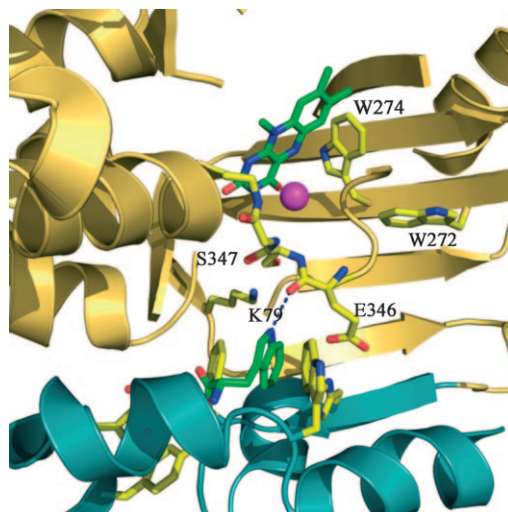


# Zum Mechanismus der enzymatischen Chlorierung von Tryptophan\*\*

Silvana Flecks, Eugenio P. Patallo, Xiaofeng Zhu, Aliz J. Ernyei, Gotthard Seifert, Alexander Schneider, Changjiang Dong, James H. Naismith und Karl-Heinz van Pée\*

Flavin-abhängige Halogenasen spielen eine zentrale Rolle bei biologischen Halogenierungsreaktionen. Für die halogenierende Aktivität benötigen diese Enzyme reduziertes FAD, das durch ein zweites Enzym, eine Flavin-Reduktase, aus FAD und NADH gebildet wird. Obwohl in einigen Fällen Flavinreduktasegene in Biosynthesegenclustern von Halometaboliten vorhanden sind, besteht Unklarheit darüber, ob die entsprechende Flavin-Reduktase direkt mit der Halogenase interagiert. Zumindest in einigen Fällen können Flavin-Reduktasen aus verschiedenen Bakterien in Kombination mit Halogenasen verwendet werden.<sup>[1–5]</sup> Für die Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus *Pseudomonas fluorescens* BL915, die den ersten Schritt in der Pyrrolnitrinbiosynthese katalysiert,<sup>[6]</sup> konnte gezeigt werden, dass sogar chemisch reduziertes FAD von der Halogenase für die Halogenierungsreaktion genutzt werden kann.<sup>[7]</sup> Aufbauend auf der dreidimensionalen Struktur von PrnA wurde postuliert, dass durch die Reaktion von Halogenase-gebundenem reduziertem FAD mit Sauerstoff Flavinhydroperoxid gebildet wird. Dieses Flavinhydroperoxid reagiert dann mit Chlorid, wodurch hypochlorige Säure entsteht, die durch einen Tunnel von ungefähr 10 Å Länge zum Substrat Tryptophan geleitet wird (Abbildung 1). Dong et al. haben vorgeschlagen, dass ein Lysinrest (K79) eine Wasserstoffbrücke mit der hypochlorigen Säure eingeht und sie dadurch in die richtige Position für die Reaktion mit dem Tryptophan bringt.<sup>[8]</sup> Von Yeh et al. wurde die Bildung von Chloramin durch die Reaktion von HOCl mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins nachgewiesen.<sup>[9]</sup> Dieser Befund legt nahe, dass eher Chloramin als HOCl das aktive Agens ist. Die Wichtigkeit von Lysin 79 ist unstrittig, da ein Austausch von Lysin 79 gegen ein Alanin zu einem vollständigen Verlust der halogenierenden Aktivität führt, wie für PrnA<sup>[8]</sup> und für die Tryptophan-7-Halogenase RebH aus der Rebeccamycinbiosynthese gezeigt werden konnte.<sup>[9]</sup> Allerdings müssen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, da die Chlorierung von



**Abbildung 1.** Aktives Zentrum von PrnA: Die Aminosäurereste, die ausgetauscht wurden, sind durch ihre entsprechenden Sequenznummern gekennzeichnet. Das im aktiven Zentrum gebundene Chloridion ist als violette Kugel in der Nähe des Isoalloxazinrings von FAD gezeigt. Das Indol-NH bildet eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff der Peptidbindung zwischen E346 und S347.

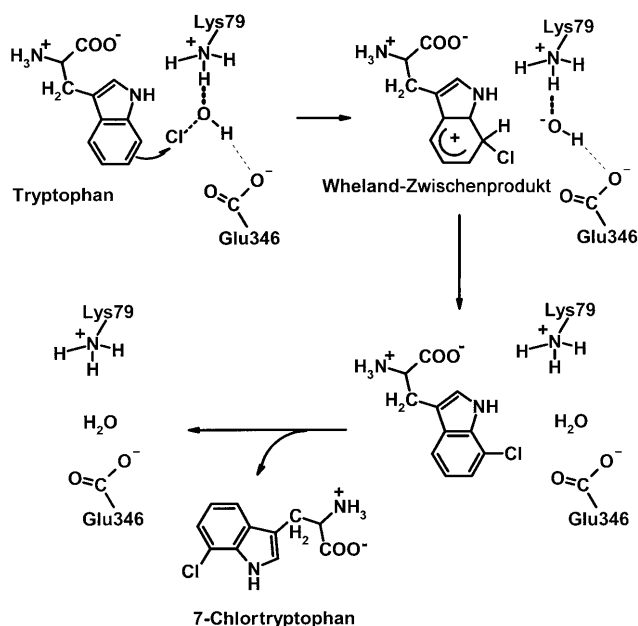
Tryptophan durch Chloramin (oder HOCl) in Lösung nicht gelingt.<sup>[10,11]</sup> Chloramin ist ein schwächeres Halogenierungsreagens als HOCl<sup>[12]</sup> und laut quantenchemischen Rechnungen verringert die Bildung von *N*-Chloramin die Elektrophilie der Chlorspezies, d.h., die Ladung  $Q(\text{Cl})$  wird auf  $-0.07$  im Vergleich zu  $Q(\text{Cl}) = +0.017$  in freiem HOCl vermindert.

Im aktiven Zentrum befindet sich Glutamat 346 auf der K79 gegenüberliegenden Seite des Tunnels, und die Positionierung des Substrats wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Gruppe des Indolrings und dem Sauerstoff der Peptidbindung zwischen E346 und Serin 347 (S347) unterstützt (Abbildung 1). Ein Hinweis, dass E346 am katalytischen Zyklus beteiligt sein könnte, ergab sich aus dem Befund, dass eine E346Q-Mutante um zwei Zehnerpotenzen weniger aktiv ist.<sup>[8]</sup> Während K79 in allen bisher bekannten Flavin-abhängigen Halogenasen absolut konserviert ist, sind E346 und S347 nur in den Flavin-abhängigen Tryptophan-Halogenasen konserviert und fehlen in Halogenasen, die Substrate mit einem Phenol- oder Pyrrolring akzeptieren. Dong et al. haben vorgeschlagen, dass E346 für die Abstraktion eines Protons vom Wheland-Zwischenprodukt und für dessen Stabilisierung benötigt wird (Schema 1).<sup>[8]</sup> Allerdings lässt sich diese verallgemeinerte Rolle nicht mit dem Fehlen von E346 in Nicht-Tryptophan-Halogenasen in Ein-

[\*] Dr. S. Flecks,<sup>[‡]</sup> Dr. E. P. Patallo,<sup>[‡]</sup> Dipl.-Ing. A. J. Ernyei, Dipl.-Lebensmittelchem. A. Schneider, Prof. K.-H. van Pée Biochemie, TU Dresden, 01062 Dresden (Deutschland)  
Fax: (+49) 351-463-35506  
E-Mail: karl-heinz.vanpee@chemie.tu-dresden.de  
Prof. G. Seifert  
Physikalische Chemie, TU Dresden, 01062 Dresden (Deutschland)  
X. Zhu, Dr. C. Dong, Prof. J. H. Naismith  
Centre for Biomolecular Science  
University of St Andrews, KY169ST (Großbritannien)

[†] F.S. und E.P.P. trugen gleichwertig zu dieser Arbeit bei.

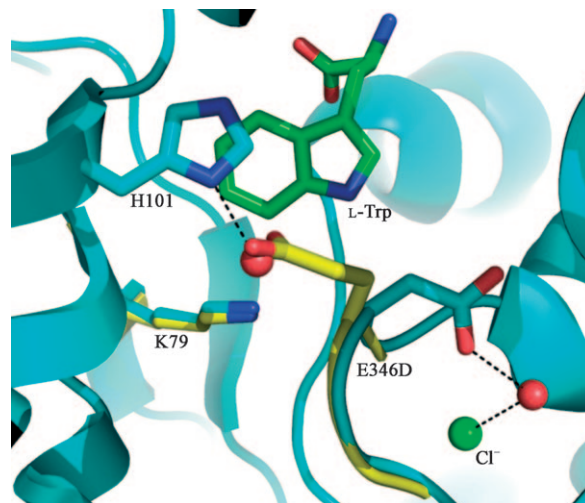
[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (PE-348/17-2) und die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (14262 BG/1) unterstützt.



**Schema 1.** Vorgeschlagerener Mechanismus für die regioselektive Chlorierung von Tryptophan, der die Beteiligung von K79 und E346 zur Erhöhung der Elektrophilie der Chlorspezies und für ihre korrekte Positionierung für den Einbau in die 7-Position zeigt. Die starke Wechselwirkung des HOCl-Sauerstoffs mit der protonierten  $\epsilon$ -Aminogruppe von K79 ist durch eine dick gestrichelte Linie und die schwache Wechselwirkung des HOCl-Wasserstoffs mit der Carboxylatgruppe von E346 durch eine dünne gestrichelte Linie dargestellt.

klang bringen. Der wichtige chemische Unterschied besteht darin, dass im Gegensatz zu Tryptophan Substrate mit einem Phenol- oder Pyrrolring durch HOCl oder Chloramin chloriert werden können. Tryptophan dagegen reagiert mit HOCl zum Oxindolderivat des Tryptophans.<sup>[11]</sup>

Um die Bedeutung von E346 für die Halogenasereaktion zu analysieren, wurde es durch ortsspezifische Mutagenese gegen einen Aspartatrest ausgetauscht. Die Röntgenstrukturanalyse zeigte, dass die dreidimensionale Struktur der E346D-Mutante bis auf die Mutationsstelle mit der Struktur des Wildtyp-Enzyms identisch ist. Der Aspartatrest hat eine andere Orientierung als Glutamat, während K79, das Chloridion und FAD genau so positioniert sind wie im Wildtyp-Enzym (Abbildung 2). E346D ist wie K79A ebenfalls inaktiv, obwohl durch die Mutation keine weitere Komponente der Reaktion verändert wurde. Eine einfache sterische Rolle für die Orientierung des Substrats scheint aus drei Gründen unwahrscheinlich: Das zusätzliche Wassermolekül in der Mutante könnte einen ähnlichen Effekt herbeiführen, die Position des Tryptophans ist unverändert, und die isosterische E346Q-Mutante zeigt eine sehr stark verminderte Aktivität. Diese Daten legen nahe, dass die Bildung von Chloramin (oder HOCl) nicht der einzige chemische Schlüsselschritt ist. Wir schlagen daher vor, dass die räumliche Anordnung der negativen Ladung für den Mechanismus entscheidend ist. Da E346 nicht in allen Halogenasen konserviert ist, ist es nur für die Tryptophan-Halogenasen von entscheidender Bedeutung. Die negative Ladung geht eine Wechselwirkung mit HOCl oder Chloramin ein, wodurch die Elektrophilie der Chlor-



**Abbildung 2.** Aktives Zentrum der E346D-Mutante (C: grün und cyan, O: rot, N: blau). Das Wildtyp-Enzym ist in Gelb dargestellt. Die Mutation führt zu keiner Veränderung bei K79,  $\text{Cl}^-$ , Tryptophan oder FAD. Die Seitenkette von E346D hat ein Wassermolekül aus dem Wildtyp-Enzym ersetzt.

spezies erhöht und exakt an der 7-Position des Indolrings positioniert wird (Schema 1).

Quantenchemische Rechnungen legen nahe, dass eine schwache Wechselwirkung des Protons von HOCl mit der Carboxylatgruppe des Glutamats die Ladung der Chlorspezies von +0.017 auf +0.057 erhöhen würde. Die entsprechende Wechselwirkung mit dem Proton am Stickstoff des Chlorlysins ist nicht möglich, da der Abstand im Wildtyp-Enzym größer als 5 Å ist. Eine starke Wechselwirkung zwischen dem Wasserstoffatom des HOCl und der Carboxylatgruppe würde zu einer Abstraktion des HOCl-Protons und damit zu einer Erniedrigung der Ladung der Chlorspezies auf -0.013 führen. Die E346D-Struktur zeigt, dass die kürzere Aspartatseitenkette sowohl zu weit weg als auch falsch orientiert ist, um mit dem Proton des HOCl zu interagieren.

Eine Wechselwirkung zwischen dem Chlor des HOCl und der Carboxylatgruppe von E346 wäre ungünstig (dies wird durch quantenmechanische Rechnungen gestützt). In einer uneingeschränkten Umgebung würde sich das Chloratom von der Carboxylatgruppe weg bewegen. Allerdings kann für das eingeschränkte Volumen des aktiven Zentrums nicht ausgeschlossen werden, dass die negative Ladung des Carboxylats zur Polarisierung des Chloratoms sowohl von HOCl als auch des *N*-Chlorlysins beitragen könnte, auch wenn das eher unwahrscheinlich ist.

S347, das sich zwischen K79 und dem Flavin-Cofaktor befindet, könnte die erste Aminosäure sein, die mit dem HOCl interagiert, und dadurch helfen, das HOCl in den Tunnel zu ziehen und an das K79 weiterzuleiten. Allerdings ist S347 im Unterschied zu K79 für die Aktivität nicht absolut wesentlich, da ein Austausch gegen einen Alaninrest die halogenierende Aktivität nicht vollständig zerstört. Das Enzym ist immer noch aktiv, mit einer Erniedrigung von  $V_{\text{max}}$  auf etwa 25 % im Vergleich zum Wildtyp-Enzym, wohingegen  $K_m$  nicht signifikant verändert ist (Tabelle 1).

**Tabelle 1:**  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte der Wildtyp-PrrnA und einiger Mutanten, erhalten aus Hanes-Diagrammen.

Enzym	$K_m$ [ $\mu$ M]	$V_{max}$ [ $\mu$ mol min <sup>-1</sup> ]
PrrnA	17.1 $\pm$ 4.4	43 $\pm$ 4
PrrnA_S347A	10.0 $\pm$ 3.4 <sup>[a]</sup>	17 $\pm$ 1.2 <sup>[a]</sup>
PrrnA_W272F	13.3 $\pm$ 3.0	67 $\pm$ 2
PrrnA_W274F	22.3 $\pm$ 2.9	45 $\pm$ 3
PrrnA_W272F_W274F	17.5 $\pm$ 1.5	88 $\pm$ 8
PrrnA_W272A	29.6 $\pm$ 2.1	74 $\pm$ 5
PrrnA_W274A	keine Aktivität	keine Aktivität
PrrnA_W272A_W274A	kein Enzym	kein Enzym

[a] Wegen der geringen Aktivität dieser Mutanten war es schwierig, die kinetischen Daten genau zu ermitteln.

Die Aminosäurereste W272 und W274 sind ebenfalls in allen bisher entdeckten Flavin-abhängigen Halogenasen absolut konserviert.<sup>[13]</sup> Dong et al. hatten vorgeschlagen, dass diese beiden großen Aminosäureseitenketten die Bindung eines organischen Substrats in der Nähe des Isoalloxazinrings verhindern und somit die Funktion des Enzyms als Monoxygenase nicht möglich sei.<sup>[8]</sup> Wenn diese beiden Aminosäuren einzeln oder zusammen gegen Phenylalaninreste ausgetauscht wurden, konnte keine Änderung in der halogenierenden Aktivität nachgewiesen werden. Die  $K_m$ -Werte für W272F, W274F und die W272F\_W274F-Doppelmutante wurden zu 13.3, 22.3 bzw. 17.5  $\mu$ M bestimmt. Diese Werte sind nahezu identisch zu dem Wert von 17.1  $\mu$ M für das Wildtyp-Enzym (Tabelle 1)

Der Austausch von W272 gegen die kleine Aminosäure Alanin führt ebenfalls zu keiner wesentlichen Änderung von  $K_m$  und  $V_{max}$  (Tabelle 1). Wenn W274, das sich näher am Isoalloxazinring befindet, gegen einen Alaninrest ausgetauscht wurde, war das Enzym vollständig inaktiv. Der Grund für die Konservierung des WXW-Motifs in allen Halogenasen ist unklar, da wir keine In-vivo-Funktion für W272 finden können, und nur bei einer radikalen Mutation ist ein Effekt für W274 zu sehen. Interessanterweise enthält PltD, ein Enzym, von dem ursprünglich angenommen wurde, dass es als Halogenase in der Pyoluteorinbiosynthese fungiert, einen Glycinrest an Position 274.<sup>[14]</sup> Allerdings wurde die Beteiligung von PltD an der Pyoluteorinbiosynthese als Halogenase inzwischen ausgeschlossen.<sup>[2]</sup> Daher könnte die Aufklärung der tatsächlichen Rolle von PltD an der Pyoluteorinbiosynthese dabei helfen, die Funktion des WXW-Motifs in Flavin-abhängigen Halogenasen zu verstehen.

Für die Bindung und die korrekte Positionierung des Substrats Tryptophan im aktiven Zentrum spielt die Wasserstoffbrücke zwischen dem Indol-NH und dem Sauerstoffatom der Peptidbindung zwischen E346 und S347 eine wichtige Rolle, kann aber nicht durch Mutagenese untersucht werden. Alle Aminosäuren, die in unseren Untersuchungen ausgetauscht wurden, sind in den Tryptophan-Halogenasen mit unterschiedlichen Regioselektivitäten konserviert.<sup>[1,3,6]</sup> Es wird von großem Interesse sein, zu sehen, was die dreidimensionalen Strukturen einer Tryptophan-5- und einer Tryptophan-6-Halogenase preisgeben. Da angenommen werden kann, dass der Mechanismus dieser Enzyme identisch zu dem von PrrnA ist, könnten die Strukturunterschiede helfen, den

Mechanismus noch genauer zu verstehen. Insbesondere die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum muss verändert sein, um die zu halogenierende Position der Chlorspezies exakt zu präsentieren.

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass nicht nur K79, sondern auch E346 für die chlorierende Aktivität absolut notwendig ist. Dies legt nahe, dass die Bildung von Chloramin durch die Reaktion von K79 mit hypochloriger Säure nicht ausreichend ist, um eine Chlorierung von Tryptophan zu erreichen. Da die kovalente Bindung von Chlor im aktiven Zentrum nur in Abwesenheit von Substrat gefunden werden konnte,<sup>[9]</sup> ist es vorstellbar, dass in Anwesenheit von Substrat hypochlorige Säure aufgrund der Reversibilität der Reaktion von Lysin mit hypochloriger Säure rückgebildet wird. Daher könnte HOCl mit beiden Aminosäuren, K79 und E346, wechselwirken, wobei das HOCl-Proton mit der Carboxylatgruppe von E346 interagiert. Dies würde auch erklären, weshalb die E346Q-Mutante eine stark reduzierte Aktivität zeigt,<sup>[8]</sup> da die Säureamidgruppe sowohl als Akzeptor als auch als Donor für eine Wasserstoffbrücke fungieren kann.

## Experimentelles

Die PrrnAE346D-Mutante wurde nach der Anleitung für das Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagen konstruiert, wobei pET28b-prnA als Templat verwendet wurde.<sup>[8]</sup> Die zu mutierenden Positionen sind in den Primern unterstrichen. Die beiden verwendeten Primer waren 5'-TGCTTTCTGGAGCCCCTG-GACTCGACG-3' (Sense) und 5'-TCGAGTCCAGGGGCTCCAG-AAAGCACG-3' (Antisense).

PrrnA\_S347A, PrrnA\_W272F, PrrnA\_W272A, PrrnA\_W274F, PrrnA\_W272A und die entsprechenden Doppelmutanten wurden mittels Overlap-Extension-PCR unter Verwendung von pUC-prnA als Templat konstruiert.<sup>[15]</sup> Die zu mutierenden Positionen sind in den Primern unterstrichen, die Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt. Die Primer, die für PrrnA\_S347A benutzt wurden, waren Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTAAGGAGATTCCACCATTG-AAC-3' (Sense), Primer b: 5'-GTAGATGAAGTAGATCCCCGT-GGCTTCCAGG-3' (Antisense), Primer c: 5'-CCTGGAAGCCAC-GGGGATCTACTTCATCTAC-3' (Sense), Primer d: 5'-GGATCC-TCCAAGCTTCGTTCCACTACAGGC-3' (Antisense).

PrrnA\_W272F, PrrnA\_W272A, PrrnA\_W274F, PrrnA\_W272A und die entsprechenden Doppelmutanten wurden durch Amplifikation eines XhoI-Fragments von prnA, das die Mutation enthielt, und Ligation mit dem restlichen PrrnA-Gen hergestellt. Die verwendeten Primer waren:

Für PrrnA\_W272F: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAG-GAGATTCCACCATTGAACAAGCCGATCAAGAATATCGT-CATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTCGAGAAGACGT-AGCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCGGAATCTTCCAG-GTGAATCC-3' (Antisense).

Für PrrnA\_W274F: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAG-GAGATTCCACCATTGAACAAGCCGATCAAGAATATCGT-CATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTCGAGAAGACGT-AGCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCGGAATCTT-GAAGGTCCATCC-3' (Antisense).

Für PrrnA\_W272F\_W274F: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAGGAGATTCCACCATTGAACAAGCCGATCAAGAATATC-GTCATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTCGAGAA-GACGTAGCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCGGAATCTT-GAAGGTGAATCC-3' (Antisense).

Für PrrnA\_W272A: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAG-GAGATTCCACCATTGAACAAGCCGATCAAGAATATCGT-



CATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTCGAGAAGACGTA-GCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCGGAATCTTCC-AGGTCGCTCCCGAGTT-3' (Antisense).

Für PrnA\_W274A: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAG-GAGATTCCACCATGAACAAGCCGATCAAGAATATCGT-CATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTCGAGAAGACGTA-GCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCGGAATCTTCCGCGT-CCATCCCGAGTT-3' (Antisense).

Für die Doppelmutante PrnA\_W272A\_W274A: Primer a: 5'-CTGCAGGATCCCTCAGGAGATTCCACCATGAACAAGCCG-ATCAAGAATATCGTCATC-3' (Sense), Primer b: 5'-ATGGCTC-GAGAAGACGTAGCCGCTGCCGAACCGGCCAGCATCG-GAATCTTCCGCGTCCCGAGTT-3' (Antisense).

Die Korrektheit der Mutanten wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die nativen und mutierten Proteine wurden mit und ohne His-Tag in *Pseudomonas fluorescens* BL915  $\Delta$  ORF 1–4 produziert. Die His-markierten Enzyme wurden mittels Ni-Chelat-Sepharose-FF-Chromatographie gereinigt, und die Enzyme ohne His-Marker wurden durch Chromatographie an einer Q-Sepharose-FF-Säule (Amersham Bioscience), wie von Keller et al.<sup>[5]</sup> beschrieben, angereichert. Die Aktivität von PrnA wurde wie bereits früher beschrieben bestimmt.<sup>[5,7]</sup> Die Reaktionsmischung bestand aus 55  $\mu$ L PrnA-haltiger Proteinlösung, 10.8 mU FAD-Reduktase, 10  $\mu$ M FAD, 2.4 mM NADH, 12.5 mM  $MgCl_2$ , 100 U Katalase und 0.6 mM Tryptophan in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion abgestoppt und der Ansatz mit HPLC analysiert. Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte wurden die Tryptophankonzentrationen zwischen 5 und 50  $\mu$ M variiert, da höhere Substratkonzentrationen die Reaktion hemmen. Allerdings wurden, insbesondere in Rohextrakten, höhere Substratkonzentrationen eingesetzt, da diese Extrakte noch andere Enzyme enthalten, die Tryptophan als Substrat verwenden. Das mutierte Enzym wurde kristallisiert, und die Daten wurden mit einer Auflösung von 2.3 Å aufgenommen, ähnlich wie für das Wildtyp-Enzym.<sup>[8]</sup> Die Struktur und die Daten wurden hinterlegt (PDB-Code 2jkc).

Für eine Evaluierung des elektrophilen Charakters von HOCl wurden die Mulliken-Ladungen anhand des semiempirischen AM1-Modells am Chlor berechnet. Das HOCl-Molekül wurde zwischen der protonierten Aminogruppe des Lysins und der Carboxylatgruppe des Glutamats positioniert. Die Ladung des Chlors wurde dann als eine Funktion der Länge der Wasserstoffbrücke zwischen dem Proton an der Aminogruppe des Lysins ( $R(NH\cdots O)$ ) und zwischen dem Proton von HOCl und dem Sauerstoff der Carboxylatgruppe des Glutamats ( $R(OH\cdots O)$ ) berechnet. Der Abstand zwischen dem Stickstoffatom der protonierten Aminogruppe und dem Kohlen-

stoffatom der Säuregruppe ( $R(N-C)$ ) wurde entsprechend der Kristallstruktur konstant bei 7.4 Å gehalten.<sup>[8]</sup>

Eingegangen am 27. Mai 2008,  
veränderte Fassung am 27. August 2008  
Online veröffentlicht am 31. Oktober 2008

**Stichwörter:** Enzymatische Halogenierung · Flavin · Hypochlorige Säure · Reaktionsmechanismen · Tryptophan-Halogenase

- [1] S. Zehner, B. Bister, R. D. Süssmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445–452.
- [2] P. C. Dorrestein, E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13843–13848.
- [3] C. Seibold, H. Schnerr, J. Rumpf, A. Kunzendorf, C. Hatscher, T. Wage, A. J. Ernyei, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 401–408.
- [4] S. Lin, S. G. Van Lanen, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12432–12438.
- [5] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380–2382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300–2302.
- [6] P. E. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2147–2154.
- [7] S. Unversucht, F. Hollmann, A. Schmid, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1163–1167.
- [8] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, *309*, 2216–2219.
- [9] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1284–1292.
- [10] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3960–3965.
- [11] M. Morrison, G. R. Schonbaum, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, *45*, 861–867.
- [12] D. I. Pattison, M. J. Davies, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7378–7387.
- [13] A. Hornung, M. Bertazzo, A. Dziarnowski, K. Schneider, K. Welzel, S.-E. Wohler, M. Holzenkämpfer, G. J. Nicholson, A. Bechthold, R. D. Süssmuth, A. Vente, S. Pelzer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 757–766.
- [14] B. Nowak-Thomson, N. Chaney, J. S. Wing, S. J. Gould, J. E. Loper, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2166–2174.
- [15] R. Higuchi, B. Krummel, R. K. Saiki, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7351–7367.