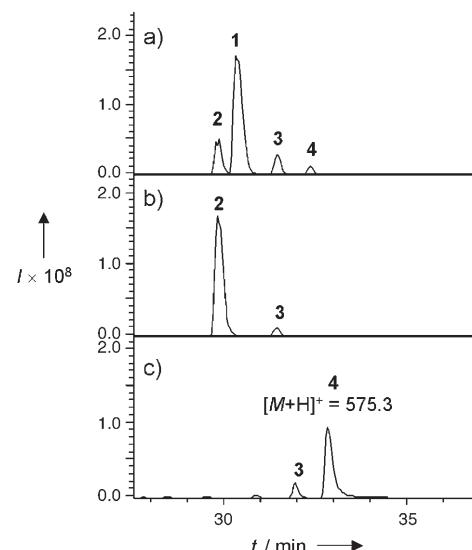


Abbildung 2. HPLC-MS-Chromatogramme der Kulturextrakte von a) *C. crocatus* Cm c5 Wildtyp und den Mutanten von b) *ajul* und c) *ajuJ*. Gezeigt wird das Basepeak-Chromatogramm (BPC) im Massenbereich 575.0–594.0. Die Mutante von *ajul* produziert verglichen mit dem Wildtyp stark erhöhte Mengen an Deshydroxyajudazol A (4) ($m/z [M+H]^{+} = 575.3$) (Ajudazol A (1): $[M+H]^{+} = 591.3$; Ajudazol B (2): $[M+H]^{+} = 593.3$; Deshydroxyajudazol B (3): $[M+H]^{+} = 577.3$).

logie von 38 % zueinander auf. Um die Rolle von AjuI und AjuJ in der Biosynthese der Ajudazole zu klären, wurden beide Gene durch insertionelle Mutagenese im Cm-c5-Chromosom inaktiviert (siehe die Hintergrundinformationen).

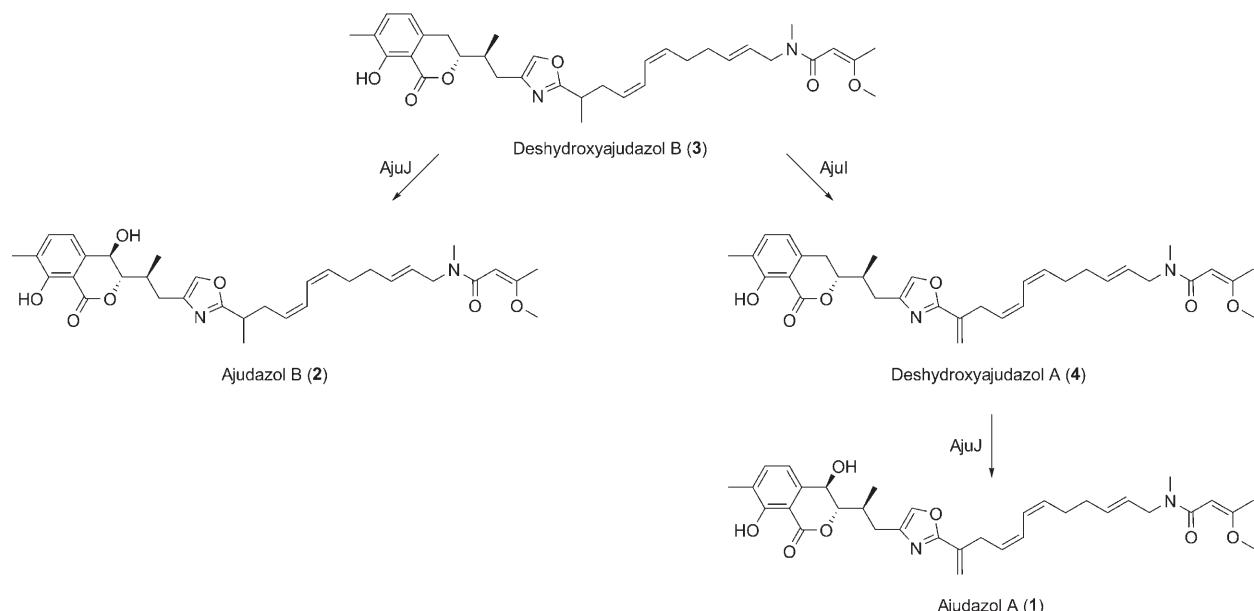
Die HPLC-MS-Analyse der Extrakte zeigte, dass die *ajul*-Mutante kein Ajudazol A (1) mehr herstellt, während die Produktion von Ajudazol B (2) signifikant ansteigt (Abbildung 2). Die *ajuJ*-Mutante produziert weder Ajudazol A noch B. Es konnte jedoch in den HPLC-MS-Analysen der Mutantenextrakte eine bisher uncharakterisierte Substanz 4 ($m/z [M+H]^{+} = 575.3$) mit einer Ausbeute von 0.33 mg L^{-1} detektiert werden. Eine erneute Analyse der Wildtypdaten zeigte, dass auch dort 4 vorkommt, allerdings in weitaus geringerer Menge (Abbildung 2). Die Substanz wurde aufgereinigt und ihre Struktur durch NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen). Dadurch wurde der Sekundärmetabolit als Deshydroxyderivat von Ajudazol A identifiziert, dem eine OH-Gruppe an C-8 fehlt (Tabelle 2).

Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse macht es uns möglich, eine Hypothese für den Ablauf der post-PKS-Modifikationen in der Ajudazolbiosynthese aufzustellen (Schema 2), obwohl wir nicht mit letzter Sicherheit ausschließen können, dass die oxidative Modifizierung auch an einem ACP-gebundenen Zwischenprodukt erfolgen könnte. Wahrscheinlich wird zunächst Deshydroxyajudazol B (3) vom Multienzym AjuH freigesetzt. Dieses dient dann als Substrat für die beiden P450-Enzyme AjuI und AjuJ. Wenn AjuJ zuerst tätig wird, entsteht Ajudazol B (2), das von AjuI nicht mehr als Substrat erkannt wird. Wenn jedoch zunächst AjuI die Bildung von Deshydroxyajudazol A (4) katalysiert, wird dieses von AjuJ als Substrat erkannt und zu Ajudazol A (1)

Tabelle 2: Ausgewählte NMR-Daten für Ajudazol A (1) und Deshydroxyajudazol A (4).^[a]

Atom	Ajudazol A (1) ^[a]				Deshydroxyajudazol A (4) ^[b]			
	δ_{H}	M	J	δ_{C}	δ_{H}	M	J	δ_{C}
6	6.95	d	7.6	116.63	6.72	d	7.3	118.63
7	—	—	—	140.21	—	—	—	108.59
8	4.79	d(d)	6.7	63.87	—	—	—	30.4
8-OH	6.01	d	6.5	—	—	—	—	—
9	4.39	dd	6.7, 5.6	87.26	4.5	ddd	9.1, 6.4, 6.4	84.69
10	—	—	—	33.29	—	—	—	34.75
15	—	—	—	134.36	—	—	—	136.12
15-CH _a	—	br	—	117.42	—	br	—	118.55
15-CH _b	—	br	—	—	—	br	—	118.55
16 _a , 16 _b	3.27	d	7.8 br	30.03	3.35	d	7.31	31.21

[a] NMR-Spektrum reproduziert nach Jansen et al.^[2] [b] In [D₆]MeOH bei 500 MHz.



Schema 2: Vorgeschlagener Mechanismus für die post-PKS-Modifikationen, die von den Cytochrom-P450-Enzymen Ajul und AjuJ katalysiert werden.

umgesetzt. P450-katalysierte Dehydrierungen, wie hier für AjuI vorgeschlagen, sind keine ungewöhnlichen Reaktionen im eukaryotischen Primärmetabolismus und in eukaryotischen Entgiftungsmechanismen.^[29] Sie spielen sowohl in der Biosynthese der Pilzmetabolite Aflatoxin und Sterigmatocystin^[30] als auch in der Flavonbiosynthese in Pflanzen eine Rolle.^[31] Unseres Wissens ist die hier beschriebene Dehydrierung jedoch das erste Beispiel aus einem bakteriellen Stoffwechselsystem. Wenn kein AjuJ vorhanden ist – wie in der Mutante *ajuJ* –, reichert sich im Bakterium Deshydroxyajudazol A (4) an. Ist dagegen kein AjuI verfügbar, so wird Deshydroxyajudazol B (3) durch AjuJ zu Ajudazol B (2) umgesetzt. Betrachtet man den signifikant höheren Anteil an Ajudazol A (1) in Wildtypextrakten von *C. crocatus*, so ist AjuI vermutlich ein effizienterer Katalysator als AjuJ.

Stichwörter: Biosynthesen · Cytochrom P450 · Myxobakterien · Naturstoffe · Polyketid-Synthasen

- [1] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [2] R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 917–921.
- [3] B. Kunze, R. Jansen, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 285–290.
- [4] R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2684–2689.
- [5] R. Jansen, P. Washausen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1085–1089.
- [6] B. Kunze, R. Jansen, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 151–155.
- [7] S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1211–1224.
- [8] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.
- [9] S. Rachid, D. Krug, I. Kochems, B. Kunze, M. Scharfe, H. Blöcker, M. Zabriski, R. Müller, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 667–681.

Eingegangen am 6. Dezember 2007
Online veröffentlicht am 6. Mai 2008

- [10] L. J. Shimkets in *Myxobacteria II* (Hrsg.: M. Dworkin, D. Kaiser), American Society for Microbiology, Washington, **1993**, S. 85–108.
- [11] C. D. Richter, D. Nietlispach, R. W. Broadhurst, K. J. Weissman, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 75–81.
- [12] M. Kopp, H. Irschik, S. Pradella, R. Müller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1277–1286.
- [13] S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 447–458.
- [14] B. Frank, J. Knauber, H. Steinmetz, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Beyer, R. Müller, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 221–233.
- [15] B. Silakowski, H. U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blöcker, G. Höfle, S. Beyer, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37391–37399.
- [16] S. Weinig, H. J. Hecht, T. Mahmud, R. Müller, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 939–952.
- [17] O. Perlova, K. Gerth, A. Hans, O. Kaiser, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 174–191.
- [18] L. Tang, S. Ward, L. Chung, J. R. Carney, Y. Li, R. Reid, L. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 46–47.
- [19] P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657.
- [20] N. Gaitatzis, B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13082–13090.
- [21] R. M. Kohli, C. T. Walsh, *Chem. Commun.* **2003**, 297–307.
- [22] M. L. Heathcote, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 207–220.
- [23] D. Schwarzer, H. D. Mootz, U. Linne, M. A. Marahiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14083–14088.
- [24] E. Yeh, R. M. Kohli, S. D. Bruner, C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1290–1293.
- [25] C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162–190.
- [26] B. S. Goldman, W. C. Nierman, D. Kaiser, S. C. Slater, A. S. Durkin, J. Eisen, C. M. Ronning, W. B. Barbazuk, M. Blanchard, C. Field, C. Halling, G. Hinkle, O. Iartchuk, H. S. Kim, C. Mackenzie, R. Madupu, N. Miller, A. Shvartsbeyn, S. A. Sullivan, M. Vaudin, R. Wiegand, H. B. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15200–15205.
- [27] V. Simunovic, J. Zapp, S. Rachid, D. Krug, P. Meiser, R. Müller, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1206–1220.
- [28] S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeier, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten, J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A. Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goesmann, C. Groeger, F. Gross, L. Jelsbak, L. Jelsbak, J. Kalinowski, C. Kegler, T. Knauber, S. Konietzny, M. Kopp, L. Krause, D. Krug, B. Linke, T. Mahmud, R. Martinez-Arias, A. C. McHardy, M. Merai, F. Meyer, S. Mormann, J. Muñoz-Dorado, J. Perez, S. Pradella, S. Rachid, G. Raddatz, F. Rosenau, C. Ruckert, F. Sasse, M. Scharfe, S. C. Schuster, G. Suen, A. Treuner-Lange, G. J. Velicer, F. J. Vorhölter, K. J. Weissman, R. D. Welch, S. C. Wenzel, D. E. Whitworth, S. Wilhelm, C. Wittmann, H. Blöcker, A. Pühler, R. Müller, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1281–1289.
- [29] P. R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Kluwer/Plenum, New York, **2005**.
- [30] H. S. Kelkar, T. W. Skloss, J. F. Haw, N. P. Keller, T. H. Adams, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1589–1594.
- [31] T. Akashi, M. Fukuchi-Mizutani, T. Aoki, Y. Ueyama, K. Yonekura-Sakakibara, Y. Tanaka, T. Kusumi, S. Ayabe, *Plant Cell Physiol.* **1999**, *40*, 1182–1186.