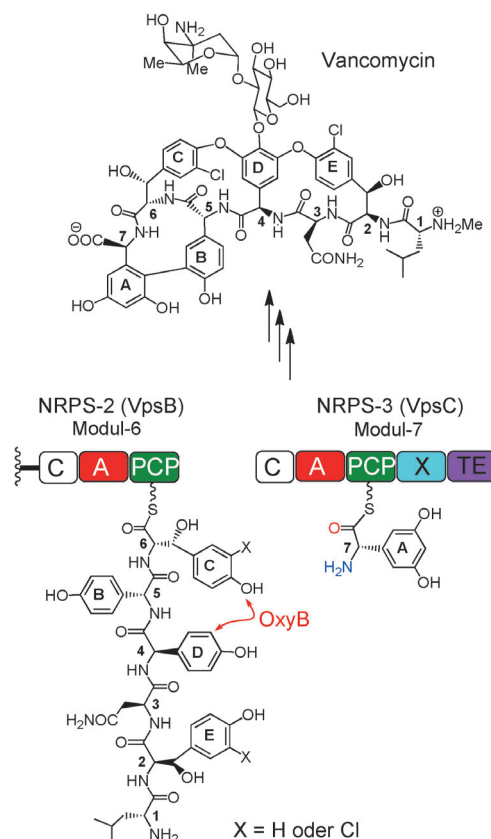


# Studien zur Aktivität des P450-Enzyms OxyB in der Biosynthese von Vancomycin: Einfluss der Chlor- und Hydroxy-Substituenten\*\*

Patrick C. Schmartz, Katharina Wölfel, Katja Zerbe, Emad Gad, El Sayed El Tamany, Hassen K. Ibrahim, Khaled Abou-Hadeed und John A. Robinson\*

Oxidative Phenol-Kupplungen, welche durch bestimmte Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert werden, spielen in der Biosynthese der Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin und Balhimycin eine wichtige Rolle. Für die Biosynthese des gemeinsamen Heptapeptid-Aglykons der beiden Antibiotika werden je ein Molekül (2*S*,3*R*)- und (2*R*,3*R*)- $\beta$ -Hydroxytyrosin (Bht), zwei vom Tyrosin abgeleitete (*R*)-*p*-Hydroxyphenylglycine (Hpg), ein Polyketidderivat (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (Dpg), sowie die natürlichen Aminosäuren Leucin und Asparagin benötigt (Abbildung 1).<sup>[1]</sup> Auffällige Merkmale des Aglykons sind die Biaryl- (A-B) und Biaryl-ether-Verknüpfungen (C-O-D und D-O-E), welche die kuppelförmige Struktur des Moleküls ausbilden. Desweiteren enthalten zwei der cyclisierten aromatischen Seitenketten Chlor-Substituenten. Molekulargenetische Studien der Balhimycin-Biosynthese haben gezeigt, dass das Heptapeptid-Rückgrat durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) zusammengebaut wird, wohingegen die Ringschlüsse in der Reihenfolge C-O-D, D-O-E und schließlich A-B durch die P450-Enzyme OxyB, OxyA und OxyC erfolgen.<sup>[2]</sup> Zwei Chlorierungen werden durch eine einzige Flavin-abhängige Halogenase katalysiert.<sup>[3]</sup> Die genauen Zeitpunkte der Phenol-Kupplungs- sowie der Chlorierungsschritte während der Biosynthese des Vancomycin/Balhimycin-Rückgrats sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Frühere In-vitro-Studien mit Hexapeptid- und Heptapeptid-Modellsubstraten, welche Tyr-Reste an den Positionen 2 und 6 enthalten, haben gezeigt, dass OxyB eine Kupplung zwischen den aromatischen Ringen von Hpg4 und Tyr6 katalysieren kann, wenn das Modellpeptid als C-terminaler Thioester an eine isolierte Peptid-Träger-Protein-Domäne (PCP) aus der Vancomycin-NRPS gebunden ist (Abbildung 1).<sup>[4]</sup> Um Substrate zu erzeugen, die den zu erwartenden biosynthetischen Intermediaten strukturell noch ähnlicher sind, haben wir uns hier vorgenommen, die Tyr2/Tyr6-Reste in den Modellpeptiden mit Bht und/oder *meta*-Chlor- $\beta$ -hy-



**Abbildung 1.** Schlüsselschritte im Aufbau des Rückgrats während der Vancomycin- und Balhimycin-Biosynthese (Vancomycin und Balhimycin haben das gleiche Aglykon). Gezeigt ist die zu erwartende Organisation der Domänen von Modul-6 und -7, in der Vancomycin-NRPS-Untereinheit-2 (VpsB) und -3 (VpsC) (C = Kondensationsdomäne, A = Adenylierungsdomäne, PCP = Peptid-Träger-Protein-Domäne, TE = Thioesterase-Domäne, X = Domäne mit unbekannter Funktion). Das gezeigte Hexapeptid-S-PCP-Thioester-Intermediat sollte durch OxyB cyclisiert werden, bevor die letzte Aminosäure (Dpg7) durch Modul-7 angehängt wird.

[\*] P. C. Schmartz, Dr. K. Wölfel, Dr. K. Zerbe, Prof. K. Abou-Hadeed, Prof. J. A. Robinson

Chemie Departement, Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: robinson@oci.uzh.ch  
Homepage: <http://www.oci.uzh.ch>

E. Gad, Prof. E. S. El Tamany, Prof. H. K. Ibrahim  
Departement der Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften  
Suezkanal-Universität, Ismailia (Ägypten)

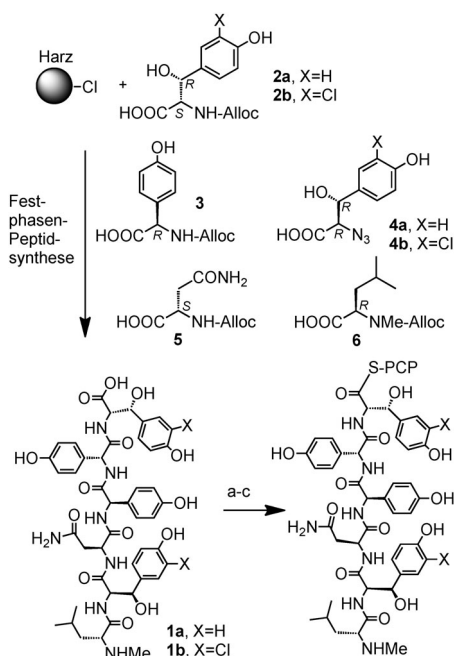
[\*\*] Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die Unterstützung dieser Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204458> zu finden.

droxytyrosin (Cht) zu ersetzen, in der Erwartung, dass das Vorhandensein von  $\beta$ -Hydroxy- und/oder Chlor-Substituenten die Peptide zu besseren Substraten für OxyB machen könnte. Das Gegenteil ist aber der Fall: Wir berichten hier, dass die Einführung von Chlor-Substituenten in einem Hexapeptid-S-PCP die Geschwindigkeit des Ringschlusses durch OxyB drastisch senkt ( $> 20$  mal geringer als beim nichtchlorierten Modellsubstrat), und dass ein Heptapeptid-S-PCP mit einem chlorierten Rest 6 von OxyB nicht mehr als Substrat erkannt und somit nicht in das cyclisierte Produkt umgesetzt

wird. Andererseits hat die Einführung der  $\beta$ -Hydroxygruppen in das Hexapeptid-S-PCP nur einen geringen Effekt auf die Geschwindigkeit der OxyB-Reaktion in diesem In-vitro-System.

Zu Beginn der Arbeiten wurde eine effiziente Festphasensynthese entwickelt, um die Hexapeptid-Vorstufen **1a,b** aus den Aminosäure-Bausteinen **2–6** herzustellen (Schema 1). Diese Peptide enthalten statt eines primären



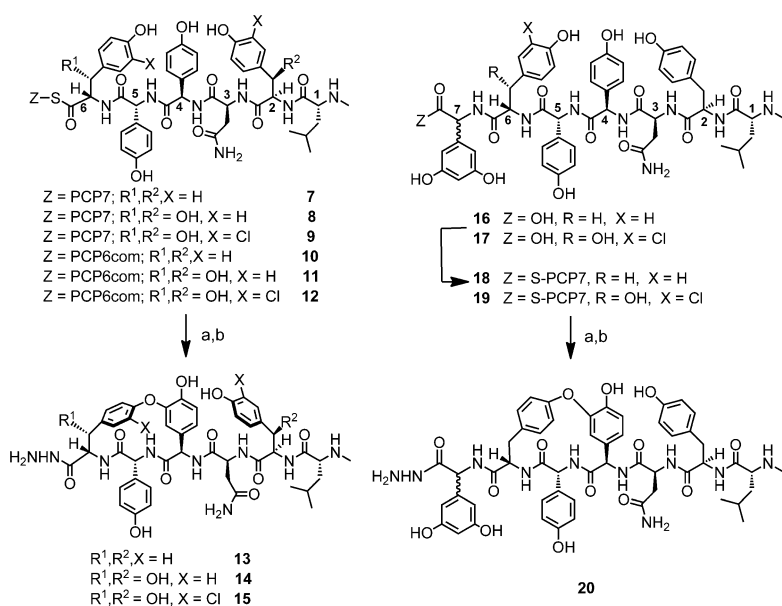
**Schema 1.** Synthese der Hexapeptid-Substrate. Für die Synthese der Aminosäuren **2–6** und die Festphasensynthese von **1a** und **1b**, siehe die Hintergrundinformationen. Reagentien: a) *N*-Methylmorpholin (1.2 Äquiv.), PyBOP (1.2 Äquiv.), PhSH (2.4 Äquiv.), DMF, 30 min, RT; b) CoASH (4.0 Äquiv.), Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.5)-DMF (2:1), 1 h, RT; c) *apo*-PCP-Domäne, Sfp von *B. subtilis*, 30 min, 37°C. Alloc = Allyloxycarbonyl.

Amins eine *N*-Methylgruppe am *N*-Terminus, da C-terminale Thioester-Peptide mit einem unsubstituierten *N*-Terminus sich nur schwer synthetisieren ließen, wohingegen ein sekundäres Amin und ein Thioester unter den hier verwendeten Testbedingungen kompatible funktionelle Gruppen darstellten. Der *N*-Terminus wird normalerweise im letzten Schritt der Aglykon-Biosynthese durch eine *S*-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase methyliert.<sup>[5]</sup> Die Interpretation der Resultate aus den In-vitro-Testversuchen wird unter der Annahme gemacht, dass ein methylierter *N*-Terminus keinen signifikanten Effekt auf die Wechselwirkung zwischen den Substraten mit OxyB hat. Die Synthesestrategie basiert auf früheren Studien und vermeidet größtenteils den Gebrauch von Säuren und Basen sowie Schutzgruppen an den Aminosäure-Seitenketten. Hierdurch konnten Probleme, die durch die zu erwartende Reaktivität der Bausteine und Peptidprodukte entstehen, vermieden werden.<sup>[6]</sup> Die Peptide **1a** und **1b** wurden jeweils mit  $\geq 98\%$  Reinheit nach HPLC-Aufreinigung gewonnen (Gesamtausbeute ca. 3%) und mit Massenspektrometrie (MS) und NMR-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung S1).

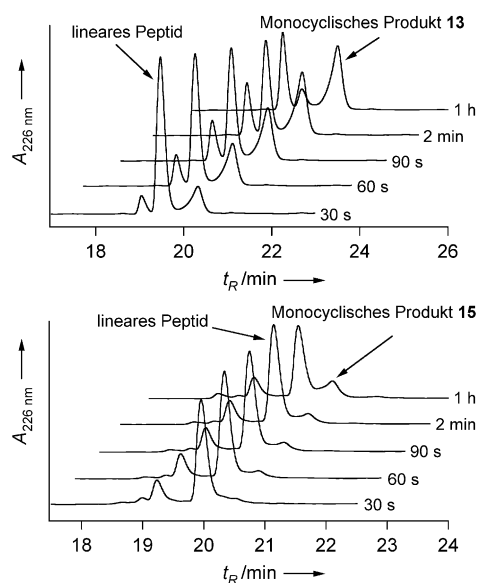
Die Peptide **1a** und **1b** wurden nun schrittweise in die *S*-Phenyl-, die Coenzym-A(CoA)- und die *S*-PCP-Thioester umgewandelt, was eine Optimierung der bereits früher publizierten Methoden erforderte (Schema 1; Abbildung S2 und S3).<sup>[4a,6,7]</sup> Die Bildung der CoA-Thioester verlief effizient in einem Phosphatpuffer/DMF-Gemisch, auch wenn eine sorgfältige Einstellung des pH-Wertes (7.5) nötig war, da sich die Produkte bei pH 8.5 schnell zersetzten. Zwei verschiedene *apo*-PCP-Domänen, eine (*apo*-PCP7) abgeleitet von Modul-7 aus der Untereinheit-3 (VpsC) und die zweite (*apo*-PCP6com) aus Modul-6 der Untereinheit-2 (VpsB) der Vancomycin-NRPS, wurden als rekombinante Proteine mit *N*-terminaler His<sub>6</sub>-Markierung in *E. coli* exprimiert. Die letzte Domäne enthält eine so genannte Kommunikations- oder COM-Domäne und den natürlichen C-Terminus von VpsB. Ähnliche COM-Domänen wurden am Terminus von mehreren NRPS- und Polyketidsynthase- (PKS) Untereinheiten gefunden und spielen üblicherweise eine entscheidende Vermittlerrolle in der Kommunikation zwischen den Untereinheiten.<sup>[8]</sup> Beide PCPs wurden mit MS und CD charakterisiert (siehe Abbildung S4–S6). Die Hexapeptid-CoAs wurden in einer Reaktion, katalysiert durch die Phosphotransferase Sfp, auf die jeweilige *apo*-PCP-Domäne geladen, um die jeweiligen *holo*-Peptid-PCP-Produkte zu bilden.

Testversuche mit OxyB beinhalteten die Inkubation der Hexapeptid-S-PCP Konjugate (**7–12**) mit OxyB und einem Reduktionssystem bestehend aus Spinat-Ferredoxin (spFd), *E. coli*-Flavodoxin-Reduktase (*eco*FldR), NADPH mit Glucose-6-Phosphat (G6P) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) (Schema 2), wie bereits früher beschrieben.<sup>[4]</sup> Die Produkte wurden mit Hydrazin von der PCP-Domäne abgespalten, mithilfe von Festphasenextraktion isoliert und durch analytische HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Zuerst wurden die Substrate **7–12** bezüglich ihrer Umsetzung in das monocyclische Produkt, katalysiert durch OxyB, unter gleichen Testbedingungen miteinander verglichen (Abbildung S7 und Abbildung S8).<sup>[4]</sup> Allgemein wurde beobachtet, dass Substrate, die an PCP7 gebunden waren, etwas effizienter in das monocyclische Produkt umgesetzt wurden, als solche, die mit PCP6com verknüpft waren.

Unter Standardbedingungen wurde das Modell-Hexapeptid-S-PCP7 nach 1 h mit einem Umsatz von etwa 70% in das monocyclische Produkt **13** umgewandelt (Abbildung 2 und Abbildung S7). Geringe Mengen von einem Epimer (10–20%) sowie auch nicht umgesetztes lineares Peptid wurden nach dem Testversuch zurückgewonnen. Das epimere Produkt entsteht wahrscheinlich während des Testversuches durch Epimerisierung an Ca von Tyr6.<sup>[4a,9]</sup> Unter den gleichen Bedingungen wurde das  $\beta$ -hydroxylierte Hexapeptid-S-PCP7 (**8**) mit einer vergleichbaren Effizienz in das monocyclische Produkt **14** umgewandelt. Die Struktur von **14** wurde durch eine Fragmentierungsanalyse mit hochauflösender Elektrosprayionisierungs-MS/MS (HR-ESI-MS/MS) bestätigt (Abbildung S9). Diese Resultate zeigen, dass die Einführung der beiden  $\beta$ -Hydroxygruppen nur einen geringen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit von den Hexapeptiden in das cyclische Produkt mit dem C-O-D-Ring durch OxyB hat.



**Schema 2.** In-vitro-Umsetzung der linearen Hexapeptide (**7–12**) in die monocyclischen Peptide (**13–15**) durch OxyB; sowie die linearen Heptapeptide (**16–19**) und das einzige erhaltene cyclisierte Produkt (**20**). Reagentien: a) OxyB, spFd, *eco*FldR, NADPH, G6P, G6P-DH, Luft, 1 h, 30 °C; b) Hydrazin, 30 min, 30 °C.



**Abbildung 2.** Durch HPLC erhaltene Chromatogramme, welche die typischen Zeitverläufe der Produktbildung (**13** und **15**) aus den Substraten **7** (oben) bzw. **9** (unten) zeigen (siehe auch Abbildung S11). Die Peak-Retentionszeit ( $t_R$ ) und Peak-Absorption bei 226 nm sind gezeigt.

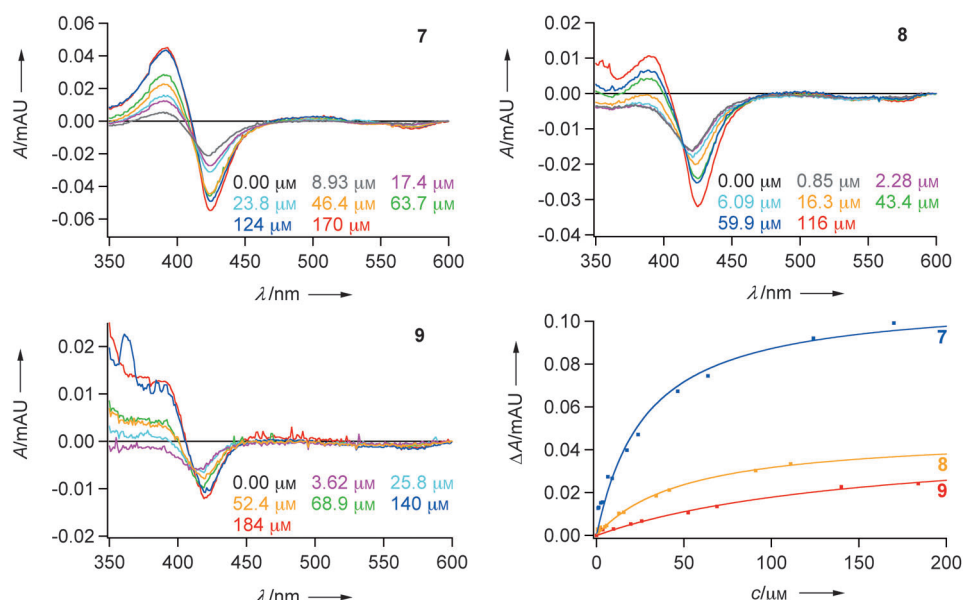
Als Nächstes wurde das  $\beta$ -hydroxylierte und chlorierte Hexapeptid-S-PCP7 (**9**) unter den gleichen Bedingungen getestet. Der Umsatz von **9** zum C-O-D-Ring-Produkt (**15**) war nun wesentlich langsamer (ca. 20 % Umsatz), als es für **7** und **8** beobachtet worden war (Abbildung 2 und Abbildung S8). HR-ESI-MS/MS-Analyse zeigte deutlich die Bildung des C-O-D-Rings (Abbildung S10). Die Fließgleichgewichtskinetik für **9** wurde anhand dieses HPLC-Testversuches untersucht

und ergab einen  $K_m$  von 15.3  $\mu\text{M}$  und einen  $k_{\text{cat}}$  von 0.005  $\text{s}^{-1}$  (Abbildung 2 und Abbildung S11). Die kinetischen Parameter für das Modellsubstrat **7** wurden ebenfalls ermittelt und ergaben einen  $K_m$  von 19.8  $\mu\text{M}$  und einen  $k_{\text{cat}}$  von 0.16  $\text{s}^{-1}$ , was gut mit früher publizierten Werten übereinstimmt.<sup>[4a]</sup> Die Resultate zeigen, dass die Geschwindigkeit der Kupplungsreaktion von einem chlorierten Substrat durch OxyB unter den hier verwendeten Bedingungen deutlich geringer ist ( $k_{\text{cat}}/K_m$  ist etwa 25 mal geringer), wobei der größte Effekt am reduzierten  $k_{\text{cat}}$  ersichtlich ist.

Ähnliche Resultate wurden auch mit den Hexapeptid-S-PCP6com-Konjugaten **10–12** (Schema 2) als Substrate erhalten. Die Hexapeptide **10** und **11** wurden zu ungefähr 45–50 % in die erwarteten monocyclischen Produkte umgewandelt. Des Weiteren wurden geringere Mengen eines epimeren monocyclischen Produkts (ca. 10 %) sowie auch nicht umgesetztes lineares Peptid isoliert (Abbildung S7 und S8). Die Anwesenheit von Chlor-Substituenten im Hexapeptid **12** führte jedoch wiederum zu einem deutlich geringeren Umsatz (etwa 25 %) in das makrocyclische Produkt **15**.

Die Bindung von den Substraten an OxyB wurde mit UV/Vis-Differenzspektroskopie bestimmt. Alle Substrate induzierten ein Typ-I-Differenzspektrum bei der Bindung an OxyB, verursacht durch die Verdrängung des axialen Wasserliganden am Eisenzentrum und Verschiebung des Gleichgewichtes des Spinzustands.<sup>[4a]</sup> Die Konzentrationsabhängigkeit der Absorptionsänderungen ( $\Delta A$ ) konnte gut mit einer Bindungsgleichung, welche eine 1:1-Wechselwirkung voraussetzt, angepasst werden (Abbildung 3 und Abbildung S12). Das Anpassen der Langmuir-Gleichung zu jedem Datensatz ergab für **7** einen  $K_d$  von  $(27 \pm 5) \mu\text{M}$ , der in einem ähnlichen Bereich liegt wie der zuvor publizierte Wert.<sup>[4a]</sup> Die Affinität von **8** zu OxyB war etwas reduziert, mit einem  $K_d$  von  $(48 \pm 6) \mu\text{M}$ . Jedoch ergab die Präsenz der beiden Chlor-Substituenten in **9** einen  $K_d$  von ungefähr  $(180 \pm 30) \mu\text{M}$ . Die Resultate zeigen, dass die Einführung von Chlor-Substituenten einen wesentlichen Einfluss auf die Verschiebung des Gleichgewichtes des Spinzustands hat und die Bindungsaffinität von den Hexapeptid-S-PCP-Substraten zu OxyB deutlich geschwächt ist. Es wird also eine gute Korrelation zwischen dem Effekt auf die Verschiebung des Gleichgewichtes des Spinzustands und der katalytischen Aktivität von OxyB beim Vergleich dieser Substrate beobachtet.

Um den Einfluss der Chlorierung des Heptapeptid-S-PCP-Substrats auf den Umsatz durch OxyB zu untersuchen, wurde das Heptapeptid-S-PCP7-Substrat **18** und das Analog **19** (Schema 2), welches (2S,3R)- $\beta$ -Hydroxy-*m*-chlortyrosin (Cht) an Position 6 enthält, synthetisiert (siehe die Hintergrundinformationen). Die PCP7-Thioester-Konjugate wurden unter den gleichen Testbedingungen mit OxyB getestet. Wie früher beschrieben,<sup>[4a]</sup> wurde das Modell-Heptapeptid **18** in den C-O-D-Makrocyclus **20** umgewandelt (ca. 60–70 %). In ähnlichen Testversuchen mit **19** hingegen,



**Abbildung 3.** UV/Vis-Differenzspektren für die Bindung der Substrate **7**, **8** und **9** an OxyB und ein Diagramm, das die Abhängigkeit der spektralen Änderungen von Peptidkonzentration  $c$  zeigt.

konnte wiederholt keine Bildung des C-O-D-Ring-Produktes beobachtet werden; stattdessen wurde nur das entsprechende lineare Peptid-Hydrazid zurückgewonnen (ca. 90 %) (Abbildung S13). Dieser drastische Effekt, welcher nach Einführung des Chlor-Substituenten in vitro beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass es sich bei einem linearen Heptapeptid-S-PCP mit einem chlorierten Rest 6 nicht um ein Intermediat in der Vancomycin-Biosynthese handelt, da es nicht als Substrat für OxyB fungiert.

Zwei Schlüsselbeobachtungen, die hier beschrieben wurden, liefern neue wichtige Erkenntnisse über die Vancomycin/Balhimycin-Biosynthese. Zunächst wurde gezeigt, dass ein chloriertes lineares Heptapeptid-S-PCP kein natürliches Intermediat der Vancomycin-Biosynthese darstellt. Diese Erkenntnis beruht auf der Annahme, dass In-vitro-Studien mit den nichtnatürlichen vereinfachten Substraten die Eigenschaften der natürlichen biosynthetischen Reaktionen widerspiegeln. Obwohl es schwer ist, dies eindeutig zu beweisen, scheint dieser Befund naheliegend, da OxyB die In-vitro-Kupplung von Hexapeptid-S-PCP Substraten sehr effizient katalysiert. Auf der anderen Seite wurden vollständig chlorierte lineare (d.h. nicht cyclisierte) Hexa- und Heptapeptide aus unterschiedlichen Null-Mutanten des Balhimycin-Produzenten isoliert.<sup>[2a,10]</sup> Es ist jedoch möglich, dass diese chlorierten linearen Peptide Nebenprodukte („shunt products“) sind, welche in geringen Mengen während langer Fermentationszeiten entstehen. Ein sehr interessantes Nebenprodukt, welches aus einer der Mutanten (*dpgA*-Mutante) isoliert wurde, war ein Heptapeptid, welches die Ringschlüsse und ein Hpg7 anstelle eines Dpg7 enthielt.<sup>[10]</sup>

Der zweite Punkt betrifft den Zeitpunkt der Chlorierungsschritte. Ungewöhnlich ist das Vorhandensein einer einzigen Halogenase, welche für die Chlorierung an zwei unterschiedlichen Positionen (2 und 6) im Molekül verantwortlich ist. Freies Cht ist keine natürliche Vorstufe und wird

nicht in der Glykopeptid-Biosynthese verwendet.<sup>[11]</sup> Demzufolge findet die Chlorierung höchstwahrscheinlich an einem NRPS-gebundenen Intermediat statt. Die Chlorierung könnte sofort nach Einbau jedes Bht-Restes an der NRPS ablaufen. Die In-vitro-Experimente, welche hier beschrieben wurden, zeigen jedoch, dass ein Chlor-Substituent an Position 6 des Hexapeptid-S-PCP die Geschwindigkeit der Kupplungsreaktion, welche durch OxyB katalysiert wird, drastisch verringert. Dies wirft die Frage auf, ob der Ringschluss durch OxyB in der Biosynthese vor der Chlorierung stattfindet. In früheren molekulargenetischen Studien konnten chlorierte Hexa- und Heptapeptide in Balhimycin-Null-Mutanten

nachgewiesen werden.<sup>[2a,10]</sup> Zudem wurden „In-frame“-Deletionen aller drei Oxygenase-Gene hergestellt, um mögliche polare Effekte auf abwärtsgelegene Gene (einschließlich des Halogenase-Gens) ausschließen zu können. Bei den *oxyA*- und *oxyC*-Mutanten wurden nur einfach oder doppelt cyclisierte, aber vollständig chlorierte Produkte gefunden, wohingegen aus der *oxyB*-Mutante ausschließlich nichtchlorierte lineare Hexapeptid- und Heptapeptid-Produkte isoliert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der Halogenase von der Anwesenheit von OxyB und der NRPS abhängig sein könnte.<sup>[12]</sup> Eine letzte interessante Beobachtung besteht darin, dass aus einer *bhp*-Deletionsmutante (Bhp wird zur Bht-Biosynthese benötigt), welche mit 3-Fluor- $\beta$ -hydroxytyrosin gefüttert wurde, ein Balhimycin-Derivat mit fluorierten Resten 2 und 6 isoliert werden konnte (Fluorbalhimycin).<sup>[13]</sup> Dies zeigt, dass OxyB zumindest langsam, eine lineare fluoridierte Peptidvorstufe in vivo umsetzen kann. Es unterstreicht weiterhin das Potenzial der Mutabiosynthese als Methode zur Erzeugung neuer Analoga von Glykopeptid-Antibiotika. Leider wurde bisher noch keine In-vitro-Aktivität mit der Halogenase berichtet, sodass ihre Substratpräferenzen noch unklar sind. Dies erschwert derzeit eine genauere Aussage über die Reihenfolge der Chlorierungs- und Kupplungsschritte zu machen. Wir nehmen jedoch vorweg, dass die hier beschriebenen Synthesemethoden In-vitro-Studien mit diesem Schlüsselenzym erleichtern werden.

Eingegangen am 8. Juni 2012,  
veränderte Fassung am 1. August 2012  
Online veröffentlicht am 16. Oktober 2012

**Stichwörter:** Cytochrom P450 · Glykopeptid-Antibiotikum · Halogenase · Phenol-Kupplung · Vancomycin



- [1] a) B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752–789; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730–765; b) E. Stegmann, H.-J. Fräsch, W. Wohlleben, *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 595–602; c) P. F. Widboom, S. D. Bruner, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1757–1764.
- [2] a) R. D. Süssmuth, S. Pelzer, G. Nicholson, T. Walk, W. Wohlleben, G. Jung, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2096–2099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1976–1979; b) D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G. J. Nicholson, S. Stockert, M. Schirle, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4824–4827; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4688–4691; c) D. Bischoff, S. Pelzer, A. Holtzel, G. J. Nicholson, S. Stockert, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1736–1739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1693–1696.
- [3] O. Puk, P. Huber, D. Bischoff, J. Recktenwald, G. Jung, R. D. Süssmuth, K.-H. van Pée, W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 225–235.
- [4] a) K. Woithe, N. Geib, K. Zerbe, D. B. Li, M. Heck, S. Fournier-Rousset, O. Meyer, F. Vitali, N. Matoba, K. Abou-Hadeed, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887–6895; b) K. Zerbe, K. Woithe, D. B. Li, F. Vitali, L. Bigler, J. A. Robinson, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6877–6881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6709–6713.
- [5] a) D. P. O'Brien, P. N. Kirkpatrick, S. W. O'Brien, T. Staroske, T. I. Richardson, D. A. Evans, A. Hopkinson, J. B. Spencer, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **2000**, 103–104; b) R. Shi, S. S. Lamb, B. Zakeri, A. Proteau, Q. Z. Cui, T. Sulea, A. Matte, G. D. Wright, M. Cygler, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 401–410.
- [6] D. B. Li, J. A. Robinson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1233–1239.
- [7] F. Vitali, K. Zerbe, J. A. Robinson, *Chem. Commun.* **2003**, 2718–2719.
- [8] a) M. Hahn, T. Stachelhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15585–15590; b) M. Hahn, T. Stachelhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 275–280; c) C. D. Richter, D. Nietlispach, R. W. Broadhurst, K. J. Weissman, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 75–81; d) K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 485–494.
- [9] N. Geib, K. Woithe, K. Zerbe, D. B. Li, J. A. Robinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3081–3084.
- [10] D. Bischoff, B. Bister, M. Bertazzo, V. Pfeifer, E. Stegmann, G. J. Nicholson, S. Keller, S. Pelzer, W. Wohlleben, R. D. Süssmuth, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 267–272.
- [11] O. Puk, D. Bischoff, C. Kittel, S. Pelzer, S. Weist, E. Stegmann, R. D. Süssmuth, W. Wohlleben, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6093–6100.
- [12] E. Stegmann, S. Pelzer, D. Bischoff, O. Puk, S. Stockert, D. Butz, K. Zerbe, J. A. Robinson, R. D. Süssmuth, W. Wohlleben, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 640–653.
- [13] S. Weist, B. Bister, O. Puk, D. Bischoff, S. Pelzer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3531–3534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3383–3385.