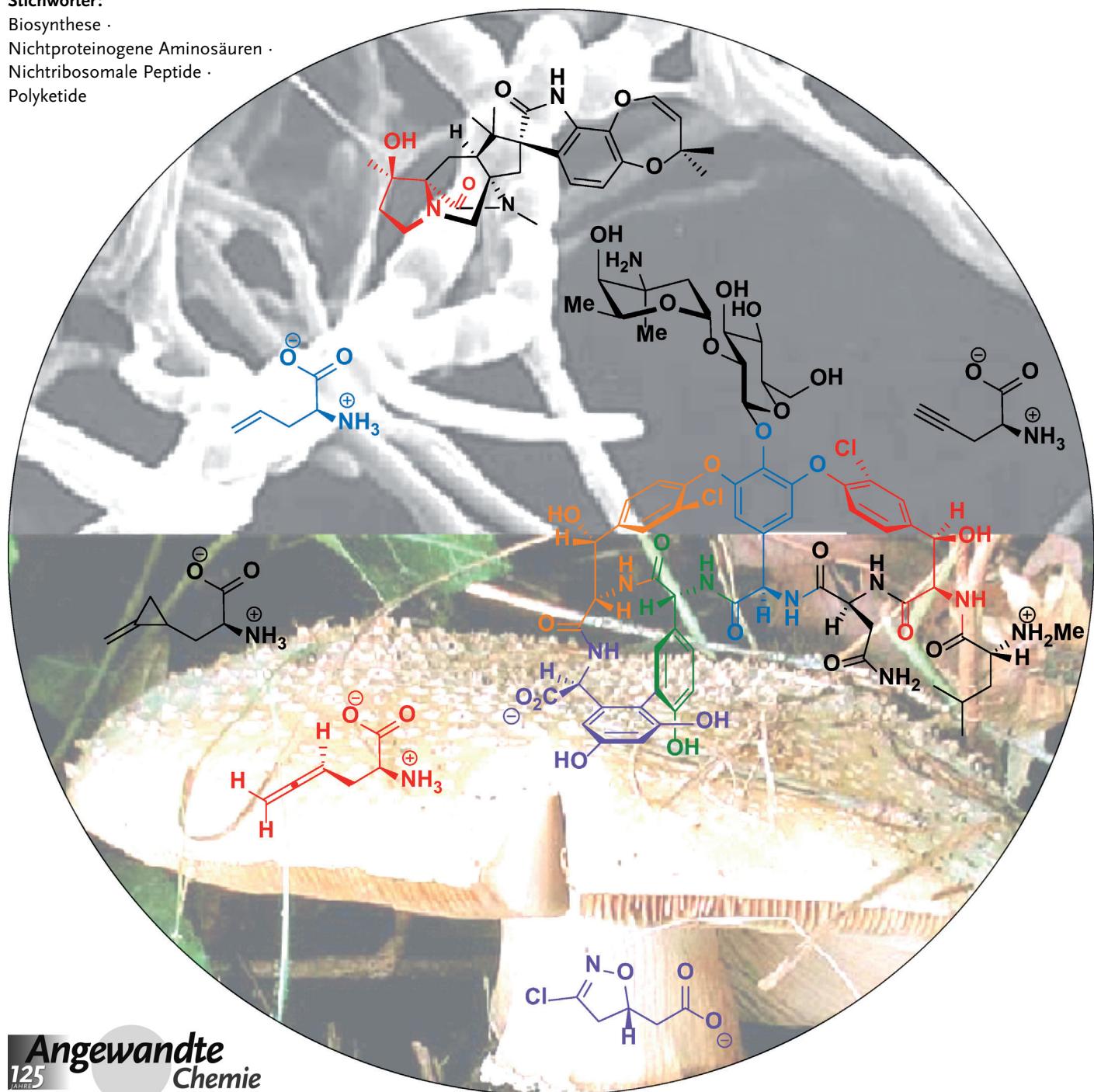


# Nichtproteinogene Aminosäurebausteine für Peptidgerüste aus nichtribosomalen Peptiden und hybridren Polyketiden

Christopher T. Walsh, Robert V. O'Brien und Chaitan Khosla\*

Stichwörter:

Biosynthese ·  
Nichtproteinogene Aminosäuren ·  
Nichtribosomal Peptide ·  
Polyketide



**F**rei vorkommende nichtproteinogene Aminosäuren sind schon lange wegen ihrer antimetabolen Eigenschaften bekannt. Entdeckt werden sie meist aufgrund der Reaktivität gegenüber der katalytischen Wirkung der Zielenzyme. Führt man sie regiospezifisch in biogene Peptide und Proteine ein, kann es möglich werden, eine neue Ära der Medizinalchemie an der Grenze zwischen kleinen und großen Wirkstoffen einzuleiten. Außerdem eröffnet die ortsspezifische Funktionalisierung von Proteinen besonders attraktive Strategien für die posttranslationalen Proteinmodifizierung. Auch bieten viele der Aminosäuren, die von der Natur nicht für den Einbau in Proteine ausgewählt wurden, reiche architektonische Möglichkeiten bei Einführung in ribosomal hergestellte Polypeptide. Dieser Aufsatz fasst die Biosynthesewege zu den wichtigsten Klassen nichtkanonischer Bausteine und deren Stoffwechsellogik zusammen, die in nichtribosomalen Peptidgerüsten und nichtribosomalen Peptid-Polyketid-Hybridren resultieren.

## 1. Einleitung

Mikroorganismen haben die bemerkenswerte Fähigkeit, Aminosäuregerüste aufzubauen, die nicht in Proteine eingebaut werden. Bis heute wurden schätzungsweise 500 natürlich vorkommende Aminosäuren identifiziert, unter denen die 20 proteinogenen Aminosäuren nur eine Minderheit von 4 % darstellen. Viele dieser nichtproteinogenen Aminosäuren wurden entdeckt und in einen biologischen Zusammenhang gestellt, seit dieses Thema zuletzt in dieser Zeitschrift im Jahr 1983 aufbereitet wurde.<sup>[1]</sup> Während einige der nichtproteinogenen Aminosäuren als Zwischenprodukte in primären Stoffwechselwegen vorkommen (z.B. Homoserin, Ornithin), dienen die meisten der wenig erwähnten 96 %igen Mehrheit als Bausteine für kleine bioaktive Peptidgerüste. Sie könnten auch ein bislang zu wenig genutztes Reservoir von Bausteinen für Proteinengineering, Medizinalchemiker und Materialwissenschaftler darstellen.

Zum einen bedeutet das Vorkommen vieler Hunderter natürlicher Peptide mit einer oder mehreren nichtproteinogenen Aminosäuren, dass diese speziellen Monomere bestimmte nützliche Eigenschaften bewirken können, die durch die 20 proteinogenen Bausteinen nicht verfügbar sind. Zum anderen bedeutet die Existenz dieser natürlichen Peptidgerüste, dass eine biologische Maschinerie für die Selektion, die Aktivierung und den Einbau nichtproteinogener Aminosäuremonomere in nichtribosomale Peptide (NRPs) und zur Kettenverlängerung der entstehenden Zwischenprodukte vorhanden sein muss.<sup>[2,3]</sup> Vielleicht könnten viele dieser Maschinerien verpflanzt, evolviert oder umgebildet werden, um als Bausteine für die ribosomale Proteinbiosynthese eingesetzt zu werden. Die Entwicklung von Paaren evolvieter tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für die Erkennung synthetischer nichtnatürlicher Aminosäuren, ihr Transfer in wachsende Zellen und die Fähigkeit der entstehenden Zellen, effizient Proteine mit den entsprechenden nichtnatürlichen Aminosäuren zu synthetisieren, sind gute Voraussetzungen, um diese endogen gebildeten nichtproteinogenen Aminosäuren im Proteinengineering nutzbar machen zu können.<sup>[4,5]</sup>

## Aus dem Inhalt

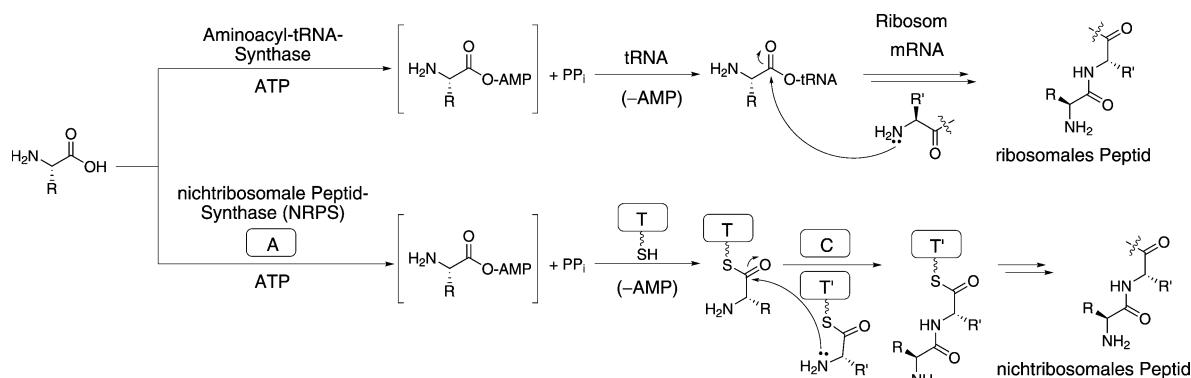
<b>1. Einleitung</b>	7239
<b>2. Selektion, Aktivierung und Einbau von Aminosäuren durch ribosomale und nichtribosomale Peptidbiosynthese</b>	7240
<b>3. Biosynthese nichtproteinogener Aminosäuren</b>	7243
<b>4. Nichtproteinogene Aminosäuren in NRP-Gerüsten</b>	7244
<b>5. Synthese nichtproteinogener Aminosäurebausteine</b>	7249
<b>6. Aminosäuren, die von enzymatischen Synthesestrecken hergestellt werden</b>	7255
<b>7. HomoTyr und andere homologe Aminosäuren</b>	7257
<b>8. Aminosäuren mit potenziell reaktiven funktionellen Gruppen</b>	7258
<b>9. Herausforderungen und Möglichkeiten für den Einsatz nichtproteinogener Aminosäuren als Proteinbausteine</b>	7261

Dazu müssen allerdings die Stoffwechselwege zu diesen nichtkanonischen Bausteinen und die Art der beteiligten enzymatischen Transformationen bekannt sein.

Dieser Aufsatz fasst die Biosynthesewege zu den wichtigsten Klassen nichtkanonischer Bausteine und deren Stoff-

[\*] Prof. C. T. Walsh  
 Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,  
 Harvard Medical School  
 Boston, MA 02115 (USA)  
 Dr. R. V. O'Brien, Prof. C. Khosla  
 Department of Chemistry, Stanford University  
 Stanford, CA 94305-5025 (USA)  
 E-Mail: khosla@stanford.edu  
 Prof. C. Khosla  
 Chemical Engineering, Stanford University  
 Stanford, CA 94305-5025 (USA)  
 Prof. C. Khosla  
 Biochemistry, Stanford University  
 Stanford, CA 94305-5025 (USA)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201208344> zu finden.



**Schema 1.** Vergleich der Biosynthesen ribosomaler und nichtribosomaler Peptide. ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat, A-Domäne = Adenylierungsdomäne, T-Domäne = Thioesterdomäne (Peptidylcarrierprotein-Domäne), C-Domäne = Kondensationsdomäne.

wechsellogik zusammen, die in nichtribosomalen Peptidgerästen und nichtribosomalen Peptid-Polyketid-Hybridien resultieren.

Neben den aus 2 bis 22 Aminosäuren bestehenden mikrobiellen Peptiden, die nichtribosomal und daher unabhängig von mRNA-Molekülen gebildet werden, gibt es Hunderte natürlich vorkommender Verbindungen, die Hybride aus Peptid- und Polyketid(PK)-Gerüsten sind<sup>[6]</sup> und von denen viele nichtproteinogene Aminosäuremonomere enthalten. Rapamycine, die Verbindungen der FK506-Familie,<sup>[7,8]</sup> Sanglifehrin<sup>[9]</sup> und die Epothilone sind Beispiele für therapeutisch interessante Gruppen solcher molekularer NRP-PK-Hybride mit nichtproteinogenen Aminosäureeinheiten.<sup>[10,11]</sup>

## 2. Selektion, Aktivierung und Einbau von Aminosäuren durch ribosomale und nichtribosomale Peptidbiosynthese

Für NRP- und hybride NRP-PK-Gerüste werden die Aminosäuremonomere, gleich ob proteinogen oder nichtproteinogen, von 50-kDa-Proteinen selektiert und aktiviert. Diese Proteine kommen manchmal isoliert vor, meistens sind sie allerdings Komponenten von Proteinen aus vielen Domänen. Die Aktivierungsdomänen werden wegen der chemischen Reaktionen, die sie an ihren Aminosäuresubstraten katalysieren, als Adenylierungs(A)-Domänen bezeichnet.<sup>[2]</sup> Jede A-Domäne ist für eine Aminosäure spezifisch. Ist die

Aminosäure im aktiven Zentrum gebunden, greift das Enzym über die Carboxylgruppe der Aminosäure das  $\alpha$ -Phosphat des ebenfalls gebundenen ATP-Cosubstrats an, wodurch ein gebundenes Aminoacyl-Adenylat (Aminoacyl-AMP) entsteht (Schema 1). Nach dem genau gleichen Mechanismus werden auch im ersten Schritt der Proteinsynthese die Aminosäuren von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aktiviert: Sie gehören ebenfalls zu den Aminosäure-adenylierenden Enzymen.<sup>[12]</sup> Strukturanalysen lassen dennoch vermuten, dass, von wenigen Ausnahmen abgesehen,<sup>[13]</sup> A-Domänen und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unabhängig voneinander evolvierten. Daher lassen sie sich auch nicht einfach gegeneinander austauschen, beispielsweise bei Austauschversuchen in der Proteinbiosynthese.

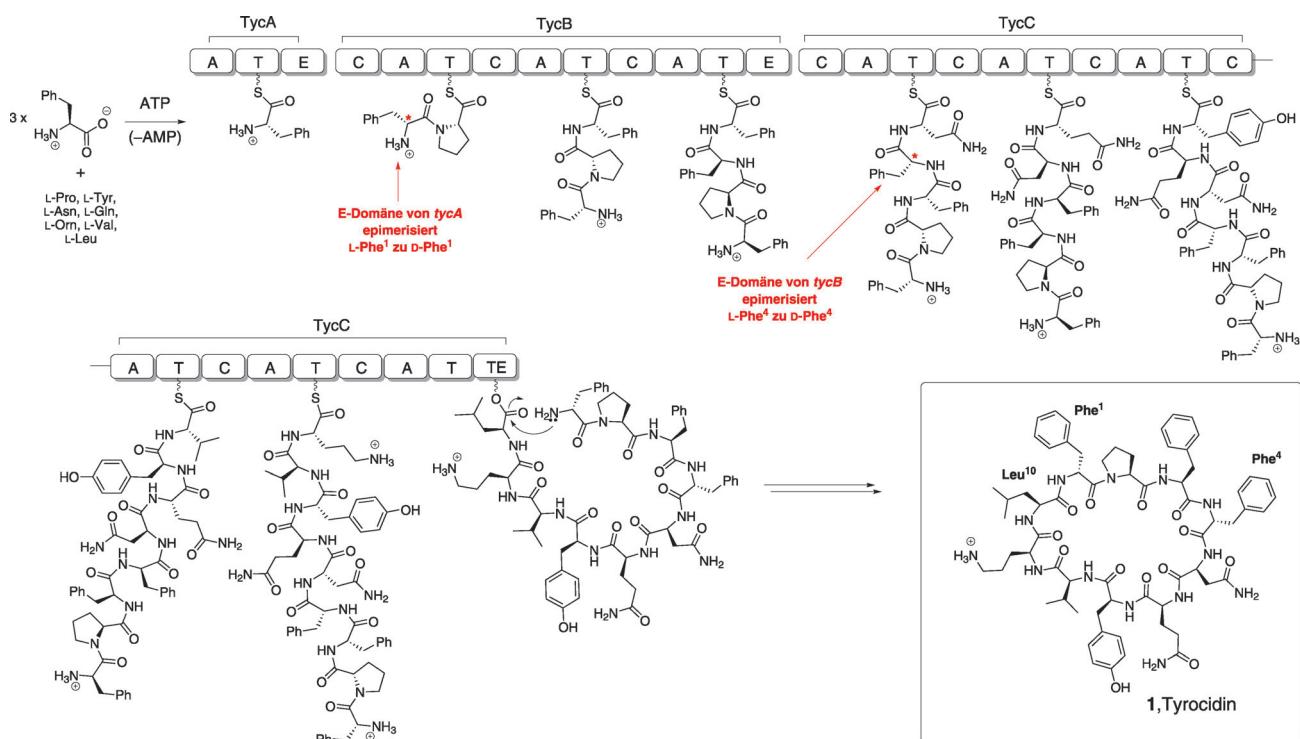
Im zweiten Schritt divergieren die beiden Enzymklassen mit Blick auf das Cosubstrat, auf das die aktivierte Aminoacylgruppe anschließend übertragen wird (Schema 1). Für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist das Cosubstrat eine kognate tRNA, und die angreifende nucleophile Gruppe ist das 3'- oder 2'-OH des Riboseringes des terminalen Adenins am CAA-Ende jeder tRNA.<sup>[14]</sup> Die so gebildete Aminoacyl-tRNA wird freigesetzt und dann für die mRNA-gesteuerte Proteinbiosynthese auf die große Untereinheit des Ribosoms gelenkt.<sup>[14]</sup> In NRPS-Adenylierungsdomänen dagegen ist das Cosubstrat im zweiten Schritt der HS-Panteteinylarm der Holoform einer 8–10 kDa großen Thiol(T)-Domäne.<sup>[15]</sup> Die T-Domänen befinden sich oft in cis-Position zu den A-Domänen in Form einer stromabwärts liegenden Region von 80–



Christopher T. Walsh, geboren 1944, studierte Biologie in Harvard und promovierte in Biochemie bei Fritz Lipman an der Rockefeller University. Von 1972 bis 1987 arbeitete er am MIT, seither ist er Professor an der Harvard Medical School. Er war Dekan des Department of Chemistry am MIT (1982–1987) und des Department of Biological Chemistry & Molecular Pharmacology der Harvard Medical School (1987–1995). Seine Forschungen gelten der molekularen Logik und dem Enzymapparat der Biosynthese peptidbasierter Naturstoffe.



Robert V. O'Brien, geboren 1981, studierte am St. John's College in Annapolis und an der Seattle University. Er promovierte bei Prof. Amir H. Hoveyda über Ru- und Mo-katalysierte Olefinsmetathese und Z-selektive Kreuzmetathese zur Synthese des Tumorerzeptor-KR7000. Seine aktuellen Forschungen an der Stanford University gelten der Biosynthese von Erythromycin-Analoga und deren chemischer Modifizierung.



**Schema 2.** Tyrocidin und seine NRPS. A=Adenylierungsdomäne, T=Thioesterdomäne (Peptidylcarrierprotein-Domäne), C=Kondensationsdomäne, E=Epimerasedomäne, TE=Thioesterasedomäne.

100 Aminosäuren, die auf die ca. 500 Aminosäuren lange A-Domäne folgt (A-T-Didomänen als einzelne Einheiten oder als Teil größerer Proteine). Die Übertragung auf das nucleophile Thiolat des Pantetheinylarms ergibt Aminoacyl-Thioester, die mit einer T-Domäne verbunden sind.<sup>[16]</sup>

Auch bei den Kettenverlängerungen am Ribosom und bei nichtribosomaler Peptidsynthese finden sich Parallelen und Unterschiede (Schema 1). Am Ribosom bindet die neu eintretende Aminoacyl-tRNA neben der wachsenden Peptidyl-tRNA, wobei das neue Monomer durch die Triplet-Codierung des mRNA-Codons in Zusammenwirken mit dem tRNA-Anticodon festgelegt wird. Ist die richtige Aminoacyl-tRNA erkannt und korrekt durch die Wirkung konditionierender GTPasen positioniert, kann die Peptidbindung im Peptidyltransferase-Zentrum der ribosomalen 50S-Untereinheit unter Vermittlung der 23S-rRNA geknüpft werden. Das Elektrophil ist der aktivierte Carboxylsauerstoff-Ester der Aminoacyl-tRNA. Die Knüpfung der Peptidbindung erzeugt

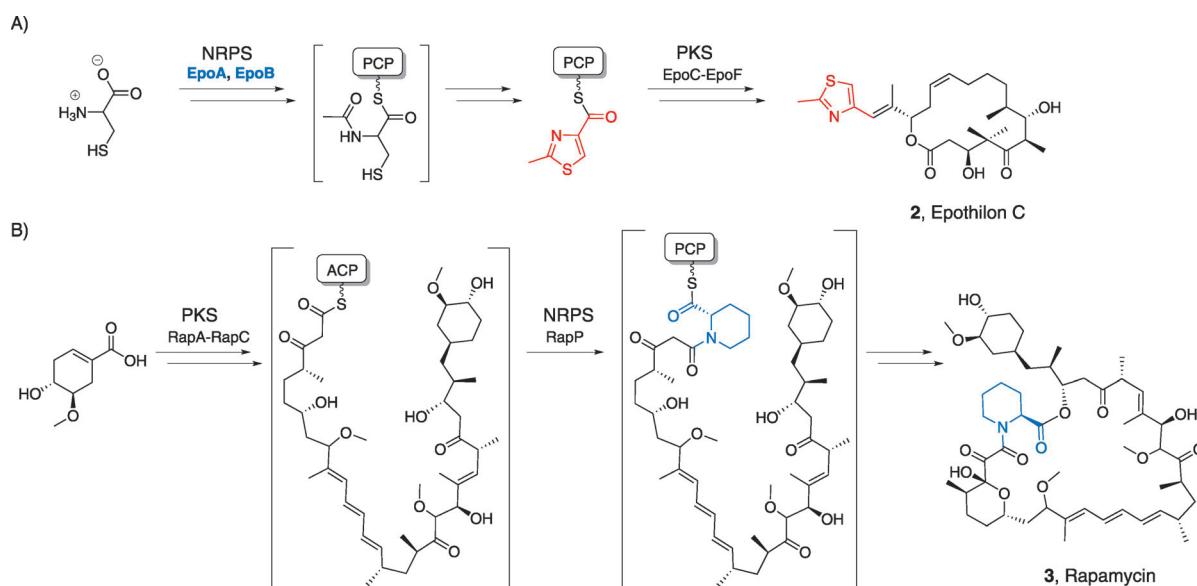
eine verlängerte Peptidyl-tRNA und als Coprodukt die deacylierte tRNA, die die neu eingetretene Aminosäure mitgebracht hat. Bei der mRNA-unabhängigen NRPS wird die Bildung der Peptidbindung durch eine ca. 50 kDa große Kondensations(C)-Domäne vorangetrieben. Auch diese Domäne ist meist in cis-Position codiert, sodass ein typisches NRPS-Elongationsmodul von etwa 110 kDa die Zusammensetzung C-A-T hat und aus drei (semi-)autonom gefalteten Domänen besteht.<sup>[2,17]</sup> Die Spezifität des Monomereinbaus in die wachsende Peptidkette kommt nicht durch den mRNA-Triplettcode zustande, sondern dadurch, welche NRPS-Module nacheinander miteinander wechselwirken.

Eine typische NRPS ist in Schema 2 für die Biosynthese von Tyrocidin (**1**) gezeigt.<sup>[18]</sup> Wie man sieht, sind oft 3–5 Module in einem einzelnen Protein codiert, und die Kettenverlängerung schreitet in N-C-Richtung fort.

Für hybride NRP-PK-Naturstoffe haben sich spezielle NRPS-Module als Schnittstelle zu den Polyketidsynthase-Aufbauwegen herausgebildet.<sup>[17,19]</sup> Dabei kommen beide möglichen Orientierungen der NRP- und PKS-Module in natürlich vorkommenden Synthesestrecken vor. Wenn das NRPS-Modul stromaufwärts eines PKS-Moduls liegt, wie dies bei der Synthese von Epothilon C (**2**, Schema 3 A) der Fall ist, muss die Aminoacyl-S-T-Domäne von der ersten Domäne des stromabwärts liegenden PKS-Moduls erkannt und auf diese übertragen werden.<sup>[20]</sup> Meist sind es die Ketsynthase(KS)-Domänen, die durch decarboxylierende Claisen-Kondensationen die C-C-Bindungen knüpfen. In der anderen Konfiguration mit dem NRPS-Modul stromabwärts eines PKS-Moduls (Beispiele sind die Synthesen von FK506 und Rapamycin (**3**), Schema 3 B) muss die C-Domäne des



Chaitan Khosla, geboren 1964, promovierte 1990 am Caltech. Nach einem Postdoktorat am John Innes Centre (Großbritannien) wechselte er 1992 zur Stanford University, wo er Professor an den Departments of Chemistry und Chemical Engineering ist und das Chemical Biology Institute leitet. Seine Forschungen gelten der Aufklärung und Abwandlung der Polyketid-Biosynthese sowie posttranslationalen Proteinmodifikationen.



**Schema 3.** Biosynthese von Epothilon C und Rapamycin. A) NRPS-PKS-Syntheseweg. Nichtproteinogene Aminosäuren: **2-Methylthiazol-4-carboxylat**, **L-Pipecolat**. Siehe Hyperlinks: EpoA: AAF62880.1; EpoB: AAF62881.1; sowie Hintergrundinformationen, Schema S1.

NRPS-Moduls die unmittelbar stromaufwärts liegende Polyketidyl-S-T-Domäne erkennen können.<sup>[21]</sup> Nun ist das angreifende Nucleophil die Aminogruppe der Aminoacyl-S-T-Domäne im NRPS-Modul. Bei der Bindungsknüpfung entsteht ein Amid, wenn die Polyketidylkette auf das NRPS-Modul übertragen wird.<sup>[20,22]</sup>

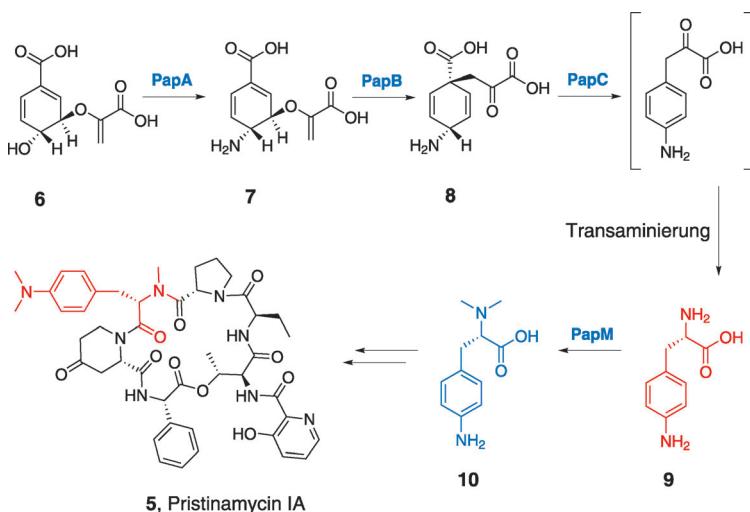
Es gibt Beispiele für hybride Synthesestrecken, in denen die NRPS-Domänen auf beiden Seiten von PKS-Domänen flankiert werden (z. B. bei Epothilon)<sup>[20]</sup> und umgekehrt (z. B. Bleomycin,<sup>[23]</sup> Yersiniabactin).<sup>[24]</sup> Eine der Stärken hybrider Synthesestrecken ist, dass sie komplexe Gerüststrukturen aufbauen können und dabei verschiedenste Sauerstoff- und Stickstoff-Funktionalitäten in das Gerüst der Naturstoffe einbringen können. Fortschritte bei der Strukturaufklärung von Domänen und ganzen Modulen der PKS- und NRPS-Synthesewege eröffnen erste Einsichten, die künstliche neue PKS-NRPS-Kombinationen und veränderte Spezifitäten bei der Auswahl der Bausteine ermöglichen werden.<sup>[25,26]</sup>

### 2.1. Biosynthese von para-Amino-Phe in *Streptomyces pristinaespiralis*

Das nichtkanonische *para*-Dimethylaminophenylalanin kommt in Pristinamycin IA vor, einem Antibiotikum aus *S. pristinaespiralis*.<sup>[27]</sup> Der Baustein entsteht aus *p*-NH<sub>2</sub>-Phe (durch zweifache Methylierung mit S-Adenosylmethionin), das auch von *Streptomyces venezuelae* in Chloramphenicol eingebaut wird.<sup>[28]</sup> Phe ist allerdings nicht die direkte Ausgangsverbindung für *p*-NH<sub>2</sub>-Phe. Vielmehr entsteht es durch eine Umleitung des Stoffwechselweges von Chorismsäure weg vom eigentlichen Endprodukt Prephensäure (Schema 4). Entsprechend den Prinzipien der NRPS-Logik

findet man im Genom von *S. pristinaespiralis* vier *pap*-Gene im Tandem neben den NRPS- und PKS-Genen, die Pristinamycin IA aufbauen (**5**, Schema 4).<sup>[29,30]</sup>

PapA ist eine glutaminabhängige Chorismat-Amidotransferase, die Chorismsäure (**6**, Schema 4) in 4-Amino-4-desoxychorismsäure (**7**, Schema 4), das Schlüsselprodukt der *p*-Aminobenzoesäure(PABA)-Biosynthese umwandelt.<sup>[31]</sup> In diesem Fall greift allerdings PapB ein, und die Enolpyruvyl-Seitenkette wird nicht eliminiert. Stattdessen wird durch PapB, eine Aminodesoxychorismat-Mutase, 4-Amino-4-desoxyprehensäure (**8**, Schema 4) gebildet, vermutlich durch eine elektrocyclische 3,3-Umlagerung. Diese wird durch PapC unter Aromatisierung zu 4-Aminophenyl-

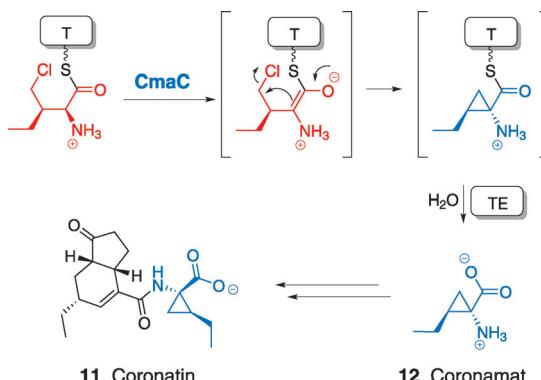


**Schema 4.** *p*-Aminophenylalanin-Biosynthese als Teil des Aufbaus von Pristinamycin IA. Nichtproteinogene Aminosäuren: **L-(*p*-Amino)-Phe** (**9**) und **L-(*p*(*N,N*-Dimethylamino))-Phe** (**10**). Siehe Hyperlinks: PapA: AAC44866.1; PapB: AAC44868.1; PapC: AAC44867.1; PapM: AAC44869.1.

pyruvat decarboxyliert und dehydriert, welches dann zu 4-Amino-L-Phe (**9**) transaminiert wird. PapM kann die Aminogruppe ein- oder zweimal zum Mono- oder Dimethylamino-L-Phe-Monomer (**10**) methylieren; beide Verbindungen können in Pristinamycine eingebaut werden.

## 2.2. Einbau nichtproteinogener Aminosäuren in Proteine

Schultz und Mitarbeiter klonierten das *papABC*-Cluster aus *S. venezuelae* in einen *Escherichia coli*-Stamm, in den sie ein angepasstes tRNA/tRNA-Synthasepaar eingebracht hatten, das *p*-NH<sub>2</sub>-Phe erkennt und über das Amber-Suppressor-Codon ortsspezifisch in Myoglobin einbaut.<sup>[32]</sup> Im Prinzip lässt sich die Strategie für den Einbau von *p*-NH<sub>2</sub>-Phe für alle anderen in diesem Aufsatz beschriebenen nichtproteinogenen Aminosäurebausteine verallgemeinern, solange die Gene bekannt sind und die Proteine in aktiver Form in einem bakteriellen Wirt (z.B. *E. coli*) exprimiert werden, der gleichzeitig ein verändertes tRNA/tRNA-Synthasepaar enthält, das die entsprechende Verbindung erkennt.<sup>[33]</sup> In der Praxis werden, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben wird, viele nichtproteinogene Aminosäuren für NRP- oder gemischte PK/NRP-Biosynthesen als Aminoacyl-Thioester, gebunden an einen proteingebundenen Panthetheinarm gebildet. Nach der Synthese werden diese Bausteine unmittelbar von der NRPS umgesetzt. Will man sich diese nichtnatürlichen Aminosäuren für die ribosomale Proteinsynthese zunutze machen, benötigt man eine entsprechend angepasste Thioesterase. Zum Glück findet man in der Natur zahlreiche solcher Aminoacyl-Thioesterasen: So wird die nichtproteinogene Aminosäure Coronaminsäure als proteingebundener Thioester gebildet, der vor dem Einbau in den Naturstoff Coronatin (**11**, Schema 5) hydrolysiert wird.<sup>[34]</sup>



**Schema 5.** Coronamat-Biosynthese als Teil des Coronatin-Aufbaus. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2R)-2-Amino-3-(chloromethyl)pentansäure, Coronamat (12).** Siehe Hyperlink: CmaC: NP 794455.1.

## 3. Biosynthese nichtproteinogener Aminosäuren

### 3.1. ORFs in NRPS-Clustern

In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf ungewöhnliche, nichtproteinogene Aminosäurebausteine, die von mikrobiellen Produzenten zum Einbau in die genannten Verbindungsklassen gebildet werden. Einige dieser nichtproteinogenen Aminosäuren stammen von den kanonischen 20 proteinogenen Aminosäuren ab, während andere de novo biosynthetisiert werden.

Für alle nichtproteinogenen Aminosäuren mit bekanntem Biosyntheseweg ist in den Schemalegenden ein Hyperlink angegeben, der zum dazugehörigen GenBank-Eintrag führt. Bei unbekannter Biosynthese wird auf die Hintergrundinformationen verwiesen, die hypothetische Stoffwechselwege aufführen.

In den meisten Fällen liegen die Gene für diese speziellen Aminosäurebausteine benachbart zu den Genen für die Module der NRP-Synthesestrecke, wodurch die koordinierte Regulation beider Synthesen gewährleistet wird. Dadurch lassen sich auch leichter offene Leserahmen (ORFs) finden, die die Syntheseenzyme für die nichtproteinogenen Aminosäuren codieren, um sie in Produktionsorganismen zu übertragen. So sind, wie bereits oben beschrieben, die Gene für *p*-Dimethylaminophenylalanin im Produzenten von Pristinamycin IA geclustert (Schema 4).<sup>[29]</sup>

### 3.2. Die wichtigsten Reaktionsklassen für den Aufbau nichtproteinogener Aminosäuren

Die meisten der fast 500 nichtproteinogenen Aminosäuren werden mit wenigen enzymatischen Reaktionen hergestellt, entweder aus bereits existierenden proteinogenen Aminosäuren oder durch De-novo-Synthese. Zu den im folgenden diskutierten Beispielen gehören: 1) Racematen, die D-Aminosäuren aus ihren L-Enantiomeren bilden;<sup>[35,36]</sup> 2) Mutasen, die α-Aminosäuren in β-Aminosäuren umwandeln;<sup>[37,38]</sup> 3) Reaktionen, die β-Methyl-substituierte Aminosäuren bilden und Hydroxylasen, die OH-Gruppen einführen, oft auch als β-OH-Substituenten;<sup>[39,40]</sup> 4) sauerstoffabhängige Halogenasen, die Chlorsubstituenten an aktivierten und nichtaktivierten Kohlenstoffzentren einführen;<sup>[41]</sup> 5) De-novo-Aufbau von Phenylglycinen mit 4-OH- und 3,5-(OH)<sub>2</sub>-Substitutionsmuster, die aber je nach einer völlig unterschiedlichen molekularen Logik entstehen;<sup>[42,43]</sup> 6) Biosynthese von α,ω-Diaminosäuren wie 2,3-Diaminopropionsäure (DAP) und 2,4-Diaminobuttersäure (DAB);<sup>[44–46]</sup> 7) mehrere unterschiedliche Arten cyclischer, nichtproteinogener Aminosäuren werden ebenfalls diskutiert, von den dreigliedrigen Cyclopropanen (z.B. Coronamat (**12**), Schema 5), über das viergliedrige Tabtoxin-β-lactam<sup>[47]</sup> bis hin zum fünfgliedrigen Enduracididin,<sup>[48]</sup> und zu den sechsgliedrigen Capreomycin-,<sup>[49]</sup> Pipecolat- und Piperazatringen; 8) die Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenin<sup>[50]</sup> und von Tyrosin zu Propyl- und Propenylprolinen wird analysiert.<sup>[51]</sup>

Einige der Kohlenstoffgerüste nichtkanonischer Aminosäuren wie 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-6-octensäure, 2-

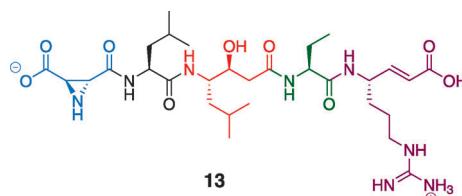
Amino-8-oxo-9,10-decansäure und 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure werden von der PKS als freie Monomere erzeugt, die in einem letzten Schritt enzymatisch reduktiv aminiert werden.<sup>[52]</sup> Andere Aminosäuren wie Statin und Isostatin werden über hybride NRPS-PKS-Synthesestrecken hergestellt und sofort in die wachsende Kette eingebaut.<sup>[53]</sup> Eine in Logik und enzymatischer Maschinerie vergleichbare Synthese läuft auch beim Aufbau von Vinyl-Arg- und Vinyl-Tyr-Einheiten ab.<sup>[54]</sup>

Der besondere molekulare Hintergrund für die wichtigsten nichtproteinogenen Aminosäureklassen wird im nächsten Abschnitt an 15 NRP-Gerüsten und weiteren 4 hybriden NRP-PK-Gerüsten diskutiert. Zusammengenommen enthalten diese 19 Synthesewege etwa 50 der verbreitetsten nichtproteinogenen Bausteine, die für fast alle wichtigen Aminosäureklassen repräsentativ sind. Im Anschluss stellen wir im Detail dar, wie diese und verwandte nichtproteinogene Aminosäurebausteine in den produzierenden Mikroorganismen entstehen.

#### 4. Nichtproteinogene Aminosäuren in NRP-Gerüsten

##### 4.1. Lineare Peptide

Nichtproteinogene Bausteine finden sich in linearen NRP-Gerüsten wie dem schwamm-assoziierten Miraziridin A (**13**, Abbildung 1), das wahrscheinlich von den vergesell-



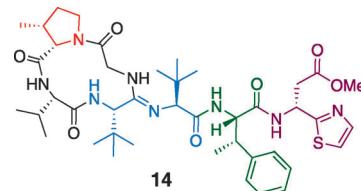
**Abbildung 1.** Miraziridin A. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(3S,4S)-Statin, (2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylat, L- $\alpha$ -Aminobutyrat, (S)-Vinyl-Arg.** Siehe Hintergrundinformationen, Schemes S2–S5.

schafteten Bakterien produziert wird.<sup>[55]</sup> In diesem linearen Pentapeptid sind vier der fünf Aminosäuren nichtproteinogen. Neben Aminobuttersäure (Aba),<sup>[56]</sup> dem nächstlängeren Homologen von Ala, kommen drei bemerkenswerte Bausteine vor: ein Aziridindicarboxylat (Azd),<sup>[57]</sup> Statin<sup>[52]</sup> und Vinyl-Arg.<sup>[54]</sup> Der dreigliedrige Aziridinring hat ungewöhnliche biologische Eigenschaften und stellt wahrscheinlich eine reaktive chemische Funktionalität dar.<sup>[58,59]</sup> Statin und Vinyl-Arg werden auf hybriden NRPS-PKS-Synthesestrecken gebildet (siehe Abschnitt 6.1).

##### 4.2. Cyclische Peptide

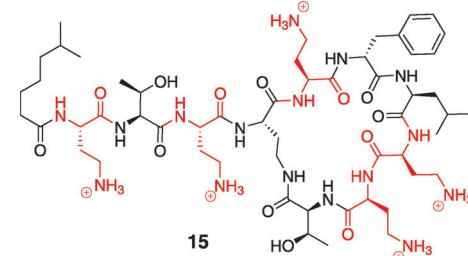
An cyclischen Peptidgerüsten besteht ein besonderes Interesse, weil die Konformationseinschränkungen fixierte dreidimensionale molekulare Architekturen erzeugen, die als

hochaffine Liganden für biologische Zielstrukturen dienen können.<sup>[60]</sup> Wir stellen hier fünfzehn cyclische Peptide mit 3–15 Aminosäureresten im makrocyclischen Gerüst vor. Der Ringschluss bei solchen cyclischen Peptiden kann durch die Bildung von Makrolactamen (cyclischen Amiden), Makrolactonen (cyclischen Estern), cyclischen Amidinen (wie im Fall des Bottromycin A<sub>2</sub> (**14**), Abbildung 2),<sup>[61]</sup> oder durch Bildung einer Aryletherbrücke erfolgen. In Schema 2 sieht

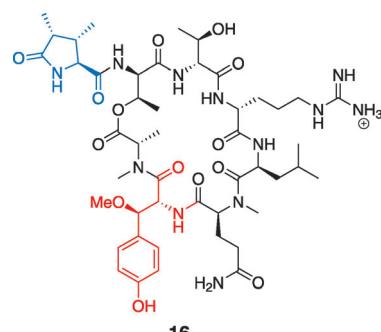


**Abbildung 2.** Bottromycin A<sub>2</sub>. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2S,3R)-3-Methyl-Pro, L-tert-Butyl-Gly, (2S,3S)- $\beta$ -Methyl-Phe, (R)-Methyl-3-amino-3-(thiazol-2-yl)propanoat.**

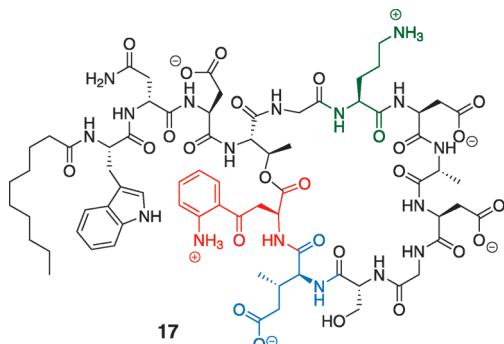
man, wie das decapeptidische Makrolactam von Tyrocidin (**1**) durch eine Kopf-Schwanz-Kondensation von Phe1 und Leu10 entsteht,<sup>[62]</sup> während die Polymyxin-Nonapeptide (wie Polymyxin B2 (**15**), Abbildung 3) Stamm-Schlaufen-Makrolactamstrukturen bilden, in denen das Amin aus der Seitenkette von 2,4-DAB als Nucleophil reagiert.<sup>[46,63]</sup> Makrolacton-Bindungen (auch Depsipeptide genannt) können über die Hydroxygruppe der Thr-Seitenkette geknüpft werden, wie in Callipeltin B (**16**, Abbildung 4)<sup>[64,65]</sup> und Daptomycin (**17**,



**Abbildung 3.** Polymyxin B<sub>2</sub>, ein Stamm-Schlaufen-Makrolactam. Nichtproteinogene Aminosäure: **L-2,4-Diaminobutyrat (2,4-DAB)**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S6.



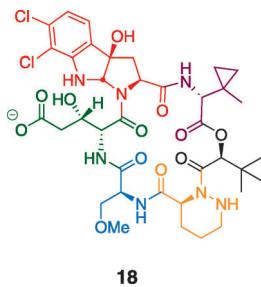
**Abbildung 4.** Callipeltin B, ein mit Thr verbundenes Depsipeptid. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2R,3R)- $\beta$ -Methoxy-Tyr, (2S,3S,4R)-3,4-Dimethyl-5-oxo-Pro**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S7.



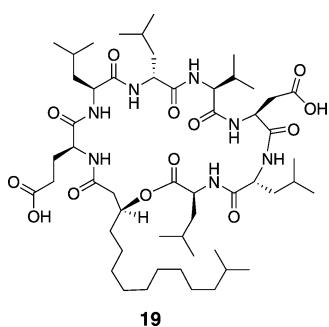
**Abbildung 5.** Daptomycin. Nichtproteinogene Aminosäuren: **L-Kynurenin**, **(3S,4S)- $\beta$ -Methylglutamat**, **L-Ornithin**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S8.

Abbildung 5),<sup>[50,66]</sup> oder über die Serinseitenkette, wie in Enterobactin.<sup>[67]</sup>

Alternativ dazu kann auch ein  $\alpha$ -Hydroxysäurebaustein anstelle einer der Aminosäuren ein Makrolacton bilden, wie in den Kutzneriden (z. B. Kutznerid 1 (**18**), Abbildung 6).<sup>[68]</sup> Eine Variante findet sich im N-acylierten Lipopeptid Surfactin (**19**, Abbildung 7), in dem eine  $\beta$ -Hydroxyfettsäurekette an der Makrolacton-Bildung beteiligt ist.<sup>[69]</sup>

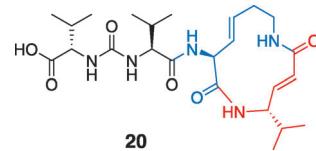


**Abbildung 6.** Kutznerid 1, ein cyclisches Hexa(depsi)peptid. Nichtproteinogene Aminosäuren: **Dichlorpyrroloindolinocarboxylat**, **L-O-Methyl-Ser**, **(2R,3S)- $\beta$ -Hydroxy-Glu**, **Methylcyclopropyl-Gly** (MeCPGly), **Piperazat**. Siehe Hintergrundinformationen, Schemes S9–S11.



**Abbildung 7.** Surfactin, ein  $\beta$ -Hydroxycarboxyllacton.

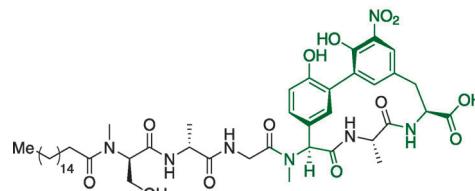
Zu den kleinsten natürlich vorkommenden Peptidmakrocyclen gehört das zwölffatomige Makrolactam in dem Proteasominhibitor Syringolin A (**20**, Abbildung 8).<sup>[70,71]</sup> Es bildet eine Stamm-Schlaufen-Struktur mit einem makrocyclischen Lactam aus nur zwei nichtkanonischen Amino-



**Abbildung 8.** Syringolin A. Nichtproteinogene Aminosäuren: **L-Vinyl-Val**, **L- $\Delta$ -3-Lysen**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S12.

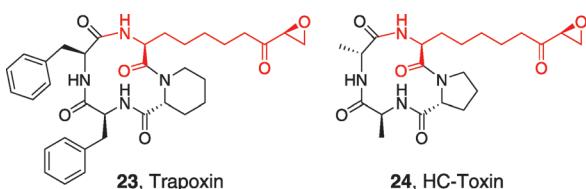
säuren. Eines ist ein  $\Delta^3$ -Lysen, das durch Dehydrierung eines 3-OH-Lys entstanden sein kann.<sup>[70]</sup> Das andere ist Vinyl-Val, das von einem NRPS-PKS-Hybridmodul gebildet wurde (siehe Abschnitt 6.1). Das konjugierte Enamid des Vinyl-Val ist der elektrophile Rest von Syringolin, der das Proteasom irreversibel inaktiviert, indem er das Thr<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub> im aktiven Zentrum blockiert.<sup>[72]</sup>

Eurypamid A (**21**, Abbildung 9) ist ein Peptidmakrocyclus aus drei Aminosäuren, der aus mutmaßlich mit Schwämmen vergesellschafteten Bakterien aus dem westlichen Pazifik bei Palau isoliert wurde;<sup>[73]</sup> er enthält eine Tyr-O-



**Abbildung 9.** Arylether und Aryl-Aryl-Bindungen in cyclischen Peptiden. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2S,3R,4S)-3,4-Dihydroxy-Arg**, **Arylether (L-Tyr/(R)- $\beta$ -Tyr)**, **Arylether (L-( $\beta$ -Hydroxy)phenyl-Gly/L-m-Nitro-Tyr)**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S13.

Tyr-Brücke, vergleichbar mit der Tyr-C-Tyr-Brücke in Arylomycin-Antibiotika (z. B. Arylomycin B-C<sub>16</sub> (**22**), Abbildung 9).<sup>[74,75]</sup> Der Arylether in der Seitenkette von **21** stammt wahrscheinlich von einer radikalischen Einelektronen-Phenoxyreaktion, vermittelt durch eine eisenkatalysierte Oxygenaseeinwirkung auf die beiden Tyrosinseitenketten eines Tripeptid-Vorläufers.<sup>[76]</sup> Diese Querverbindungen verursachen die starre Architektur in **21** und **22** (Abbildung 9).<sup>[75,77]</sup> Eurypamid A (**21**) enthält auch das ungewöhnliche 3R,4S-Dihydroxy-L-Arg,<sup>[77]</sup> wobei der Zeitpunkt der zweifachen Hydroxylierung unbekannt ist. Sie könnte an der freien Aminosäure, dem vermuteten Zwischenprodukt auf

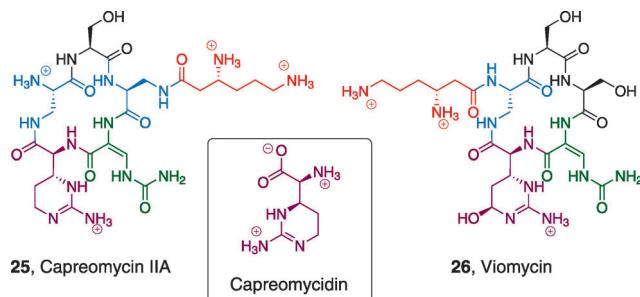


**Abbildung 10.** Naturstoffe, die L-Aeo enthalten. Nichtproteinogene Aminosäure: **L-2-Amino-8-oxo-9,10-epoxydecanoat (Aeo)**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S14.

der Aminoacyl-S-T-NRPS-Synthesestrecke oder dem freigesetzten Peptid ablaufen.

Makrocyclische Tetrapeptide findet man auch in den Histondeacetylase(HDAC)-Hemmern der Trapoxin- (**23**) und der HC-Toxinklasse (24, Abbildung 10).<sup>[78,79]</sup> Deren kompakte Architektur dirigiert die Epoxyketon-Seitenkette des ungewöhnlichen 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxydecansäure-(Aeo)-Epoxyrestes in das aktive Zentrum der HDACs, wo es zur irreversiblen Bindung an das dort befindliche Nucleophil kommt.<sup>[80]</sup> Die Strategie, nach der das Aeo-Monomer gebildet wird, wird in Abschnitt 6.2 dargestellt.

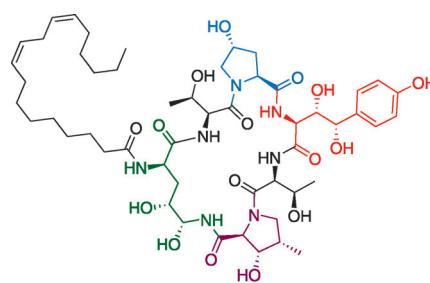
Cyclische Pentapeptidgerüste finden sich in den Tuberkulosemitteln Capreomycin (**25**, Abbildung 11) und Viomycin (**26**).<sup>[49]</sup> Charakteristisch sind der Makrolactam-Ringschluss über 2,3-DAP,<sup>[44]</sup> ein  $\beta$ -Lys im Stamm der Stamm-



**Abbildung 11.** Naturstoffe, die ein Capreomycinidin enthalten. Nichtproteinogene Aminosäuren:  **$\beta$ -Lys, L-2,3-DAP, (E)-Ureidodehydro-Ala, Capreomycidin und  $\delta$ -Hydroxycapreomycidin**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S15.

Schlaufen-Struktur, das cyclische Arginin-Derivat Capreomycinidin und ein Ureido-Dehydro-Ala. Diese ungewöhnlichen Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle für die Fähigkeit beider Antibiotika, an die Berührungsfläche zwischen der 30S- und der 50S-Untereinheit bakterieller Ribosomen zu binden.<sup>[81]</sup> Die Biosynthese der  $\beta$ -Lys- und Capreomycinidin-Bausteine wird in den Abschnitten 5.1.2 und 5.6.3 besprochen.

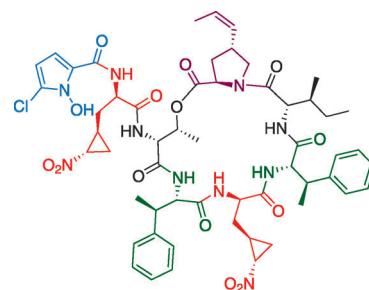
Zu den Hexa(depsi)peptiden gehören die Kutznerid-Familie der Hexapeptidolactone (z.B. **18**, Abbildung 6)<sup>[82]</sup> mit antifungischer Wirkung und die Echinocandine (z.B. Echinocandin B (**27**), Abbildung 12),<sup>[83,84]</sup> die die pilzlichen 1,3-Glucansynthetasen als Ziel haben. Kutzneride haben fünf nichtproteinogene Aminosäurebausteine und eine ungewöhnliche Hydroxysäure (*tert*-Butylglycolat), die an der Ausbildung der Makrolactonstruktur beteiligt sind.<sup>[68]</sup> Die



**Abbildung 12.** Echinocandin B. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2S,3S,4S)-3,4-Dihydroxyhomo-Tyr, (2S,4R)-4-Hydroxy-Pro, (2R,4R,5R)-4,5-Dihydroxy-Orn, (2S,3S,4S)-3-Hydroxy-4-methyl-Pro**. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S16.

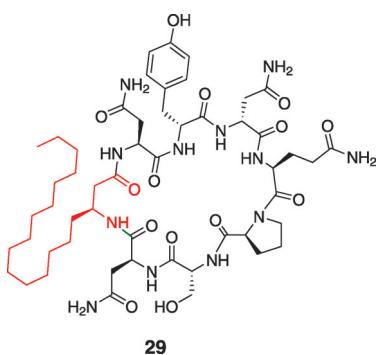
Echinocandine besitzen ein Hexapeptidgerüst mit einer metastabilen Halbaminalbindung zwischen N<sub>5</sub> eines N<sub>1</sub>-acylierten Ornithins und der Carbonylgruppe eines 3-Methyl-4-hydroxyprolins. Die Ornithinseitenkette und eine ungewöhnliche Homotyrosin-Seitenkette sind dihydroxyliert, wobei der Zeitpunkt der Hydroxylierungen unbekannt ist.

Hormaomycin (**28**, Abbildung 13) ist ein anderes Hexapeptidolacton, das auch zahlreiche nichtkanonische Aminosäureeinheiten enthält, darunter zwei  $\beta$ -Methyl-Phe, ein Propenylprolin und ein auffälliges Nitrocyclopropylalanin.<sup>[85]</sup>



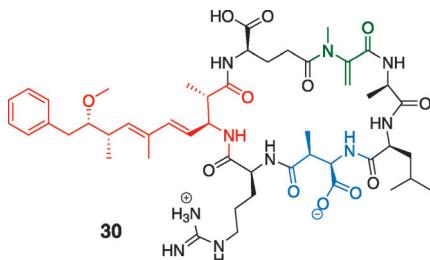
**Abbildung 13.** Hormaomycin. Nichtproteinogene Aminosäuren: **Nitrocyclopropyl-Ala, 5-Chlor-1-hydroxypyrrrol-2-carboxylat, (2S,3R)- $\beta$ -Methyl-Phe, (2R,4R)-4-((Z)-Propenyl)-Pro**. Siehe Hintergrundinformationen, Schemes S17–S20.

Die OH-Gruppe eines Thr ist an der Bildung des Hexapeptidolacton-Makrocyclus beteiligt. Dessen Aminogruppe ist mit einem Dipeptid acyliert, der ein weiteres Nitrocyclopropyl-Ala und einen von Prolin abstammenden N-OH-2-Chlorpyrrolcarboxylrest trägt. Eine schematische Darstellung der Kettenverlängerung dieses bemerkenswerten Naturstoffs ist in Abbildung S17 (Hintergrundinformationen) gezeigt. Heptapeptidgerüste finden sich in verschiedenen Naturstoffen, darunter in N-acyliertem Mycosubtilin (**29**, Abbildung 14),<sup>[86]</sup> und Surfactin-Lipopeptiden aus *Bacillus* spp. (siehe Abbildung 7).<sup>[69]</sup> Der  $\beta$ -Hydroxy-Substituent an der Fettsäurekette ist an der Makrolactonbildung beteiligt, während die Fettsäurekette im Mycosubtilin eine  $\beta$ -Aminogruppe trägt, die ein Makrolactam bildet. Callipeltin B (**16**, Abbildung 4) ist ein Heptadepsipeptid aus einem Schwamm mit



**Abbildung 14.** Mycosubtilin. Nichtproteinogene Aminosäure: (*S*)- $\beta$ -Aminostearat.

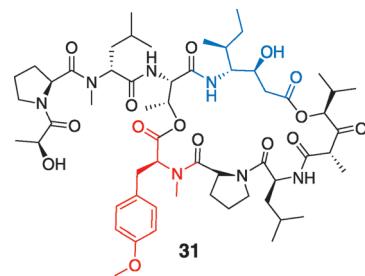
einem D-*allo*-Thr und einem  $\beta$ -Methoxy-Tyr.<sup>[64]</sup> Die antibakteriellen Polymyxine (z.B. **15**, Abbildung 3) haben mehrere 2,4-DAB-Reste, von denen einer Teil des Heptapeptidyl-Makrolactamringes ist.<sup>[63]</sup> Diese Seitenketten sind unter physiologischen Bedingungen kationisch und können dazu dienen, das Antibiotikum durch Wechselwirkung mit anionischen Lipopolysacchariden auf der Oberfläche Gram-negativer bakterieller Pathogene abzulagern.<sup>[87]</sup> Cyanobakterien bilden zahlreiche toxische cyclische Peptide nach der nichtribosomalen Strategie.<sup>[88]</sup> Zu ihnen gehören die Microcystine (z.B. Microcystin LR (**30**), Abbildung 15), cyclische Heptapeptide, die die Proteinphosphatase I hemmen.<sup>[89]</sup> Es



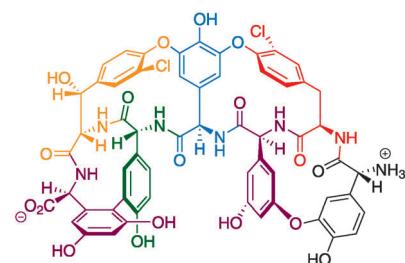
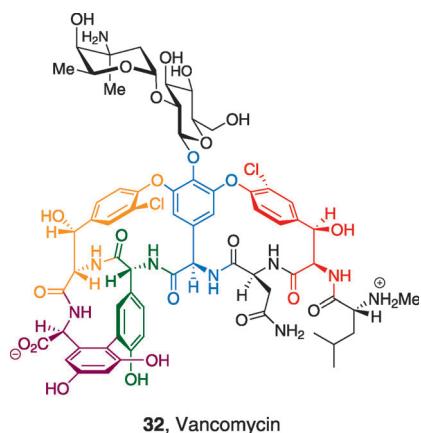
**Abbildung 15.** Microcystin LR. Nichtproteinogene Aminosäuren: Vinylloges  $\beta$ -Ala, (*2R,3S*)- $\beta$ -Methylaspartat, Dehydro-Ala.

sind mehr als 70 Strukturvarianten bekannt, was auf die geringe Substratspezifität der sieben Module umfassenden NRPS-Synthesestrecke hindeutet. Zu den ungewöhnlichen Aminosäuren gehören Dehydroalanin,  $\beta$ -Me-D-Isoaspartat, der Polyketidabkömmling Adda und Isoglutamat. Die Didemnine (z.B. Didemnin B (**31**), Abbildung 16) sind cyclische Heptadepsipeptide aus bakteriellen Symbionten von Seescheiden;<sup>[90]</sup> sie sind interessant wegen ihrer immunsuppressiven Eigenschaften.<sup>[91]</sup> Unter den auffälligen Bausteinen befindet sich der Isostatinrest mit einer 3-OH,4-NH<sub>2</sub>-Gruppierung, der durch ein hybrides NRPS-PKS-Modul aufgebaut wird (siehe Abschnitt 6.1).

Eine besondere Art, ein lineares Heptapeptidylgerüst in eine fixierte Architektur zu überführen, findet sich bei der Reifung des mit der T<sub>7</sub>-Domäne verknüpften linearen Heptapeptidyl-Zwischenprodukts beim Aufbau des Antibiotikums Vancomycin (**32**, Abbildung 17).<sup>[92,93]</sup> Drei Häm-Eisen enthaltende Monooxygenasen wirken zusammen zur Bildung



**Abbildung 16.** Didemnin B. Nichtproteinogene Aminosäuren: L-O-Me-Tyr, (*3S,4R,5S*)-Isostatin.



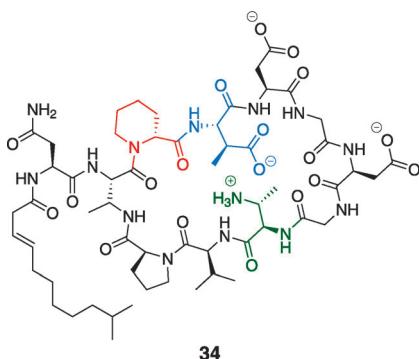
**Abbildung 17.** Vancomycin und Teicoplanin. Nichtproteinogene Aminosäuren: (*2R,3R*)- $\alpha$ -Chlor-(oder  $\beta$ -Hydroxy-*m*-chlor)Tyr-Arylether, 3,5-Dihydroxy-Tyr-Arylether, *p*-Hydroxyphenyl-Gly-Aryl-Aryl, 3,5-Dihydroxyphenyl-Gly-Aryl-Aryl- oder -Arylether, (*2S,3R*)- $\beta$ -Hydroxy-*m*-chlor-Tyr-Aryl-ether. Siehe Hintergrundinformationen, Schemes S21–S23.

von Phenoxyradikalen als Zwischenprodukte, um die Aminosäuren 2–4, 4–6 und 5–7 miteinander zu verknüpfen.<sup>[94,95]</sup> Keine dieser fünf Aminosäuren ist proteinogen, und alle haben ein Redoxpotential, das sie für radikalische Kupplungsreaktionen zugänglich macht. Die Reste 2 und 6 sind  $\beta$ -OH-Tyr, die Reste 4 und 5 sind 4-OH-Phenylglycin, und Rest 7 ist ein 3,5-Dihydroxyphenylglycin. In Teicoplanin (**33**) (Aglykon), Abbildung 17) gibt es eine vierte Brücke zwischen Tyr<sub>1</sub> und 3,5-(OH)<sub>2</sub>-Phgly<sub>3</sub>, sodass alle sieben Reste an der Ausbildung der vier Brückenbindungen beteiligt sind. Die Bildung dieser ungewöhnlichen Arylaminosäuren wird weiter unten diskutiert.

Daptomycin ist ein in der Klinik verwendetes N-acylieretes, 13 Aminosäuren umfassendes NRP-Antibiotikum (**17**,

Abbildung 5.<sup>[96]</sup> Der Makrolactonring besteht aus 10 Aminosäuren und wird aus der OH-Gruppe von Thr<sub>4</sub> und der Carbonylgruppe von Aminosäure 13, dem nichtproteinogenen Kynurenin, gebildet, das aus dem oxidativen Metabolismus von Tryptophan stammt.<sup>[97]</sup> Er enthält auch ein nichtproteinogenes 3-Methyl-Glu 11 als Träger einer von mehreren Carboxylgruppen in der Seitenkette, die koordinativ Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden und die Konformation hin zu einer membranaktiven Form ändern.

Friulimicin ist ein anderes nichtribosomal gebildetes Lipopeptid (**34**, Abbildung 18),<sup>[45]</sup> mit einem Decapeptidyl-Makrolactam zwischen einem 2,3-Diaminobutyrylrest an Position 2 und Pro<sub>11</sub>. Friulimicin bindet den Lipid-II-Carrier, der für die Peptidoglycanbildung beim Aufbau der bakteriellen Zellwand benötigt wird.<sup>[98]</sup> Auch Friulimicin hat zusätzliche nichtproteinogene Aminosäurebausteine, darunter Pipelat<sub>3</sub>, β-Me-Asp<sub>4</sub> und ein weiteres 2,3-DAB.



**34**

Abbildung 18. Friulimicin. Nichtproteinogene Aminosäuren: **D-Pipecolat**, **β-Methyl-Asp**, **2,3-DAB**.

Ein Makrolactam aus elf Aminosäuren wird im letzten Schritt der Biosynthese des immunsuppressiven Undecapeptids Cyclosporin A (**35**, Abbildung 19) gebildet, indem D-Ala<sub>1</sub> in Kopf-Schwanz-Orientierung mit dem als Thioester vorliegenden Carbonylende von L-Ala<sub>11</sub> durch die mehrere MDa große NRPS-Cyclosporinsynthase verknüpft wird.<sup>[99]</sup> Sieben der elf Aminosäuren im Cyclosporin sind N-methyliert. Außerdem gibt es ein nichtproteinogenes 2-Aminobutyryl und ein Methylbutenylthreonin, das durch ein PKS-Modul mit anschließender Transaminierung gebildet wird.<sup>[100]</sup>

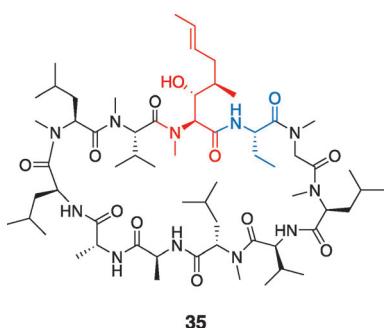
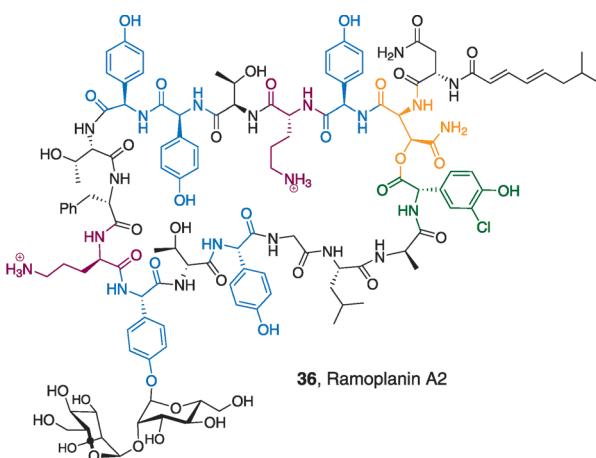


Abbildung 19. Cyclosporin A. Nichtproteinogene Aminosäuren: **(2S,3R,4R)-(E)-Butenylmethyl-Thr**, **L-α-Aminobutyrat**.

Zu den größten nichtribosomal synthetisierten Peptidmakrocyclen gehören die Antibiotika Ramoplanin A2 (**36**)<sup>[101]</sup> und das verwandte Enduracidin (**37**, Abbildung 20).<sup>[48]</sup> In beiden Lipid-II-Bindern sind die Aminosäuren 2 und 16 zu einem Makrocyclus aus 15 Aminosäuren geschlossen.<sup>[102]</sup> Unter den nichtkanonischen Bausteinen befinden sich fünf 4-Hydroxyphenylglycine, und im Enduracidin finden sich zwei cyclische, vom Arginin abgeleitete Enduracididine.



**36, Ramoplanin A2**

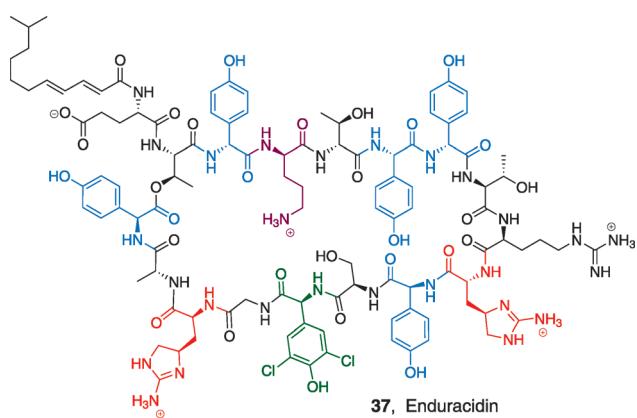
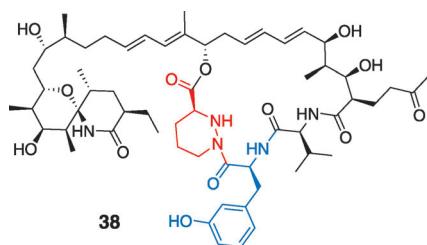


Abbildung 20. Ramoplanin und Enduracidin. Nichtproteinogene Aminosäuren: **Enduracidin**, **D- oder L-p-Hydroxyphenyl-Gly**, **L-3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl-Gly** oder **3-Chlor-4-hydroxyphenyl-Gly** (in **34**), **D-Orn**, **(2S,3S)-β-Hydroxy-Asp**.

#### 4.3. Makrocyclische hybride Gerüste aus nichtribosomalen Peptiden und Polyketiden

Es gibt auch variable makrocyclische Ringgrößen bei hybriden NRP-PK-Gerüsten. Die PKS-Maschinerie kann durch partielle Umsetzungen der an den PKS-Modulen gebundenen Zwischenprodukten voll reduzierte CH<sub>2</sub>-Gruppen, CHOH-, HC=CH- oder C=O-Gruppen erzeugen.<sup>[17,103]</sup> Diese drei funktionellen Gruppen können sich mit Aminosäurebausteinen mischen, wie man z. B. am makrocyclischen Teil von Syringolin A (**20**, Abbildung 8), Epothilon C (**2**, Schema 3) und Rapamycin (**3**, Schema 3) sieht. Das natürlich vorkommende Immunsuppressivum Sanglifehrin A (**38**, Ab-



**Abbildung 21.** Sanglifehrin A. Nichtproteinogene Aminosäuren: L-Piperazat, L-meta-Tyr.

bildung 21) hat 22 Atome im Makrocyclus, verteilt auf drei Aminosäuren (Val-(m-Tyr)-Piperazinsäure), der Rest ist polyketidisch.<sup>[104]</sup> Das Phytotoxin Coronatin (**11**, Schema 5) wird durch hybride PKS-NRPS-Module im Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* durch Ligation einer Cyclopropyl-Aminosäure an das Polyketidfragment Coronafascinsäure gebildet.<sup>[34, 105, 106]</sup>

Zentrum zwei Basen – eine protonierte als konjugierte Säure und die andere deprotoniert als reaktionseinleitende Base –, um eine stereochemische Gleichgewichtseinstellung am Cα zu katalysieren (Schema 6 B).<sup>[109]</sup> PLP-Racemases mit breiter Spezifität für eine Reihe proteinogener Aminosäuren wurden aus *Pseudomonas putida* isoliert,<sup>[110]</sup> so eine Threoninepimerase, die repräsentativ für die Umwandlung von Diastereomeren ist (L-Thr zu D-allo-Thr und D-Thr zu L-allo-Thr).<sup>[111]</sup>

In vielen NRPS-Synthesestrecken, darunter die für Vancomycin und Teicoplanin, gibt es ca. 50 kDa große Epimerisierungsdomänen, die nicht auf freie Aminosäuren wirken, sondern erst, nachdem eine L-Aminosäure aktiviert und als L-Aminoacylthioester gebunden wurde.<sup>[112]</sup> Dadurch wird das C<sub>2</sub>-H kinetisch acide, denn das Carbanion wird als Thioesterenolat stabilisiert (Schema 6 C). Die sterisch zufällige Rückübertragung von Wasserstoff ergibt eine Mischung aus L- und D-Aminoacylthioestern für die nachfolgende Kettenverlängerung durch stromabwärts liegende D-spezifische Kondensationsdomänen.<sup>[113–115]</sup>

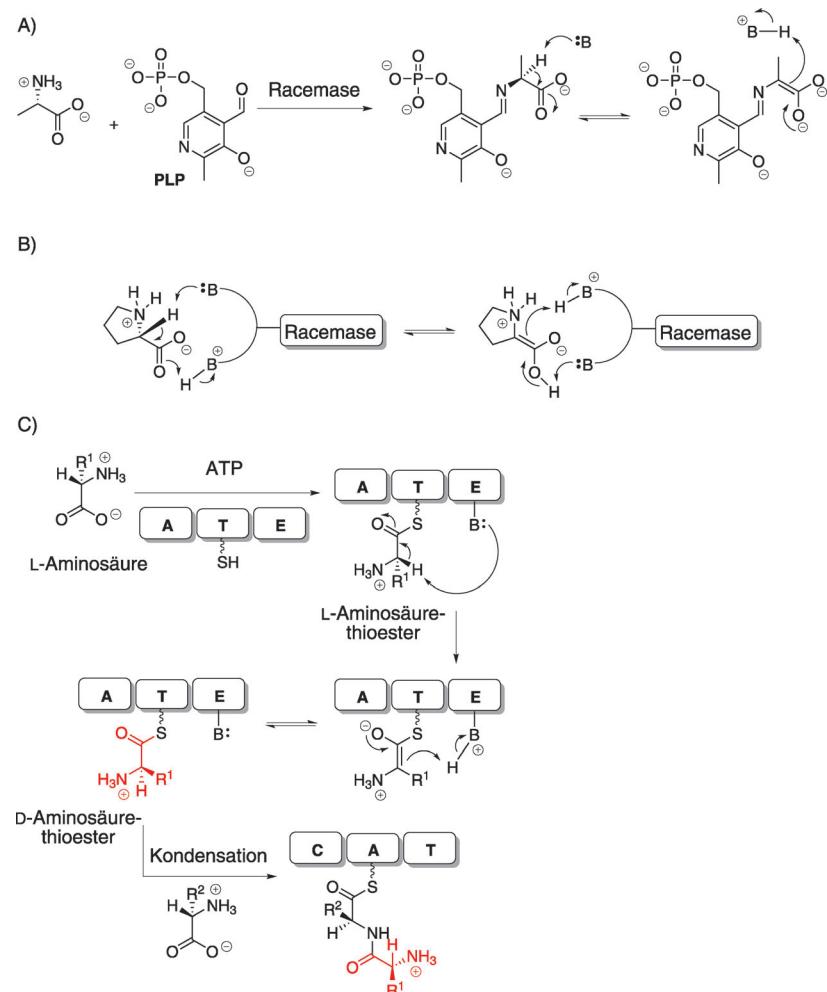
## 5. Synthese nichtproteinogener Aminosäurebausteine

### 5.1. D-Aminosäuren und β-Aminosäuren

Wie bereits oben erwähnt, enthält Microcystin LR (**30**, Abbildung 15) ein D-Isomer von β-Methylisoaspartat, und Vancomycin und Teicoplanin (**32** und **33**, Abbildung 17) enthalten D-Hydroxyphenylglycin-Einheiten, die an der Quervernetzung des starren Grundgerüsts beteiligt sind. Cyclosporin besitzt einen D-Ala-Rest (**35**, Abbildung 19). Insgesamt finden sich viele Dutzende von D-Aminosäuren in NRP-Gerüsten. Außerdem befinden sich β-Aminosäuren wie z.B. β-Lys in der Seitenkette der Tuberkulosewirkstoffe Viomycin und Capreomycin (**25** und **26**, Abbildung 11), ebenso wie β-Phe in Andrimid und β-Tyr in antitumorwirksamen En-Diin-Naturstoffen.<sup>[107, 108]</sup>

#### 5.1.1. Racematen und Epimerasen

Die am weitesten verbreitete Synthese von D-Aminosäuren erfolgt durch Aminosäureracematen und -epimerasen, um L-Isomere in D-Isomere umzuwandeln. Beispielsweise wird D-Alanin in bakteriellen Peptidoglycanschichten und in Cyclosporin durch Pyridoxalphosphat-abhängige Racematen gebildet, die das stabilisierte C<sub>2</sub>-Carbanion aus dem Ala=PLP-Aldimin bilden und anschließend stereochemisch zufällig reprotozipieren (Schema 6 A).<sup>[35, 36]</sup> Auf der anderen Seite gibt es die Glutamat-, Prolin- und Diaminopimelinsäure-Racematen; diese sind PLP-unabhängig und haben im aktiven



**Schema 6.** Racemase- und Epimeraseaktivität. A) PLP-abhängige Katalyse der Racemisierung. B) Säure-Base-Katalyse der Racemisierung. C) Modulgebundene Katalyse der Racemisierung.

### 5.1.2. Aminomutasen wandeln $\alpha$ - und $\beta$ -Aminosäuren ineinander um

Der gebräuchlichste Weg zu  $\beta$ -Aminosäuren führt über die Umsetzung der entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäuren durch eine Familie von Aminosäuremutasen. Bei zwei Typen mikrobieller Enzyme ist eine solche Mutaseaktivität beobachtet worden.<sup>[116,117]</sup> Die eine wandelt Phe oder Tyr in die zugehörige  $\beta$ -Aminosäure um. Im Falle von Tyrosin entstehen 3R- und 3S- $\beta$ -Tyrosin durch die Wirkung von Mutasen aus verschiedenen Quellen.<sup>[37,38]</sup> Diese Enzym-Unterfamilie enthält den kovalent gebundenen Cofaktor 4-Methyliden-5-imidazol-5-on (MIO), der durch die selbstmodifizierende Reifung einer Ala-Ser-Gly-Tripeptidschlaufe im inaktiven Proenzym entsteht (Schema 7A). Die prosthetische MIO-Gruppe reagiert als elektrophiles Zentrum für den Angriff durch die Aminogruppe des gebundenen Aminosäuresubstrats. Das entstehende Addukt kann eine C $\beta$ -H-Bindungsspaltung zu einem nicht kovalent gebundenen olefinischen Molekül als Zwischenzustand durchlaufen (z.B. Zimtsäure, wenn man von Phe aus startet), wobei die benachbarte Aminogruppe an den MIO-Rest gebunden ist. Die Aminogruppe wird auf die Zimtsäure zurückübertragen durch Angriff auf C $\beta$  anstelle von Ca,<sup>[118]</sup> gefolgt von der Abspaltung von  $\beta$ -Phe und Wiederherstellung von MIO als Ausgangs-Cofaktor.

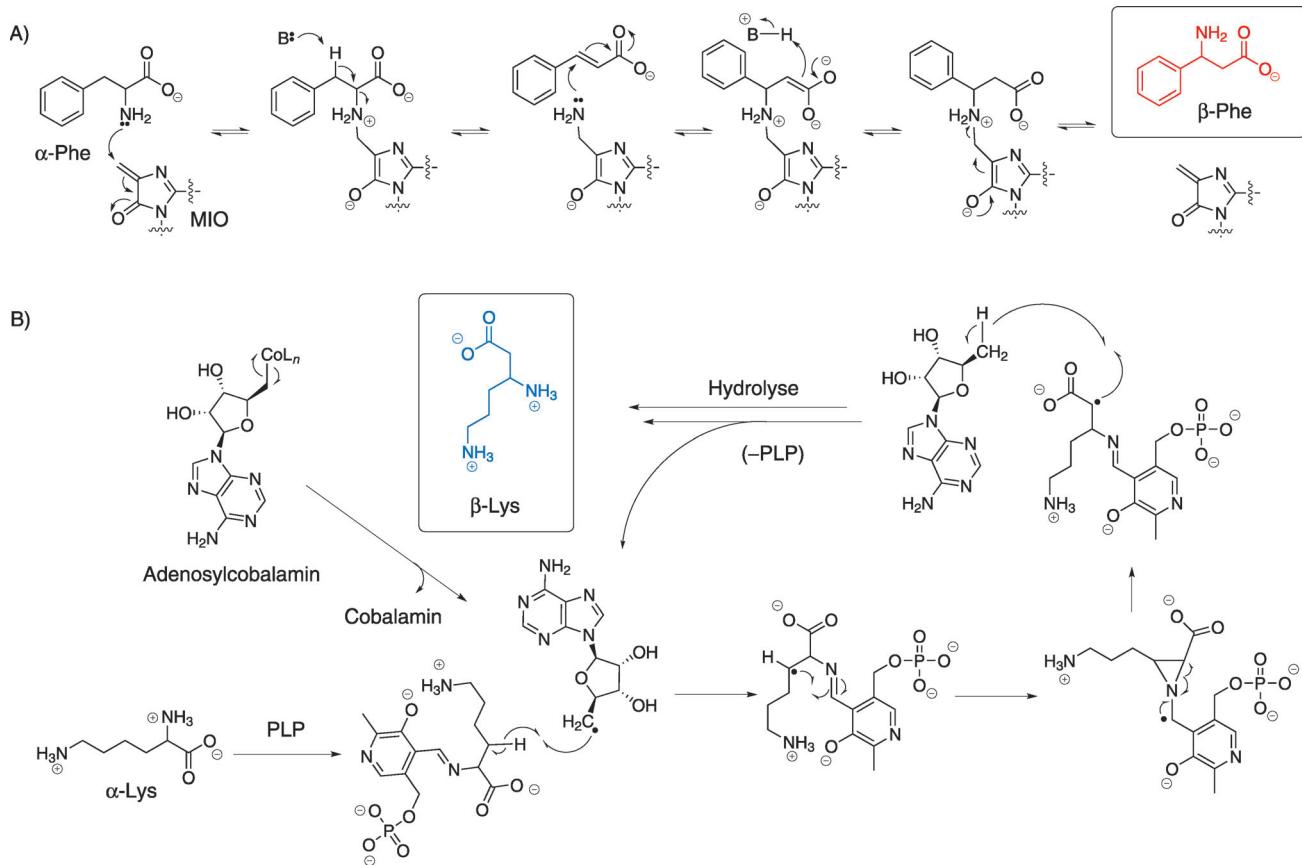
Die zweite Unterfamilie von Aminosäuremutasen stammt aus *Clostridium* spp. und umfasst die Lysin-2,3-Aminomutase,

die Glutamat-2,3-Aminomutase und die Lysin-5,6-Aminomutase.<sup>[117]</sup> In dieser Enzymklasse sind Pyridoxalphosphat und Adenosyl-B<sub>12</sub> die beteiligten Coenzyme (Schema 7B). PLP bildet das typische Aldimin mit den Substraten, und Coenzym B<sub>12</sub> vermittelt den Austausch zwischen H und NH<sub>2</sub> über einen radikalischen Zwischenschritt. Weiterhin zu dieser Enzymklasse gehören die D-Ornithin-4,5-Aminomutase (Produkt: (2R,4S)-Diaminopentansäure) und die Lysin-5,6-Aminomutase, die beide das distale und nicht das proximale Amin dieser zweibasischen Aminosäuren umsetzen. Das zweite Enzym setzt auch (3S)- $\beta$ -Lys zu 3S,5S-Diaminohexansäure um. Mutierte Formen der Lysin-2,3-Aminomutase können  $\beta$ -Alanin aus Lys als biotechnologischem Alternativweg zum Aspartat-Decarboxylaseweg bilden. Das  $\beta$ -Lys in Capreomycin und Viomycin entsteht möglicherweise durch eine enzymatische Umsetzung dieser Art (**25** und **26**, Abbildung 11).

### 5.2. C-Methyl-, O-Methyl- und N-Methylaminosäuren

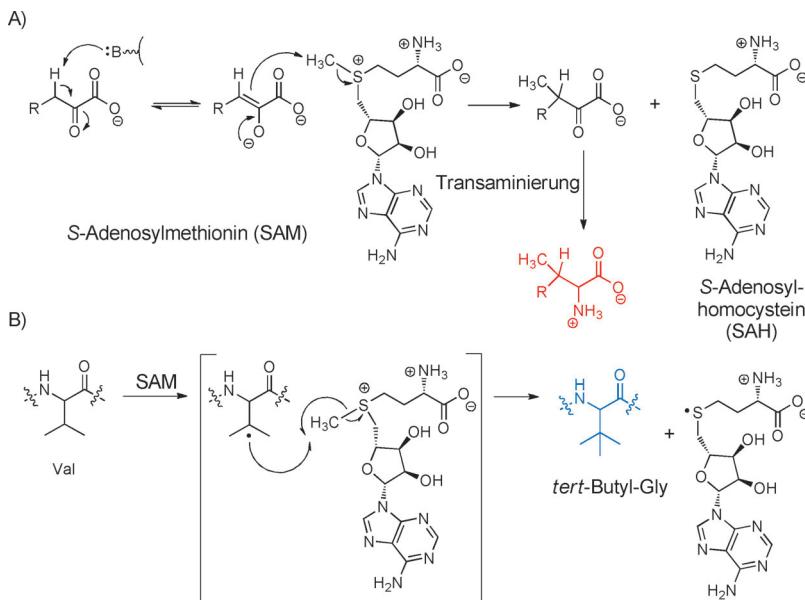
#### 5.2.1. Methylierungen an C $\beta$

Friulimicin enthält ein  $\beta$ -Methyl-Asp (**34**, Abbildung 18), Daptomycin ein  $\beta$ -Methyl-Glu (**17**, Abbildung 5) und Hormaomycin zwei  $\beta$ -Methyl-Phe (**28**, Abbildung 13). In den bislang auf zeitliche Abfolge und Mechanismus untersuchten Fällen erfolgt die C $\beta$ -Methylierung bei Bausteinen einer



**Schema 7.** Umwandlung von  $\alpha$ - in  $\beta$ -Aminosäuren. A) MIO-vermittelte Katalyse. B) Katalyse mit radikalischer Zwischenstufe.

NRPS-Synthesestrecke auf dem  $\alpha$ -Ketosäurestadium.<sup>[119]</sup> Dies ermöglicht die Nutzung des reichlich verfügbaren Methyldonors SAM, um seinen  $\text{CH}_3^+$ -Rest auf ein  $\text{C}\beta$ -Carbanion zu übertragen. Die nachfolgende diastereoselektive Transaminierung der 3-Methyl-2-ketosäuren liefert die  $\beta$ -verzweigten Aminosäuren (Schema 8A). Diese Transformationen erfolgen vor der Aminosäureaktivierung durch die entsprechende NRPS. Mehrfache Methylierungen an Pyruvat



**Schema 8.** C-Methylierung von Aminosäuren in der  $\beta$ -Position. A) SAM-vermittelte C-Methylierung. B) Radikalische SAM-vermittelte C-Methylierung. Siehe Hintergrundinformationen, Figure S1.

können die Dimethyl- und TrimethylDerivate der Ketosäuren erzeugen und führen entweder zur zugehörigen Aminosäure (*tert*-Butylglycin) oder auf reduktivem Weg zum *tert*-Butylglycolat, wie es in Kutzneriden (z.B. **18**, Abbildung 6) vorkommt. Im Unterschied zum De-novo-Aufbau des *tert*-Butylrestes an einem Aminosäurebaustein werden die *tert*-Butylglycine der ribosomalen Peptide Polytheonamid B und Bottromycin A<sub>2</sub> (**14**, Abbildung 2)<sup>[120,121]</sup> wahrscheinlich durch posttranskriptionale C-Methylierung von Valin-Seitenketten am  $\beta$ -Kohlenstoff über einen radikalischen, SAM-vermittelten Transfer von  $\text{CH}_3^+$ -Gruppen gebildet (Schema 8B). Eine analoge C-Methylierung einer Ile-Seitenkette zur entsprechend verzweigten Seitenkette kommt ebenfalls vor. Ebenso wird das  $\beta$ -Methyl-Phe in Bottromycin vermutlich auch nach einem solchen radikalischen SAM-abhängigen Mechanismus verlaufen. Noch auffälliger ist eine verwandte sequenzielle Addition von vier C<sub>1</sub>-Einheiten, um einen  $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ -Rest aufzubauen, wahrscheinlich nach demselben SAM-Radikalmechanismus. Letztendlich entsteht so *tert*-Butylglycin, das in **14** (Abbildung 2) vorkommt.<sup>[61]</sup> Einige C-Methylierungen des Indolrings von Tryptophan erfolgen an reaktionsträgen Kohlenstoffatomen. Diese SAM-abhängigen Methylübertragungen verlaufen wohl auch über  $\text{CH}_3^+$ -Radik-

kalgruppen, ähnlich wie bei der Biosynthese von Polytheonamid B.

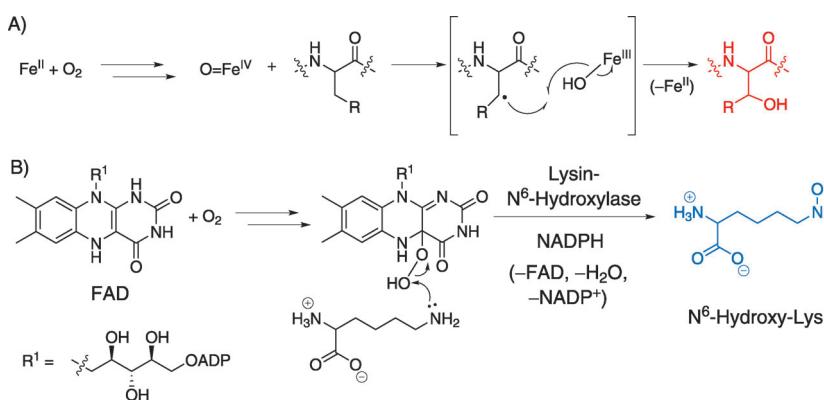
### 5.2.2. O- und N-Methylierungen

Bei O-Methylierungen wie im O-Me-Ser in Kutzneriden (Abbildung 6) und dem O-Me-Tyr in Didemnin B (**31**, Abbildung 16) sind die OH-Gruppen der Seitenketten die nächstliegenden Nucleophile, um die aktivierte Methylgruppe des Cosubstrats SAM für eine konventionellere Übertragung einer „ $\text{CH}_3^+$ -Gruppe“ anzugreifen.<sup>[68,90]</sup> Der Zeitpunkt der O-Methylierung, ob an der freien Aminosäure oder nach Einbau in ein Peptidgerüst, ist nicht bekannt.

Eine Reihe von NRPs trägt eine oder mehrere N-methylierte Peptidbindungen. So tragen 7 der 11 Peptidbindungen in Cyclosporin A (**35**, Abbildung 19) und der N-Terminus von Vancomycin (**32**, Abbildung 17) N-Methylsubstituenten. Auch die N-Methylierungen verlaufen mit SAM als Cosubstrat über den direkten Einfang der freigesetzten Methylgruppe durch den als Nucleophil fungierenden basischen Aminstickstoff.<sup>[2]</sup> Die meisten dieser Reaktionen werden durch Methyltransferase(MT)-Domänen katalysiert, die in die A-Domänen der entsprechenden kettenverlängernden NRPS-Module inseriert sind.<sup>[2]</sup> Erste Untersuchungen haben ergeben, dass einige N-Methylaminosäuren auch ribosomal in *E. coli* eingebaut werden können.<sup>[122,123]</sup>

### 5.3. Seitenkettenhydroxylierungen

In den 15 nichtribosomalen Peptidgerüsten, die im vorherigen Abschnitt erwähnt wurden, finden sich 11 hydroxylierte nichtkanonische Aminosäurereste. Zwei der Hydroxygruppen, im Statinrest von Miraziridin A (**13**, Abbildung 1) und im Isostatinrest von Didemnin B (**31**, Abbildung 16), stammen nicht aus molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), sondern aus der Carboxylgruppe von Val bzw. Ile, wie dies in Abschnitt 6.1 weiter unten bei hybriden NRPS-PKS-Modulen diskutiert wird. Alle anderen werden von Hydroxylasen aus  $\text{O}_2$  eingebracht; von diesen gibt es je nach beteiligtem Cofaktor zwei Varianten. Entweder sie enthalten ein anorganisches redoxaktives Eisenzentrum oder das organische Coenzym FAD. Ersteres erzeugt ein hochvalentes Oxoeisen-Zwischenprodukt (Schema 9A), während letzteres ein weniger aktives FAD-OOH als sauerstoffübertragendes Agens bildet (Schema 9B).<sup>[124]</sup> Die Entscheidung zwischen diesen beiden alternativen Mechanismen erfolgt nach der Reaktivität der Aminosäure, die das elektrophile Sauerstoffatom aufnimmt.<sup>[125]</sup> Die sechs Aminosäuren in den genannten Beispielen (Tyr, Arg, Pro, Glu, Orn, Homo-Tyr) werden jeweils an spezifischen Kohlenstoffatomen hydroxyliert; sie benötigen alle Eisen als Cofaktor, entweder als Häm-Eisen in den Mono-



**Schema 9.** Hydroxylierung von Aminosäuren. A) Metallabhängige Hydroxylierung. B) FAD-abhängige Hydroxylierung.

oxygenasen der Cytochrom-P450-Superfamilie oder als einkerniges Nichthäm-Eisen(II).<sup>[126,127]</sup> Beide Formen dieser eisenhaltigen Oxygenase erzeugen hochvalente Oxoeisen-Verbindungen, die nichtaktivierte C-H-Bindungen homolytisch spalten können, und geben ein OH-Äquivalent ab.

Der proteinogene Baustein *p*-Tyr wird normalerweise durch das Nichthämeisen-Enzym Phenylalaninhydroxylase gebildet. Dieses hydroxyliert den Phenylring von Phe regiospezifisch. Bei der Biosynthese von Sanglifehrin (**38**, Abbildung 21)<sup>[9]</sup> und bei der Familie der Pacidamycin-Peptidylnucleosidanbibiotika<sup>[128]</sup> kommt stattdessen eine orthologe Phe-Hydroxylase mit einer Spezifität für die *meta*-Position ins Spiel, die das nichtproteinogene *meta*-Tyrosin bildet. Die enzymatische Hydroxylierung an der benzylischen (C<sub>3</sub>) Position des Tyrosins führt zum β-OH-Tyr, das in den Positionen 2 und 6 von Vancomycin und Teicoplanin vorkommt.<sup>[39,40]</sup> Die drei oxidativ gebildeten Querverbindungen im Vancomycingerüst (und vier im Teicoplanin) kommen durch aufeinanderfolgende Umsetzungen, katalysiert durch drei Hämproteinoxygenasen, die im Biosynthese-Gencluster codiert sind, zustande. Sie verbinden β-OH-Tyr<sub>2</sub> mit 4-OH-Phegly<sub>4</sub>, 4-OH-Phegly<sub>4</sub> mit β-OH-Tyr<sub>6</sub> und 4-OH-Phegly<sub>5</sub> mit Dihydroxy-Phegly<sub>7</sub> (siehe Schema S21, Hintergrundinformationen).<sup>[129]</sup> Wichtig ist, dass einerseits β-OH-Tyr als freie Aminosäure gebildet wird, andererseits die oxidative Brückenbildung in die NRPS-Synthesestrecke integriert ist.

Die Glutamat-3-Hydroxylase, die bei der Reifung von Kutznerid (**18**, Abbildung 6) mitwirkt, ist eine einkernige Nichthämeisen-Oxygenase,<sup>[68]</sup> während die Oxygenase, die C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> der Ornithin-Seitenkette des Echinocandin-Gerüsts (**27**, Abbildung 12) angreift, eine Häm-haltige Oxygenase ist.<sup>[130]</sup> Es ist noch nicht klar, woran man erkennen kann, ob eine bestimmte eisenhaltige Hydroxylase die freie Aminosäure modifiziert (eine Eigenschaft, die besonders für den Einbau der Aminosäuren in Proteine nützlich ist) oder ob sie stattdessen nur einen Aminosäurerest umsetzt, der in einem Deshydroxy-Peptidgerüst vorkommt.

Flavinabhängige Monooxygenasen verwenden FL-OOH als Übertragungsagens für ein elektrophiles („OH<sup>+</sup>“) Äquivalent.<sup>[125]</sup> Beispielsweise benötigen die Bildung des 2-Cl-*N*-OH-Pyrrolools bei der Hormaomycin-Biosynthese (**28**, Abbildung 13)<sup>[51]</sup> und die Hydroxylierung eines 3-Cl-β-Tyr-Mono-

mers zum 3-Cl-5-OH-β-Tyr bei der Biosynthese von C-1027 die Aktivität FAD-haltiger Monooxygenasen.<sup>[131]</sup> Beide Oxidationsreaktionen laufen an Aminoacylsubstraten ab, die über Thioesterbindungen an T-Domänen angehängt sind. Analog dazu ist für N-Hydroxylierungen an Aminosäuren mit basischer Seitenkette (z.B. Orn, Lys in der Siderophor-Biosynthese und am Indol-NH Trp-haltiger Gerüste) die Nucleophilie des Stickstoffs ausreichend für ein weniger reaktionsfähiges Oxygenierungsagens. Viele solcher Aminosäure-N-Oxygenasen sind flavinhaltige Enzyme und setzen freie Aminosäuresubstrate um.<sup>[125]</sup> Die weitere Oxygenierung von N-OH zu Nitroso- oder gar Nitrogruppen kommt in einigen NRP-Biosynthesewegen vor, wie dies für die Bildung des Nitrocyclopropylalanis in Hormaomycin (**28**, Abbildung 13) vorgeschlagen wurde.<sup>[51]</sup>

#### 5.4. Chlorierung als Variante der Hydroxylierung

Aminosäure-Chlorinasen können als Varianten der oben beschriebenen Oxygenasefamilien angesehen werden.<sup>[41]</sup> In Fällen, in denen ein formaler Ersatz eines C-H durch ein C-Cl an einem nichtaktivierten Kohlenstoffatom der Aminosäureseitenkette erfolgt, sind die verantwortlichen Katalysatoren wieder einkernige Eisenenzyme, die ein Äquivalent O<sub>2</sub> und α-Ketoglutarat in enger Analogie zu ihren Oxygenase-Gegensätzen umsetzen. Solche Halogenasen für Pro, Leu und Ile setzen Aminoacyl-S-T-Substrate um.<sup>[132]</sup>

Im Gegensatz dazu erfordern die elektronenreiche Phenoseitenkette des Tyr und der Indolring des Trp wiederum ein schwächeres Chlorierungsagens, analog zur Hydroxylierungschemie, die oben für die Flavoenzyme beschrieben wurde. Auch hier werden FADH<sub>2</sub>-haltige Halogenasen verwendet, diesmal, um ein „Cl<sup>+</sup>“-Äquivalent zu übertragen.<sup>[133]</sup> Beispiele dafür sind 3-Cl-β-OH-Tyr von Glycopeptidantibiotika (Abbildung 17),<sup>[134]</sup> ClmS in der Chloramphenicol-Biosynthese,<sup>[135]</sup> die 6,7-Dichlorpyrrololoindole in den Kutzneriden (Abbildung 6),<sup>[136]</sup> die Biosynthese des Dictyostelium-Differenzierungsfaktors Dif-1 und die Biosynthese des 2-Cl-*N*-OH-Pyrrolcarboxyls des Hormaomycins (Abbildung 13).<sup>[51,137]</sup> Dies ist auch der wahrscheinlichste Weg zum 3,5-Dichlor-4-OH-Phegly im Enduracidin (**37**, Abbildung 20).<sup>[48]</sup> Interessanterweise erkennen die bekannten eisenhaltigen Halogenasen Aminoacyl-S-T-Substrate, während die bekannten flavinabhängigen Enzyme freie Aminosäuren umsetzen.

#### 5.5. Diaminosäuren

Während die sechs Kohlenstoffatome lange dibasische (α,ω) Aminosäure Lysin ein Proteinbaustein ist, sind die dibasischen C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>- und C<sub>5</sub>-Aminosäuren nichtproteinogene Bausteine. Beispielsweise findet sich der drei Kohlenstoffe

lange 2,3-DAP-Rest in Capreomycin (**25**, Abbildung 11), fünf 2,4-DAB-Reste sind in die kationischen Polymyxine (**15**, Abbildung 3) eingebaut, und die 2,5-Diaminopentansäure (Ornithin) kommt in Echinocandin (**27**, Abbildung 12) (wo sie doppelt hydroxyliert ist), Daptomycin (**17**, Abbildung 5) und in vielen Siderophoren vor.<sup>[138]</sup> Neben dem linearen 2,4-DAB findet sich auch das verzweigte 2,3-DAB als 2S,3S-Diastereomer in Friulimicin (**34**, Abbildung 18).<sup>[45]</sup>

Die Biosynthese von Ornithin ist gut untersucht, denn das Molekül ist Teil des primären Aminosäure-Stoffwechsels. 2,3-DAP entsteht durch die Pyridoxalphosphat-abhängige enzymatische Dehydratation von Serin zu einem DehydroAla-PLP-Zwischenprodukt, das dann durch NH<sub>3</sub> abgefangen wird (siehe Schema S15, Hintergrundinformationen).<sup>[44]</sup> Das verzweigte 2,3-DAB entsteht analog durch Thr-Dehydratation und regiospezifische C<sub>3</sub>-Aminierung, während das 2,4-DAB-Regioisomer vermutlich durch enzymatische Transaminierung des Primärmetaboliten Aspartatsemialdehyd entsteht (siehe Schema S6, Hintergrundinformationen).<sup>[45,46]</sup>

## 5.6. Cyclisierung von Aminosäure-Einheiten

### 5.6.1. Dreigliedrige Ringe

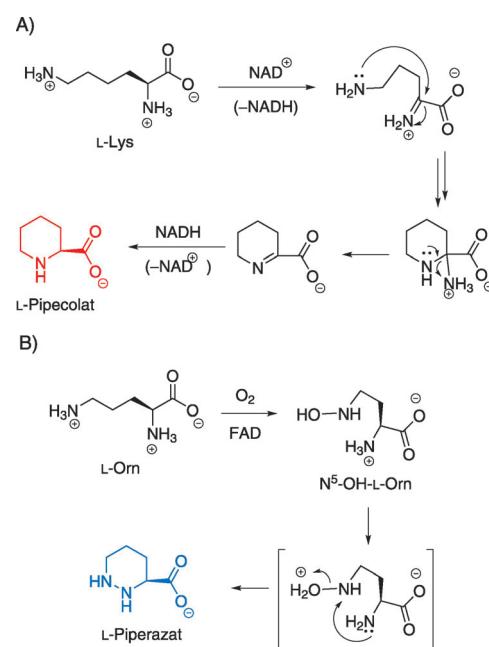
Eine der wichtigen funktionellen Eigenheiten nichtproteinogener/nichtkanonischer Aminosäuren ist die Konformationseinschränkung und Versteifung, die der Gerüststruktur aufgeprägt wird, wenn sie eingebaut werden. Eine solche Einschränkung entsteht durch die Ringgröße. In der Gruppe der monocyclischen Aminosäuren kann man dreigliedrige Ringe finden wie 1-Amino-1-carboxy-2-ethylcyclopropan im Coronamatrest von Coronatin (**12**, Schema 5),<sup>[105]</sup> dem Aziridindicarboxylat in Miraziridin A (**13**, Abbildung 1)<sup>[55]</sup> und im Nitrocyclopropylring, der in das vom Lysin abgeleitete Gerüst von Hormaomycin (**28**, Abbildung 13) eingebettet ist.<sup>[51]</sup> Das Cyclopropan in der Coronaminsäure stammt aus L-*allo*-Ile (dessen unmittelbarer Vorläufer unbekannt ist, aber D-Ile sein könnte). L-*allo*-Ile wird aktiviert und gebunden vom S-Pantetheinyl-Arm der T-Domäne des CmaA-Enzyms.<sup>[34]</sup> Dort durchläuft es eine regiospezifische C<sub>γ</sub>-Chlorierung, bevor der intramolekulare Angriff des C<sub>α</sub> auf das chlorsubstituierte C<sub>γ</sub> erfolgt, um so das Cyclopropangerüst von Coronaminsäure aufzubauen, während es noch über die Thioesterbindung fixiert ist. Die Umsetzung durch Thioesterase setzt Coronaminsäure frei,<sup>[139]</sup> die bei der nachfolgenden Ligation mit dem bicyclischen Polyketid Coronofacinsäure das Toxin Coronatin (**11**, Schema 5) ergibt, ein Mimetikum des Pflanzenhormons Jasmonsäure. Der Einsatz von Val anstelle von Ile in diesem Chlorierungs-/Cyclisierungsprozess führt zum methylsubstituierten Cyclopropan, auch Norcoronaminsäure genannt. Die kryptische Chlorierungsreaktion wird durch eine O<sub>2</sub>-verbrauchende eisenhaltige Halogenase katalysiert, wie oben erläutert wurde. Anstelle der Übertragung von OH<sup>-</sup> überträgt CmaB ein Cl<sup>-</sup> vom aktiven Zentrum des hochvalenten Eisenintermediats.<sup>[34]</sup>

Weniger offensichtlich ist der enzymatische Stoffwechselweg von Lys zu Nitrocyclopropyl-Ala, das im Hormaomycin (**28**, Abbildung 13) vorkommt; die C<sub>6</sub>-Aminogruppe von Lys wurde zur Nitrogruppe oxidiert, und eine Cyclopro-

pangruppe wurde durch C-C-Bindungsknüpfung zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>6</sub> gebildet. Zwei mögliche Variationen der Ringöffnung eines internen Lactons nach der N<sub>6</sub>- und C<sub>4</sub>-Oxygenierung wurden vorgeschlagen, aber noch nicht bestätigt.<sup>[51]</sup>

### 5.6.2. Orn- und Lys-Cyclisierungen

Zu den sechsgliedrigen cyclischen Aminosäuren gehören die Prolin-analoge Pipecolinsäure (Bestandteil von Rapamycin (**3**), Schema 3) und die 1,2-Hydrazo-analoge Piperazinsäure, die in Sanglifehrin (**38**, Abbildung 21) und den Kutzneriden (**18**, Abbildung 6) vorkommt. Pipecolinsäure wird von der Lysincyclodeaminase synthetisiert;<sup>[140]</sup> diese Enzymklasse enthält fest gebundenes NAD<sup>+</sup> und startet die Katalysesequenz durch Oxidation des α-Amins zum Imin mit enzymgebundenem NADH als Coprodukt. Der intramolekulare Angriff durch das C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> lässt unter Eliminierung von NH<sub>3</sub> ein cyclisches Imin entstehen. Das Δ<sup>1</sup>-Piperidincarboxylat wird am Ende durch Hydridübertragung von dem gebundenen NADH reduziert, wobei der ursprüngliche Oxidationszustand des gebundenen Coenzymes (NAD<sup>+</sup>) wiederhergestellt und Pipecolinsäure freigesetzt wird (Schema 10 A).



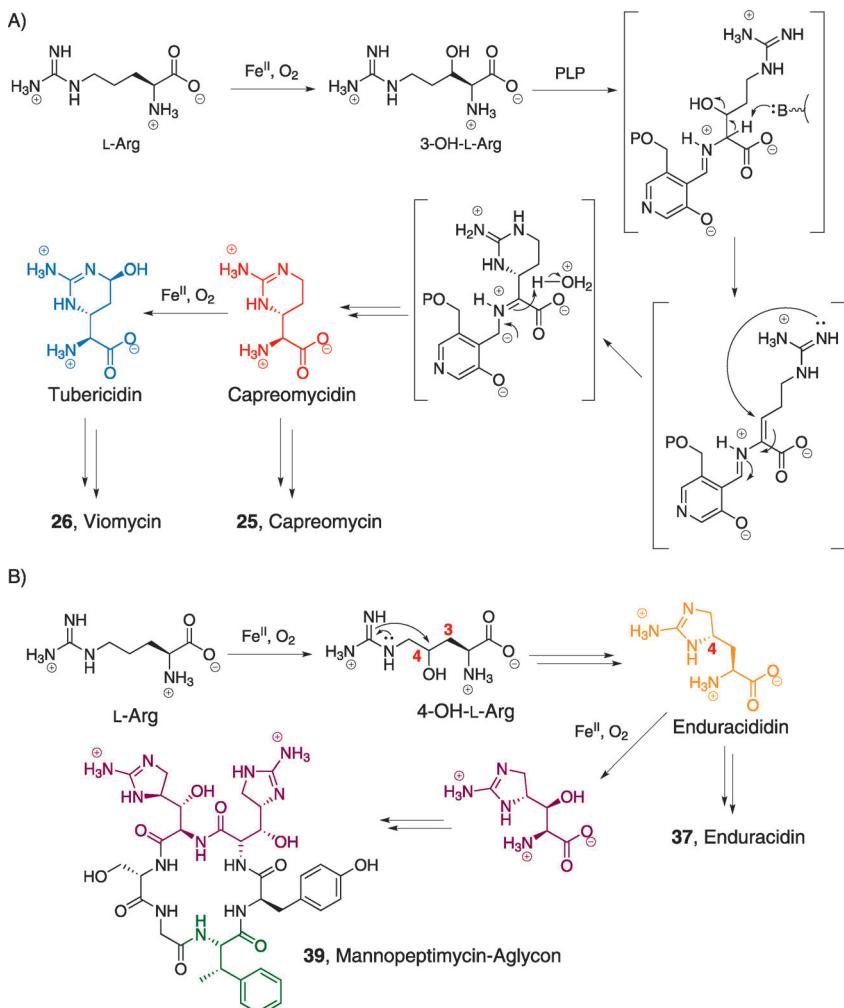
**Schema 10.** Biosynthese von Pipecolat und Piperazat. A) Vorgeschlagener Mechanismus der Pipecolatbildung. B) Vorgeschlagener Mechanismus der Piperazatbildung.

Der Piperazansäurering in Kutzneriden und Sanglifehrin ist ebenfalls ein Sechsring, hat aber zwei Stickstoffatome in einer Hydrazo-Bindung (N<sub>1</sub>–N<sub>2</sub>). Er stammt von Ornithin ab, und der erste Schritt ist eine N<sub>5</sub>-Hydroxylierung durch ein Flavoprotein.<sup>[141]</sup> Als nächster Reaktionsschritt wurde eine Oxidation zum N-Hydroxy-Orn vorgeschlagen. Dies löst einen intramolekularen Angriff des α-NH<sub>2</sub> als Nucleophil auf

das entstandene elektrophile Nδ unter Ausbildung der ungewöhnlichen N-N-Bindung aus (Schema 10B).

### 5.6.3. Cyclisierung des Guanidiniumrests von Arg

Fünf- und sechsgliedrige von Arg abstammende cyclische Guanidine finden sich in Enduracidin (**37**, Abbildung 20) und in Capreomycin (**25**, Abbildung 11). Der sechsgliedrige Capreomycidinring entsteht vermutlich im Anschluss an eine Hydroxylasereaktion, in der 3-OH-Arg gebildet wird.<sup>[142,143]</sup> Die nachfolgende Umsetzung durch ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym ergibt unter Wasserabspaltung ein Enamino-PLP-Addukt. Dieses wird intramolekular durch den terminalen Guanidin-Stickstoff abgefangen; bei der Ablösung vom aktiven Zentrum des PLP-Enzyms entsteht der sechsgliedrige Ring (Schema 11 A). In Viomycin (**26**, Abbildung 11) durchläuft das gleiche Ringsystem eine zusätzliche Hydroxylierung zum Tubericidinrest. Der Weg zu dem fünfgliedrigen cyclischen Guanidin in Enduracidin ist nicht so detailliert aufgeklärt (die Reaktionssequenz in Schema 11 B)



**Schema 11.** Biosynthese cyclischer Guanidine. A) Biosynthese cyclischer Guanidine mit sechs-gliedrigem Ring. B) Biosynthese cyclischer Guanidine mit fünf-gliedrigem Ring. Nichtproteogene Aminosäuren: **Capreomycinidin**, **Tubericidin**, **(2S,3S)-β-Methyl-Phe**, **β-Hydroxyenduracididin**, **Enduracididin**.

ist hypothetisch), obwohl ein ähnliches Ringsystem in Guanidomin durch den intramolekularen Angriff des terminalen Stickstoffs der Guanidinring auf ein C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-ungesättigtes Zwischenprodukt entsteht.<sup>[144]</sup> Bei den Mannopeptimycinen (z. B. **39**, Schema 11 B) führt eine anschließende Hydroxylierung an C<sub>3</sub> zum β-OH-Enduracididin.<sup>[145]</sup>

### 5.6.4. Bildung des Pyrroloindol-Tricyclus

Tryptophanreste können zu tricyclischen Pyrroloindolkernen umgesetzt werden, indem zwei Arten von Elektrophilen an die 2,3-Doppelbindung des Pyrrolrings addiert werden. Bei der Bildung der Kompetenzfaktor-Peptide von *Bacillus* wird eine Geranylgruppe an C<sub>3</sub> addiert, während die weiter unten liegende Amid-NH-Gruppe C<sub>2</sub> angreift.<sup>[146]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Übertragung von elektrophilem Sauerstoff als „OH<sup>+</sup>“ durch Oxygenasen, um eine transiente Indolepoxyd/Hydroxyiminium-Verbindung zu erzeugen. Diese kann durch das intramolekulare Amid abgefangen werden, wodurch ein Pyrroloindol wie in der Kutznerid-Biosynthese aufgebaut wird (Abbildung 6).<sup>[147]</sup> Diese Modifikationen laufen entweder während der Verlängerung der linearen Kette oder nach Bildung des makrocyclischen Peptidgerüsts ab. Am freien Trp sind sie nicht möglich. Eine vergleichbare Indolepoxydierung wird bei der Biosynthese von Fumichinazolin A in Pilzen beobachtet.<sup>[148]</sup>

### 5.7. Kynureneine und die Alkyl-/Alkenyl-Prolin-Biosynthese

Im Daptomycin (**17**, Abbildung 5) wird der Indolring des Tryptophans durch Katalyse der Tryptophan-2,3-Dioxygenase oxidativ zu N-Formylkynurenin gespalten. Durch enzymatische Deformylierung entsteht freies Kynurenin, das von der Adenylierungsdomäne des NRPS-Moduls 13 gebunden, aktiviert und als terminaler Baustein für Daptomycin eingebaut wird.

Die analoge oxidative Spaltung von Tyrosin erfolgt bei der Bildung des Propenylprolinmonomers von Hormaomycin (**28**, Abbildung 13) sowie bei der Biosynthese von Anthramycin, Suburomycin und Tomayomycin.<sup>[149]</sup> Der Weg beginnt konventionell mit der *ortho*-Hydroxylierung von Tyr zu L-DOPA und der nachfolgenden Oxidation des Diphenols zum Orthochinon.<sup>[150]</sup> Durch den intramolekularen Angriff des Amins auf das Chinon entsteht ein Dihydroxyindolcarboxylat, welches seinerseits oxidativ von einer Intradiol-Dioxygenase im Ring gespalten wird. Dabei entsteht ein Diendicarboxylat-substituiertes Prolin.

Die Entfernung der C<sub>2</sub>-Enoylgruppe muss allerdings ebenso wie die Addition eines C<sub>1</sub>-Fragments wahrscheinlich radikalisch nach der SAM-Enzymologie ablaufen, um dann in die Bildung der C<sub>3</sub>-substituierten Propenylgruppe einzumünden.<sup>[51]</sup> Man vermutet, dass das Propenyl-Pro ein freier Aminosäurebaustein für die Hormaomycin-Synthese ist. Insgesamt sind sechs Enzyme notwendig, um Tyr in Propenylprolin umzuwandeln.<sup>[51]</sup>

### 5.8. Hydroxylierte Phenylglycine

Das 4-OH-Phegly-Monomer von Vancomycin (**32**, Abbildung 17), Teicoplanin (**33**, Abbildung 17) und Enduracidin (**37**, Abbildung 20) wird von vier Enzymen synthetisiert.<sup>[42]</sup> Das erste Enzym, ein Homologes der Prephensäuredcarboxylase, setzt den Primärmetaboliten Prephensäure zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat um. Eine zweite Decarboxylase oxidiert dieses Zwischenprodukt zu *p*-Hydroxymandelssäure. Durch Oxidation der Hydroxygruppe zum Keton entsteht *p*-Hydroxybenzoylformiat. Das letzte Enzym transaminiert diese Ketosäure zu L-*p*-OH-Phegly. Das Phenylglycin aus Pristinamycin (Schema 4) entsteht analog.<sup>[43]</sup>

Im Gegensatz dazu entsteht das 3,5-Dihydroxyphenylglycin in Glycopeptiden in einer anderen Reaktionssequenz aus vier Enzymen (Abbildung 17). Der Weg beginnt mit einer PKS vom Typ III, die aus vier Molekülen Malonyl-CoA in einer iterativen decarboxylierenden Claisen-Reaktion das C<sub>8</sub>-Gerüst des 3,5-Dihydroxyphenylacetyl-CoA bereitstellt.<sup>[151,152]</sup> Das nächste Enzym katalysiert eine ungewöhnliche O<sub>2</sub>-abhängige oxidative Kettenverkürzung zum 3,5-Dihydroxybenzoylformiat. Das letzte Enzym ist eine Transaminase, die die 2S-Form des 3,5-(OH)<sub>2</sub>-Phegly produziert.

## 6. Aminosäuren, die von enzymatischen Synthesestrecken hergestellt werden

Eine Vielzahl nichtproteinogener Aminosäuren und entsprechender Peptide wurde isoliert, bei denen die Amino-Gruppe nicht am C<sub>2</sub> sondern am C<sub>4</sub> gebunden ist. Oft erscheint dabei ein C<sub>2</sub>-Verlängerungsstück, das von einem CH<sub>2</sub>-COOH-Äquivalent stammt und das in ein proteinogenes Aminosäuregerüst eingefügt wurde, wo es nun die Positionen C<sub>2</sub> und C<sub>1</sub> einnimmt. C<sub>3</sub> in diesen Gerüsten ist oft eine OH-CH<sub>2</sub>- oder O-CH<sub>3</sub>-Gruppe, wie man sie in den Aminosäuren Statin in Miraziridin A (**13**, Abbildung 1) und Isostatin in Didemnin B (**31**, Abbildung 16) findet. Gleiches gilt für Dolaisoleucin in Dolastatin 10.<sup>[153]</sup> Der Statinrest mit seinem tetraedrischen C<sub>3</sub>-OH war ein nützliches inhibitorisches Analoges der tetraedrischen Zwischenprodukte in der Reaktionssequenz einiger Aspartylproteasen.<sup>[154]</sup> Entsprechend trägt Miraziridin ein Vinyl-Arg an seinem C-Terminus (Abbildung 1) und Syringolin A ein Vinyl-Val (**20**, Abbildung 8). Diese Reste wurden ebenfalls durch eine aus Acetat stammende C<sub>2</sub>-Einheit erweitert, die jetzt allerdings sp<sup>2</sup>- und nicht sp<sup>3</sup>-hybridisiert ist.

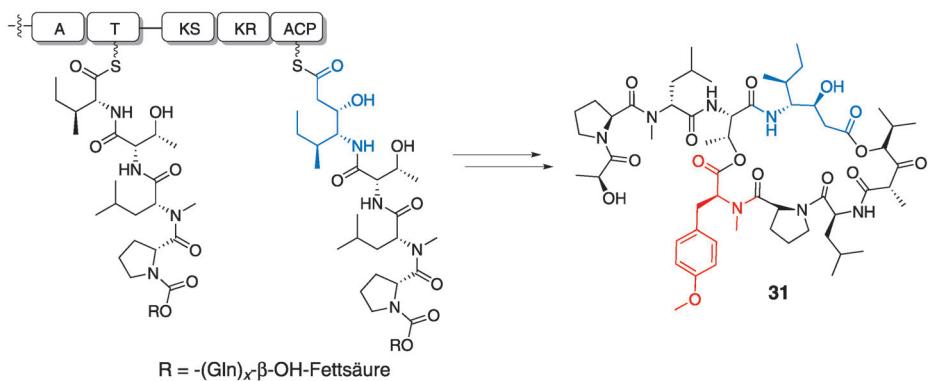
### 6.1. NRPS-PKS-Hybride

Diese Beobachtungen an der Konnektivität der Aminosäuren konnten vollständig erklärt werden, als die Biosynthesecluster für Naturstoffe verfügbar wurden, die Gerüste wie 3-OH-4-NH<sub>2</sub> enthalten, beispielsweise Didemnin B (**31**, Abbildung 16) und Andrimid.<sup>[107,155,156]</sup> Der Didemnin-Cluster codiert ein PKS-Modul, eingestreut zwischen NRPS-Module. In diesem Fall ist das wachsende N-Acyl-Pro-D-MeLeu-Thr-Ile-S-Tetrapeptid als Thioester an den S-Pantetheinyl-Arm der Peptidylcarrierproteindomäne des vierten NRPS-Moduls angehängt. Unmittelbar stromabwärts folgt ein PKS-Modul, das eine Malonyleinheit, ebenfalls in S-Pantetheinylbindung, auf das eigene Acylcarrierprotein überträgt. Die Decarboxylierung des Malonylrests erzeugt das C<sub>2</sub>-Carbanion zum Abfangen des oberhalb liegenden Peptidylthioesters. Der Schritt zur Bildung der C-C-Bindung bewegt den Peptidylrest auf die Einheit mit den beiden Kohlenstoffatomen, sodass aus dem Peptidylaminokohlenstoff das C<sub>3</sub> wird. Das PKS-Modul trägt eine Ketoreduktasedomäne, die die β-Ketogruppe zum β-OH reduziert. Dadurch entsteht der Isostatylrest als ein um eine Ketideinheit verlängerter N-Acylpentapeptidylthioester. Dieses Zwischenprodukt wird dann weiterer Kettenverlängerung durch die abwärts liegenden NRPS-Module unterzogen und unter Ringschluss zum Makrocyclus freigesetzt; der Isostatylrest wird damit in das Gerüst des Makrocyclus eingebettet. Der Mechanismus einer Isostatylbiosynthese ist in Schema 12 A zusammengefasst.

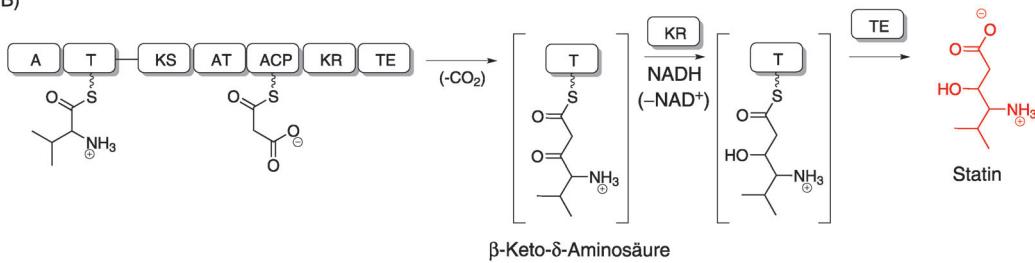
Wenn analog dazu Leu durch ein solches NRPS-PKS-Hybrid aktiviert wird, entsteht als hybrider Baustein mit verlängerter Kette ein Statinrest (Schema 12 B) wie in Miraziridin. Bei der Biosynthese von Andrimid fehlt dem vergleichbaren NRPS-PKS-Paar eine Reduktasedomäne innerhalb des PKS-Moduls, sodass die β-Ketofunktion erhalten bleibt.<sup>[156]</sup> Wenn das kettenverlängerte Zwischenprodukt im Statin-Biosyntheseweg mit seiner β-OH-Gruppe anschließend einer typischen α,β-Dehydratation durch eine Dehydratasedomäne unterworfen würde, wäre das entstehende Produkt Vinylleucin (Schema 12 C). Das analoge Vinylvalin ist bekannt (Abbildung 8). Bei einem analogen Reaktionsstart mit Arg würde bei vergleichbarer Logik in einem NRPS-PKS-Doppelmodul ein Vinyl-Arg für die Miraziridin-Synthesestrecke entstehen (Abbildung 1).<sup>[54]</sup> Ein ähnlich gebildetes Vinyl-Tyr findet sich in Cyclotheonamid.<sup>[157]</sup> Wenn das PKS-Modul dann auch noch eine Enoylreduktase(ER)-Domäne besäße, würde die Vinylgruppe hydriert werden, wodurch die Aminosäure um eine CH<sub>2</sub>COOH-Gruppe verlängert würde. Solche längeren Tyr- und Phe-Analoga finden sich in den Tubulininhibitoren Tubulysin B (**40A**) und E (**40B**, Schema 13 A), wo sie als Tubutyrosin und Tubuphenylalanin bezeichnet werden.<sup>[158]</sup>

Viele PKS-Module verwenden Methylmalonyl-CoA anstelle von Malonyl-CoA zur Kettenverlängerung. So findet man in den Hoiamiden (z.B. in Hoiamid A (**41**), Schema 13 B) ein 4-Amino-3-hydroxy-2,5-dimethylheptanoat, das von einem NRPS-PKS-Hybridmodul aus den Substraten Ile und Methylmalonyl-CoA gebildet wird.<sup>[159]</sup> Natürlich kann es auch mehr als einen PKS-vermittelten Kettenverlängerungs-

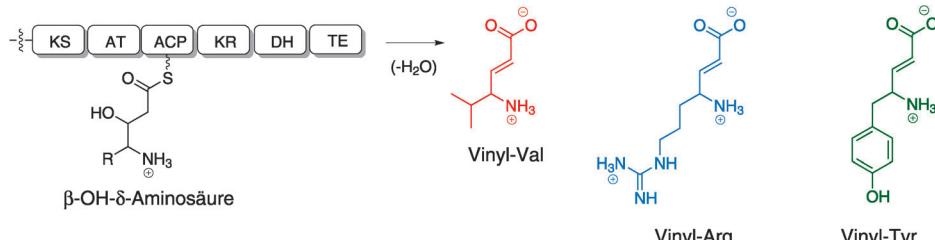
A)



B)



C)



**Schema 12.** Hybride NRPS-PKS-Synthesestrecken. A) Isostatin-Einbau in Didemnin. B) Mechanismus der Statinsynthese. C) Vinyllogische Aminosäure-Biosynthese. Nichtproteinogene Aminosäuren: A) O-Me-Tyr, =Isostatin; B) Statin; C) Vinyl-Val, Vinyl-Arg, Vinyl-Tyr.

zyklus geben, um längere Alkylketten aufzubauen. So geht das 3-Amino-2,5,7,8-tetrahydroxy-10-methylundecanoat in den Pahayokoliden aus Cyanobakterien auf Leucin und drei Malonyl-CoA mit entsprechender Justierung der Redoxzustände zurück.<sup>[160]</sup> Hier wird die β-Aminosäure durch reduktive Aminierung der β-Ketosäure entstehen, die ein Produkt des PKS-Enzymkomplexes ist.

Aber auch das umgekehrte Arrangement von Modulen (also PKS-NRPS) existiert bei den natürlich vorkommenden hybriden Synthesestrecken, beispielsweise beim Rapamycin (**3**, Schema 3). Allerdings bilden diese Konfigurationen normalerweise als Produkt keine Aminosäuren, sondern sie katalysieren die Bildung einer Amidbindung.

## 6.2. Aminosäuren als Produkt von PKS und reduktiver Aminierung

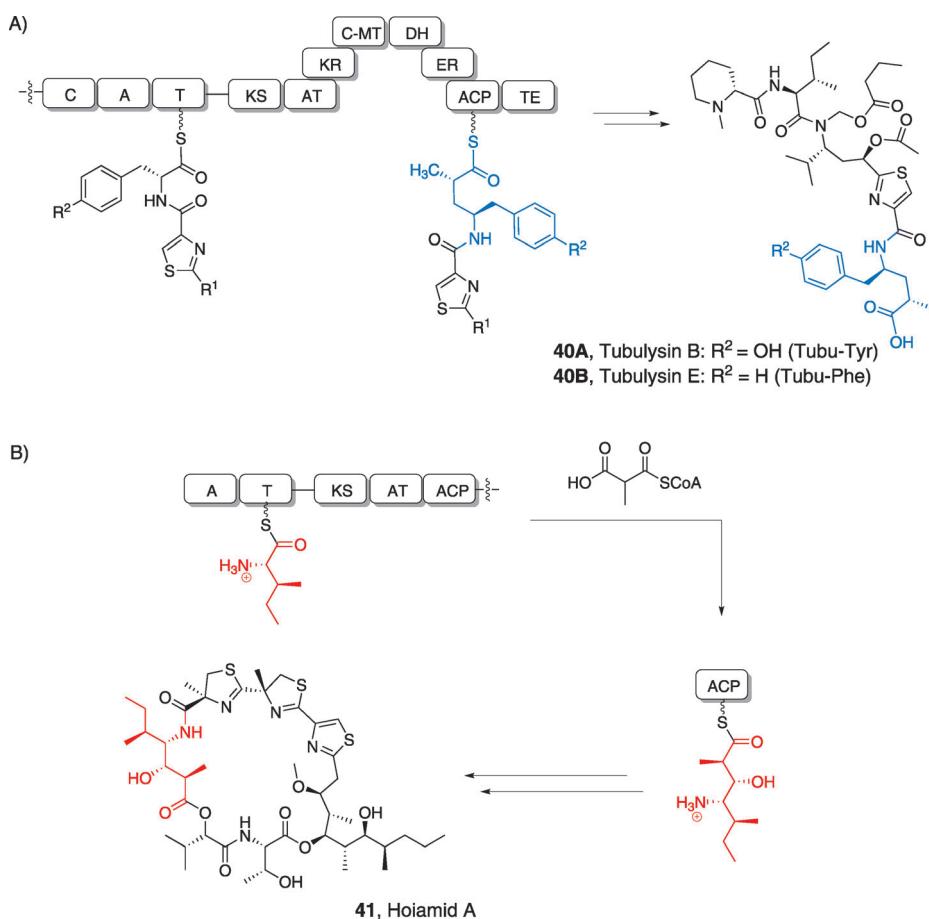
Die nichtproteinogenen Aminosäuren Aeo in den cyclischen tetrapeptidischen HDAC-Hemmstoffen Trapoxin und

in Mycosubtilin (**29**, Abbildung 14) und Iturin werden nach ähnlichen Mechanismen gebildet. In diesem Fall durchläuft ein β-Ketoacyl-CoA aus der Fettsäurebiosynthese eine Transthiolesterierung auf die NRPS-Heptapeptidsyntheselinie und dann eine enzymatische Transaminierung *in situ* als Einleitung zum Aufbau der acylierten Peptidkette.<sup>[86b]</sup> Diese N-terminale β-Aminofettsäuregruppe ist letztlich das Nucleophil im abschließenden Schritt des Mycosubtilin-Aufbaus, um das Heptapeptidyl-Makrolactamgerüst zu erzeugen. Dieser Weg zu den β-Aminosäuren unterscheidet sich von der Einwirkung von Aminosäuremutasen auf α-Aminosäuren wie bei der Umwandlung von α-Phe zu β-Phe durch MIO-haltige Mutasen (siehe Abschnitt 5.1.2).

Das Butenylmethyl-Thr (2S,3R,4R,6E-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-6-octenoat) im immunsupprimierenden Undecapeptid Cyclosporin A (**35**, Abbildung 19) ist eine α- und keine β-Aminosäure, hat aber auch einen PKS-Ursprung (Schema 14B).<sup>[163]</sup> Von dem neun Kohlenstoffen langen Thioester wird wahrscheinlich das CH<sub>2</sub> des Cα oxygeniert und oxidiert und dann durch Hydrolyse und Transaminierung in

HC-Toxin (**23** und **24**, Abbildung 10),<sup>[161]</sup> Adda (3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure) in Microcystin LR (**30**, Abbildung 15)<sup>[162]</sup> und Butenylmethylthreonin in Cyclosporin A (**35**, Abbildung 19)<sup>[100]</sup> tragen noch deutliche Hinweise auf die ursprüngliche PKS-Synthesestrecke. Insbesondere bei Adda findet sich Benzoyl-CoA als Startmolekül, verlängert um drei Methylmalonyl-CoA- und zwei Malonyl-CoA-Einheiten. Die daraus gebildete β-Ketosäure wird transaminiert (Schema 14A).<sup>[79,162]</sup>

Ein ähnlicher Weg und ein vergleichbarer PKS-Komplex kann an der Bildung der Atmu-Einheit (3-Amino-2,5,7,8-tetrahydroxy-10-methylundecanoat) in Pahayokoliden beteiligt sein,<sup>[160]</sup> diesmal mit zusätzlichen Hydroxylierungen an C<sub>2</sub> und C<sub>6</sub>. Die langketigen (C<sub>15-17</sub>) β-Aminosäure-Startereinheiten

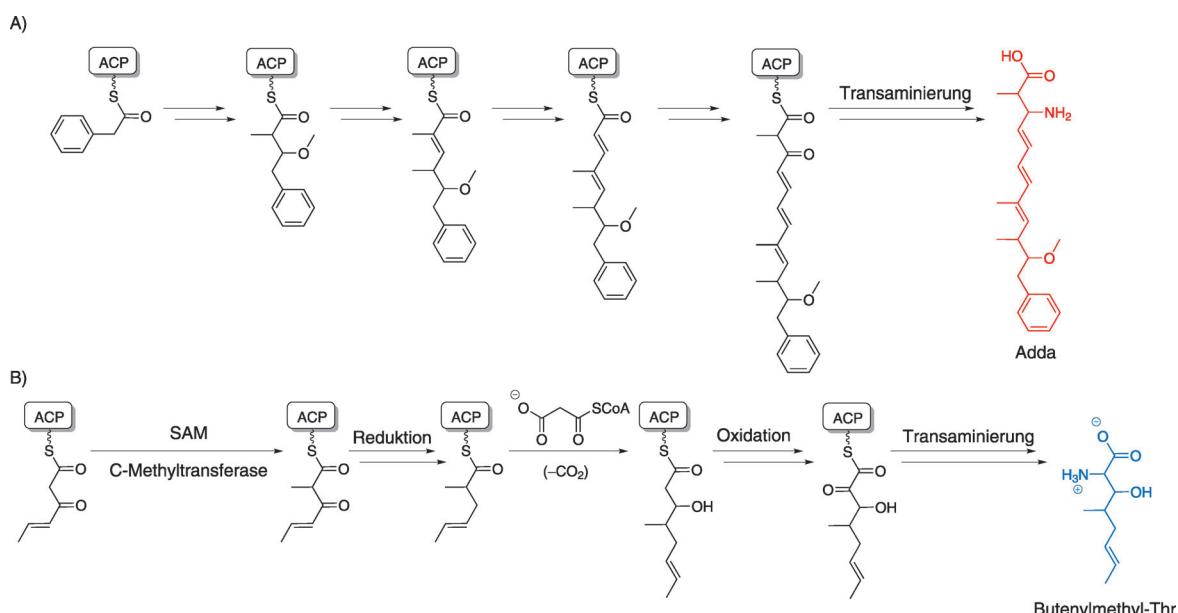


**Schema 13.** Hoiamid und die Tubulysin-Biosynthese. A) Biosynthese von Tubutyrin und Tubuphenylalanin. B) Mechanismus der Biosynthese von 4-Amino-3-hydroxy-2,5-dimethylheptansäure. Nichtproteinogene Aminosäuren: **4-Amino-3-hydroxy-2,5-dimethylheptansäure, Tubu-Tyr oder Tubu-Phe.**

die  $\alpha$ -Aminosäure umgesetzt. Einen analogen Weg stellt man sich für die 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxydecansäure (Aeo) im HC-Toxin und die Trapoxin-Familie der cyclischen Tetrapeptid-Antagonisten der Histondeacetylasen vor (Abbildung 10).<sup>[79]</sup> Das Epoxid stammt vermutlich von einem  $\Delta^9$ -Olefin. Die Aeo-homologe gesättigte 2-Amino-8-oxodecansäure kommt in Apicidin<sup>[164]</sup> und dem 9-OH-Analogen in einer anderen Verbindung aus der Gruppe cyclischer tetrapeptidischer Pilzmetaboliten vor. Dies ist mit der verschiedenartigen Umsetzung der Polyketidvorläufer konsistent.<sup>[165]</sup>

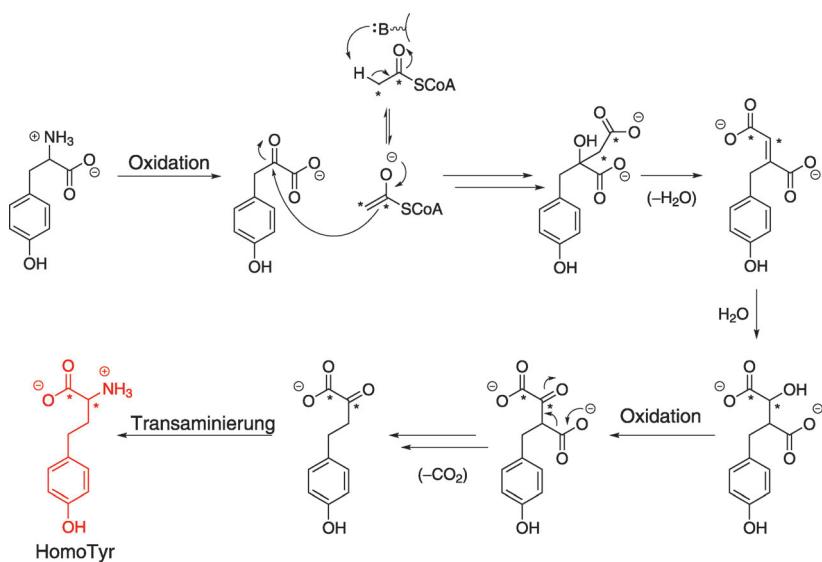
## 7. HomoTyr und andere homologe Aminosäuren

HomoPhe und HomoTyr, bei denen eine zusätzliche Methylenegruppe in die Kette eingefügt ist, entstehen aus den Gerüsten von Phe und Tyr. HomoTyr findet sich in einigen Cyanopeptolinen, 3,4-Dihydroxy-homoTyr kommt in Echinocandinen vor.<sup>[84,166]</sup> Mit frühen Markierungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass das Dihydroxy-homoTyr in den Echinocandinen (z.B. **27**,



**Schema 14.** Biosyntheseweg von Polyketidvorläufern zu Aminosäuren. A) Biosynthese von 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoat (Adda). B) Biosynthese von Butenylmethyl-Thr. Nichtproteinogene Aminosäuren: **Adda, Butenylmethyl-Thr,**

Abbildung 12) aus Tyr und die beiden zusätzlichen Kohlenstoffe aus Acetat stammen. Man vermutet, dass die Carboxylatgruppe des Tyr-Vorläufers verlorengegangen (zwei Kohlenstoffe zugefügt, eines verloren). Als Vorbild für eine solche Homologenbildung mit netto einer zusätzlichen CH<sub>2</sub>-Gruppe dient die Leucin-Biosynthese.<sup>[167]</sup> Analog dazu könnte im HomoTyr das C<sub>2</sub>-Carbanion von Acetyl-CoA an die Ketogruppe von p-OH-Phenylpyruvat (das aus der Transaminierung von Tyr stammt) addieren. Es entsteht ein β-OH-Addukt, das über reversible Dehydratation und Rehydratation zum α-OH-, β-COOH-Addukt mit entgegengesetzter Regioselektivität umgewandelt wird (Schema 15). Die



**Schema 15.** Biosynthese von Homo-Tyr.

Oxidation der Hydroxygruppe zum Keton und die dadurch erleichterte Decarboxylierung des β-Carboxylats ergibt die homologisierte α-Ketosäure. Durch Transaminierung gelangt man zum HomoTyr. Die Dihydroxylierung an C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> zur Vervollständigung des Bausteins, der in den Echinocandinen vorkommt, verläuft wahrscheinlich über eine eisenkatalysierte Oxygenasereaktion. Der analoge Weg ausgehend von Phe und Acetyl-CoA liefert Homo-Phe, das sich in manchen nichtribosomalen Peptiden, darunter den Pahayokoliden, als D-Isomer findet.<sup>[160]</sup>

In der Norvalin-Biosynthese kann p-OH-Phenylpyruvat bei der einleitenden Kondensation mit dem Acetyl-CoA-Carbonanion durch α-Ketobutyrat substituiert werden. Wenn stattdessen α-Keto-β-methylvalerat (aus der Transaminierung von Ile) als Ketosäure mit Acetyl-CoA durch die Isopropylmalatsynthase kondensiert wird, entsteht nach dem abschließenden Transaminierungsschritt Homoisoleucin. Die einfachste nichtproteinogene homologe Aminosäure ist 2-Aminobuttersäure (als Alaninhomologes), die durch Transaminierung von α-Ketobutyrat zugänglich ist.

## 8. Aminosäuren mit potenziell reaktiven funktionellen Gruppen

Proteinogene Aminosäuren enthalten keine reaktiven oder potenziell reaktiven elektrophilen Seitenkettenfunktionen wie Olefine, Aldehyde oder Ketone, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen dieser Gruppen nach ihrem Einbau in Proteine vermieden werden. Andererseits enthalten natürliche nichtproteinogene Aminosäuren einige potenziell reaktive funktionelle Gruppen wie Olefine (und sehr selten Alkine), Epoxide (und sehr selten Aziridine) und noch seltener β-Lactame als acylierende „Gefechtsköpfe“.<sup>[168]</sup>

### 8.1. Olefine und Alkine

α,β-Olefinische Aminosäuren sind Enamine; diese sind nicht stabil, sondern isomerisieren spontan zu Iminen, die dann zu Ammoniak und der Ketosäure hydrolysierten. Man kann eine posttranskriptionale Dehydratation von Ser und Thr in kleinen Proteinen zu den α,β-ungesättigten Amiden (DehydroAla und Dehydrobutyryl, auch in Pahayokoliden) beobachten.<sup>[160,169]</sup> Diese sind zwar kinetisch stabil, sind aber aufgrund der Konjugation mit dem Amid am C<sub>β</sub> elektrophil und können von Nucleophilen angegriffen werden: auf dieser Reaktion beruht die Bildung von Lanthionin- und Methyllanthioninresten vor allem in den Lantipeptiden. In Capreomycin wird das Dehydroalanin weiter mit einer Harnstoffgruppe modifiziert (25, Abbildung 1).

Im Gegensatz dazu sind β,γ-ungesättigte Aminosäuren stabil.<sup>[170]</sup> Die Stammverbindung dieser Kategorie, Vinyl-Gly (42, Abbildung 22 A) ist ein bekannter, natürlich vorkommender Metabolit,<sup>[171]</sup> dessen Biosynthese allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt ist: ein Nebenprodukt von PLP-haltigen γ-eliminierenden Enzymen wäre eine Möglichkeit. Eine verwandte β,γ-ungesättigte Aminosäure ist Dehydrovalin (43, Abbildung 22 A), das in dem hexapeptidischen Mycotoxin Phomopsin A vorkommt.<sup>[172]</sup> Die β-Alkoxy-substituierten Vinylglycine wie Methoxyvinylglycin (44) und Rhizobitoxin (45, Abbildung 22 A) sind als freie Metabolite weniger reaktiv als Vinyl-Gly.<sup>[173,174]</sup> Ist jedoch die OR-Gruppe im aktiven Zentrum von PLP-Enzymen einmal eliminiert, unterliegen sie dem Angriff anderer Nucleophile, einschließlich sauerstoff- und schwefelhaltiger Aminosäureseitenketten im Enzym. Bemerkenswerterweise werden diese Aminosäuren als freie Metaboliten synthetisiert (und nicht an T-Domänen von NRPS-Modulen gebunden).

Die einfachste γ,δ-ungesättigte Aminosäure, Allylglycin (46, Abbildung 22 B), ist ebenfalls ein bekannter Metabolit aus Pilzen, aber sein Biosyntheseweg ist noch unbekannt.<sup>[175,176]</sup> Das Molekül ist stabil, doch das Olefin kann durch die Gruppe von PLP-Enzymen isomerisiert werden, die γ-Eliminierungen und Verdrängungsreaktionen katalysieren. Dadurch entsteht ein mit der Carboxygruppe konjugiertes

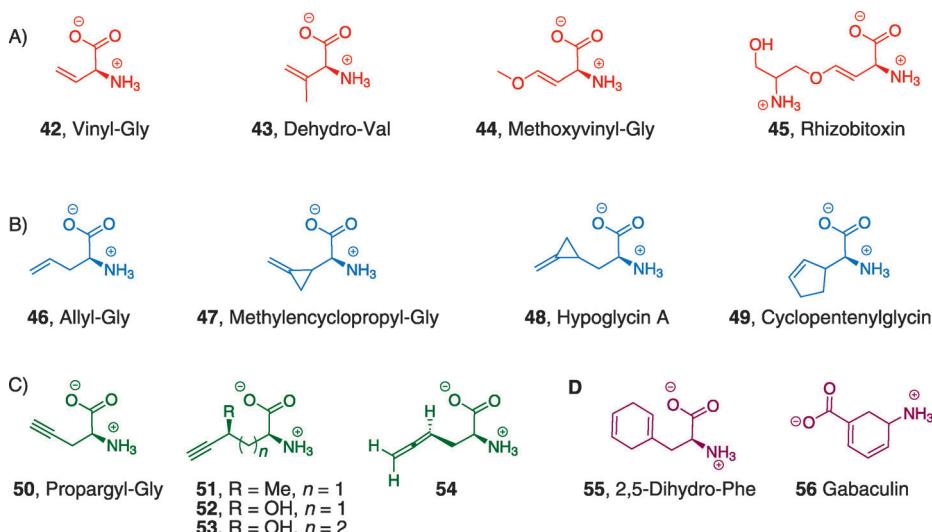


Abbildung 22. Alkin- und alkenhaltige Aminosäuren. A) **β,γ-Olefine**, B) **γ,δ- und δ,ε-Olefine**, C) **Alkine und ein Allen**, D) **Diene**.

System, und die Doppelbindung wird elektrophil.<sup>[177]</sup> Verschiedene andere olefinische Aminosäuren sind aus unterschiedlichen Pflanzen isoliert worden, darunter β,γ-ungesättigtes Methylencyclopentyl-Gly (47) aus den Samen von *Litchi chinensis*,<sup>[178]</sup> die δ,ε-ungesättigte Aminosäure Hypoglycin A (48) aus den Samen von *Blighia sapida*<sup>[179]</sup> und Cyclopentenyl-Gly (49, Abbildung 22B), das in *E. coli* die Verwertung von Isoleucin hemmt.<sup>[180]</sup> Die verwandte Alkinverbindung zu Vinylglycin, L-Propargylglycin (50, Abbildung 22C), hat die gleiche Stabilität und latente Reaktivität mit der gleichen Gruppe von PLP-Enzymen.<sup>[181]</sup> Verschiedene andere natürlich vorkommende alkinhaltige Aminosäuren sind bekannt, wie 2-Amino-4-methyl-5-hexinsäure (51), 2-Amino-4-hydroxy-5-hexinsäure (52) und 2-Amino-4-hydroxy-6-heptinsäure (53, Abbildung 22C), die alle aus dem Samen von *Euphoria longan* isoliert wurden.<sup>[182]</sup> Außerdem wurde aus dem Pilz *Amanita solitaria* eine Aminosäure mit einer Allengruppe (2-Amino-4,5-hexadiensäure (54), Abbildung 22C) isoliert.<sup>[183]</sup>

2,5-Dihydrophenylalanin (55, Abbildung 22D) ist eine andere γ,δ-ungesättigte Aminosäure, die als bakterieller Antimetabolit den Phe-Stoffwechsel stören kann.<sup>[184]</sup> Eine weitere interessante Aminosäure aus der Gruppe natürlicher Diendihydroaminosäuren ist Gabaculin (56, Abbildung 22D).<sup>[185]</sup> Die Biosynthese ist noch nicht aufgeklärt, aber der Reaktionsmechanismus mit einigen PLP-abhängigen Enzymen wurde untersucht.<sup>[186]</sup> Die Bildung des Gabaculin=PLP-Aldimins, gefolgt von der Abspaltung des Ca-H erzeugt ein Zwischenprodukt, das aromatisieren kann und so das PLP-Coenzym als nichthydrolysierbares Aminaddukt blockiert.<sup>[185]</sup>

## 8.2. Epoxide

Während Epoxide in gewissen Terpen- und Polyketidklassen häufig zu finden sind, kommen sie in von Amino-

säuren abgeleiteten Naturstoffen nur relativ selten vor.<sup>[168]</sup> Eine bereits oben erwähnte Aminosäure ist die 2-Amino-8-oxo-9,10-epoxydecansäure (Aeo), die als Bestandteil der HC-Toxin/Trapoxin-klasse cyclischer Tetrapeptide für die kovalente Modifizierung von Histondeacetylasen zuständig ist (Abbildung 10).<sup>[79]</sup> Es ist fast sicher, dass das Epoxid aus dem an die T-Domäne gebundenen 9,10-ungesättigten Vorläufer durch Katalyse einer eisenhaltigen Monooxygenase entsteht, wie dies kürzlich für Dapdiamid C nachgewiesen wurde.<sup>[187]</sup> Wenn sie im aktiven Zentrum ihrer Zielenzyme gebunden sind, benötigen solche Epoxide einen sauren Katalysator, um ein Proton auf den Sauerstoff zu übertragen und so

die Energie des Übergangszustands für die Spaltung der C-O-Bindung zu senken, wenn ein Nucleophil den Kohlenstoff angreift.

## 8.3. Aldehyde und Ketone

Aldehyd- und Ketonfunktionalitäten kommen in Proteinen nicht vor, wie von Schultz et al. in ihren erfolgreichen Versuchen zur Erweiterung des gentischen Codes und zur Einführung ketonhaltiger nichtnatürlicher Aminosäuren in gentechnisch veränderte Proteine ausgeführt wurde.<sup>[33]</sup>

Anderseits sind aldehydragende Aminosäuren zentrale Zwischenprodukte im Stoffwechsel der Aminosäuren Aspartat und Glutamat. Jede der Carboxylgruppen der Seitenketten kann enzymatisch zu Aspartyl-β-phosphat (57) und Glutamyl-γ-phosphat (58, Abbildung 23 A) phosphoryliert werden. Diese werden dann enzymatisch durch Hydridübertragung von Dihydronicotinamid-Cofaktoren reduziert. Asp-

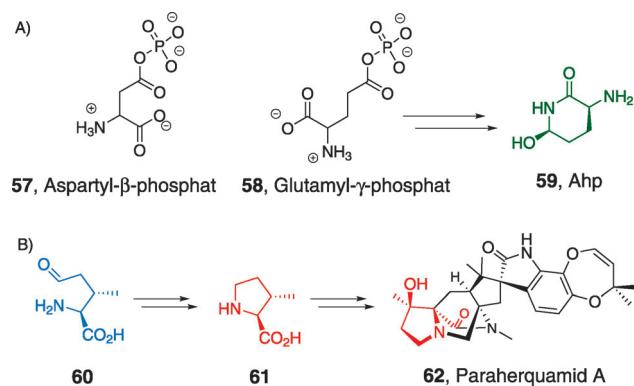
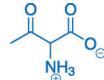
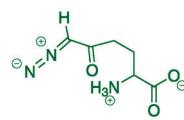
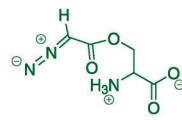
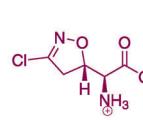


Abbildung 23. Aminosäuren, die über Aldehydzwischenprodukte zugänglich sind. A) Glutamyl- und Aspartylphosphate. B) Biosynthese von Paraherquamicid A. Nichtproteinogene Aminosäuren: **5-Oxo-Ile**, **β-Me-Pro**, **Ahp**.

Aldehyd ist ein Schlüsselmetabolit der mikrobiellen und pilzlichen Biosynthese von Lysin, Methionin, Isoleucin und Threonin.<sup>[167]</sup> Glutamyl- $\gamma$ -halbaldehyd ist das analoge Zwischenprodukt bei der Transaminierung zu Ornithin oder bei der intramolekularen Iminbildung und NADH-abhängigen Reduktion zu Prolin. Eine cyclisierte Form des Glutamyl-halbaldehyds findet man in manchen nichtribosomalen Peptiden, wo sie als Ahp-Rest (3-Amino-6-hydroxypiperidon (**59**), Abbildung 23 A) bezeichnet werden.<sup>[188]</sup> Der Stickstoff des unmittelbar unterhalb liegenden Amids im Peptidrückgrat wirkt als Nucleophil, um die cyclische Halbaminalbindung zu knüpfen, eine Cyclisierung, die die Konformation stark einschränkt. Beispiele für solche Naturstoffe sind Stigonemapeptin,<sup>[188]</sup> Symplocamid<sup>[189]</sup> und Cyanopeptolin.<sup>[190]</sup>

Im Gegensatz zur Reduktion von Säuregruppen zu Aldehyden bei Asp und Glu wird im Ile das terminale  $\delta$ -CH<sub>3</sub> zum entsprechenden Aldehyd (5-Oxo-Ile, **60**) oxidiert, vermutlich über den Alkohol als Zwischenstufe. Beide Reaktionen laufen an der freien Aminosäure während der Bildung von  $\beta$ -MethylPro (**61**) ab, das dann in Paraherquamid A eingebaut wird (**62**, Abbildung 23 B).<sup>[191]</sup> Ein ähnlicher Rest ist auch in den Peptidmakrocyclus GE37468 eingebaut, um dort das  $\beta$ -Methyl- $\delta$ -OH-prolin beizusteuern.<sup>[192]</sup> Cysteine in einigen Proteinen wie Sulfatasen können posttranslational in der Seitenkette zum Aldehyd oxidiert werden; dabei entsteht Formylglycin (**63**, Abbildung 24), das als Elektrophil an der Hydrolyse von Sulfatresten als Substraten beteiligt ist.<sup>[118]</sup> Diese einzelnen Formylglycine können durch externe Nucleophile abgefangen werden, um ortsspezifisch modifizierte Proteine herzustellen.

**63**, Formyl-Gly**64**, 2-Amino-3-ketobutyrat**65**, 6-Diazo-5-oxonorleucin**66**, Azaserin**67**, Acivicin

**Abbildung 24.** Aldehyde, Imine, Ketone und Diazogruppen enthaltende Aminosäuren. Nichtproteinogene Aminosäuren: **Formyl-Gly**, **2-Amino-3-ketobutyrat**,  **$\alpha$ -Diazoketon** oder  **$\alpha$ -Diazoester**, **Acivicin**.

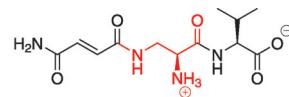
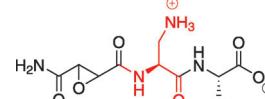
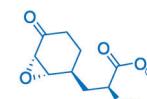
Ketone sind thermodynamisch stabile Carbonyle als Aldehyde. Es gibt einige wenige Beispiele ketontragender nichtproteinogener Aminosäuren. Am bekanntesten ist 2-Amino-3-ketobutyrat (**64**, Abbildung 24), das durch enzymatische Oxidation der Seitenkettenhydroxygruppe von L-Threonin entsteht.<sup>[193]</sup> Diese vier Kohlenstoffe umfassende  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -ketosäure unterliegt in Gegenwart von CoA-SH als Cosubstrat einer Retroaldolspaltung zu Acetyl-CoA aus C<sub>3,4</sub> und Glycin aus C<sub>1,2</sub>. Diese Retroaldolfragmentierung bliebe eine fortwährende, vermutlich jedoch meist unbemerkte Veränderung, wenn 2-Amino-3-ketoaminosäuren in Proteine eingebaut würden.

6-Diazo-5-oxonorleucin (DON, **65**, Abbildung 24) trägt ein Diazomethylketon in seinem kompakten Gerüst.<sup>[194]</sup> Seine Biosynthese wurde noch nicht aufgeklärt, obwohl die Substanz bereits vor 60 Jahren isoliert wurde. Ein verwandter  $\alpha$ -Diazoester, Azaserin (**66**, Abbildung 24), kommt ebenfalls natürlich vor und hat tumorhemmende und antibiotische Eigenschaften.<sup>[194,195]</sup> Die Diazoketogruppe verliert bei Angriff eines Nucleophils Distickstoff (N<sub>2</sub>), sodass ein molekularbiologisch hergestelltes tRNA/tRNA-Synthasepaar für DON wegen der selektiven Reaktivität hilfreich sein könnte.

Die cyclische Aminosäure Acivicin (**67**, Abbildung 24) ist ein anderes Beispiel für ein heterocyclisches Elektrophil, das Glutaminreste nachahmt.<sup>[196]</sup> Seine Biosynthese ist unbekannt.

#### 8.4. $\alpha,\beta$ -Ungesättigte Amide, Epoxyamide und Epoxyketone

Wenn Olefine in  $\alpha,\beta$ -Stellung zu Carbonylgruppen liegen, werden sie als Elektrophile für eine Michael-Addition aktiviert. Wir erwähnten das Vinylvalin in Syringolin (**20**, Abbildung 8) als reaktive Stelle für die kovalente Modifikation des Proteasoms.<sup>[197]</sup> Ein anderes Beispiel stammt aus der Dapdiamid-Antibiotikafamilie. Hier trägt die nichtproteinogene Aminosäure L-2,3-DAP eine Fumaramoylgruppe an der  $\beta$ -Aminofunktion.<sup>[198]</sup> Wenn Dapdiamid A (**68**, Abbildung 25)

**68**, Dapdiamid A**69**, Dapdiamid E**70**, Anticapsin

**Abbildung 25.** Dapdiamide und Anticapsin. Nichtproteinogene Aminosäuren: **L-2,3-DAP**, **Anticapsin**.

an das aktiven Zentrum der Glutaminasedomäne einer bakteriellen Glucosamin-6-P-synthase bindet, ahmt das Fumaramoyl-DAP ein „gestrecktes“ Glutamin nach, dessen elektrophile Gruppe das Cys im aktiven Zentrum des Enzyms kovalent inaktivieren kann.<sup>[199]</sup> In diesem Fall wird die konjugierte olefinische Gruppe nicht de novo in der Aminosäure erzeugt, sondern durch eine enzymatische Acylierung (eines DAP-Val-Dipeptidzwischenprodukts) mit Fumarat eingebracht und dann von Fumaryl- zu Fumaramoyl-DAP umgewandelt (Abbildung 25).

Bei einigen Mitgliedern der bereits erwähnten Dapdiamid-Antibiotikafamilie wie Dapdiamid E (**69**, Abbildung 25) ist die Fumaramoylgruppe durch ein einkerniges Eisenenzym zur Epoxysuccinamoylgruppe umgewandelt worden. Das Epoxysuccinamoyl-DAP stellt dabei ein Glutaminanalogen dar, das wiederum das Cys-Thiolat im aktiven

Zentrum der Glutaminasedomäne der Glucosamin-6-P-Synthase bindet und inaktiviert.<sup>[187]</sup>

Eine andere Aminosäure mit einer Epoxycarbonyl-Seitenkette ist Anticapsin (**70**, Abbildung 25), der „Gefechtskopf“ in Bacilysin.<sup>[200]</sup> Die Ketogruppe stammt letztlich von der 7-OH-Gruppe der Prephenäsäure durch enzymatische Oxidation in einem späten Stadium der Abzweigung von Prephenat zu Anticapsin.<sup>[201]</sup> Ähnlich wie Dapdiamid E kann die Epoxycyclohexanon-Seitenkette das gleiche Cystein im aktiven Zentrum von Glucosamin-6-P-Synthase blockieren.<sup>[202]</sup>

## 9. Herausforderungen und Möglichkeiten für den Einsatz nichtproteinogener Aminosäuren als Proteinbausteine

In diesem Aufsatz haben wir dem Leser eine breite Spanne von nichtproteinogenen Aminosäuren vorgestellt. Ein Teil von ihnen kann einfach als freie Bausteine biosynthetisiert werden und steht für eine Verwertung durch Protein-Engineering zur Verfügung. Für die Nutzung einiger der anderen Aminosäuren lassen sich jedoch mögliche Schwierigkeiten auf verschiedenen Ebenen erwarten. Dazu seien fünf Beispiele genannt. Das olefinische Allylglycin (**46**, Abbildung 22 B) und das alkinhaltige Propargylglycin (**50**, Abbildung 22 C) und verwandte Verbindungen könnten als bio-orthogonale reaktive funktionelle Gruppen in Proteinen nützlich sein, ähnlich die Diazoketon-Aminosäuren DON (**65**, Abbildung 24) und Azaserin (**66**, Abbildung 24), die, wie auch Aziridindicarboxylat (Abbildung 1), spezifische Reaktionseigenschaften haben. Eine dritte Gruppe ungewöhnlicher Bausteine wird durch  $\beta$ -Oxy- $\gamma$ -aminodolaisoleucin repräsentiert.<sup>[153]</sup>

Die erste Ebene der Herausforderungen ist, ob die Biosynthesegene des Produktionsorganismus bekannt sind. Dies ist bei keinem der genannten Bausteine gegenwärtig der Fall. Dieses Problem lässt sich bei dem DON-Produzenten *Streptomyces ambofaciens* vermutlich einfach lösen, denn der Organismus ist seit Jahrzehnten bekannt und sein Genom könnte einfach sequenziert werden, obwohl noch nicht ganz klar ist, nach welcher Art von codierten Enzymen bioinformatisch gesucht werden soll.<sup>[194]</sup> Demgegenüber stammt der Produzent von Dolastatin 10 aus *Symploca sp.* V642 in einer komplexen bakteriellen Mischkultur, die mit dem Seehasen *Dolabella auricularia* vergesellschaftet ist. Die Identifizierung der Gene ist daher wesentlich schwieriger.<sup>[203]</sup> Allylglycin (**46**, Abbildung 22 B) und 2-Amino-4,5-hexadienonsäure (**54**, Abbildung 22 C) schließlich sind Metaboliten von Pilzen, deren Genome noch nicht sequenziert sind und wo nicht klar ist, wie die Biosynthesecluster aussehen.<sup>[175, 176, 183]</sup>

Die nächste Ebene ist, den Enzymen, die in einem gefundenen Gencluster codiert sind, eine Funktion zuzuordnen, sodass die notwendigen und hinreichenden Gene für die Bildung des Aminosäurebausteins in einen anderen Produktionsorganismus kloniert werden können. Verbunden damit ist die Aufgabe, die chemische Logik und die Zahl der proteinvermittelten Schritte aufzuklären, die für die Synthese der neuen Aminosäure notwendig sind. Eine Schlussfolgerung

daraus muss auch sein, ob der Stoffwechselweg eine freie Aminosäure liefert oder bei einer Verbindung endet, die an eine NRPS-Domäne oder eine PKS-Thiolcarrierdomäne gebunden ist. In diesem Falle muss man noch eine Thioesterase finden und in die NRPS/PKS-Gene integrieren, um die Aminosäure freizusetzen.

Die dritte Ebene umfasst die Konstruktion eines orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthasepaars, um den spezifischen nichtproteinogenen Aminosäurebaustein zu erkennen und zu aktivieren. Dies gelang bei vielen  $\alpha$ -Aminosäuren während der letzten zehn Jahre, doch werden sich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren wahrscheinlich für eine solche Entwicklung als deutlich schwieriger erweisen. Sie werden auch Probleme bei der Ligation durch die Peptidyltransferasenzentren des Ribosoms verursachen. Andererseits haben wir bereits früher in diesem Aufsatz darauf hingewiesen, dass zumindest einige aliphatische N-Methyl-, nicht aber N-Ethyl-Aminosäuren von ribosomalen Proteinen ligiert werden können.

Ungeachtet dieser möglichen Hindernisse sind Aminosäuren zentrale und vielseitige Bausteine in der Chemie des Lebens, und der Aminosäurestoffwechsel in Mikroorganismen geht weit über die bekannten 20–22 proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren hinaus. Auch wenn kein einzelner Organismus die gesamte Biosynthesekapazität besitzt, kann die Gesamtheit der bekannten natürlich vorkommenden nichtproteinogenen Aminosäuren bis zu 20-mal größer sein als die proteinogene Gruppe. Viele dieser Aminosäuren kommen nur im Sekundärstoffwechsel oder in konditionalen Synthesewegen vor, doch gibt es auch andere wie Ornithin, Homoserin und Aminolävulinsäure, die zentrale Positionen im Primärstoffwechsel einnehmen. Die enzymatischen Wege von proteinogenen zu nichtproteinogenen Aminosäuren sind oft kurz und effizient was die Zahl der Reaktionsschritte und die Atomökonomie betrifft. Die Gene, die solche Umwandlungen codieren, sind fast immer geclustert und bieten so einen geradlinigen Weg, um spezifische Modifizierungen von Stoffwechselwegen zwischen Mikroorganismen auszutauschen.

Frei vorkommende nichtproteinogene Aminosäuren sind schon lange wegen ihrer antimetabolen Eigenschaften bekannt. Entdeckt werden sie meist aufgrund der Reaktivität gegenüber der katalytischen Wirkung der Zielenzyme. Führt man sie regiospezifisch in biogene Peptide und Proteine ein, kann es möglich werden, eine neue Ära der Medizinalchemie an der Grenze zwischen kleinen und großen Wirkstoffen einzuleiten. Außerdem eröffnet die ortsspezifische Funktionalisierung von Proteinen besonders attraktive Strategien für die posttranskriptionale Proteinmodifizierung.<sup>[4]</sup> Und schließlich bieten auch viele der Aminosäuren, die von der Natur nicht für den Einbau in Proteine ausgewählt wurden, reiche architektonische Möglichkeiten bei Einführung in ribosomal hergestellte Polypeptide.

*Diese Arbeiten wurden von den National Institutes of Health gefördert (Aktenzeichen GM20011 und GM49338 für C.T.W. und GM087934 für C.K.).*

Eingegangen am 17. Oktober 2012  
Online veröffentlicht am 31. Mai 2013  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] a) I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 827–839; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 816–828; b) eine Online-Datenbank nichtproteinogener Aminosäuren (Norine), findet sich unter <http://bioinfo.lifl.fr/norine/>.
- [2] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [3] C. T. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 4–10.
- [4] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [5] J. A. Johnson, Y. Y. Lu, J. A. Van Deventer, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 774–780.
- [6] a) C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; b) E. S. Sattely, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757–793.
- [7] T. Schweicke, J. F. Aparicio, I. Molnár, A. König, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortés, J. B. Lester, G. A. Böhm, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7839–7843.
- [8] C. Barreiro, C. Priteo, A. Sola-Landa, E. Solera, M. Martínez-Castro, R. Pérez-Redondo, C. García-Estrada, J. F. Aparicio, L. T. Fernández-Martínez, J. Santos-Aberturas, Z. Salehi-Najafabadi, A. Rodriguez-García, A. Tauch, J. F. Martin, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 3756–3757.
- [9] X. Qu, N. Jiang, F. Xu, L. Shao, G. Tang, B. Wilkinson, W. Liu, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 852–861.
- [10] I. Molnár, T. Schupp, M. Ono, R. Zirkle, M. Milnamow, B. Nowak-Thompson, N. Engel, C. Toupet, A. Stratmann, D. D. Cyr, J. Gorlach, J. M. Mayo, A. Hu, S. Goff, J. Schmid, J. M. Ligon, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 97–109.
- [11] L. Tang, S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, B. Julien, *Science* **2000**, *287*, 640–642.
- [12] J. J. Burbaum, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 16965–16968.
- [13] M. Mocibob, N. Ivic, S. Bilokapic, T. Maier, M. Luic, N. Ban, I. Weygand-Durasevic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14585–14590.
- [14] M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617–650.
- [15] T. Stachelhaus, A. Hüser, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 913–921.
- [16] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936.
- [17] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496.
- [18] H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6843–6850.
- [19] L. Du, B. Shen, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2001**, *4*, 215–228.
- [20] H. Chen, S. O'Connor, D. E. Cane, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 899–912.
- [21] G. J. Gatto, Jr., S. M. McLoughlin, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5993–6002.
- [22] S. E. O'Connor, H. Chen, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2002**, *41*, 5685–5694.
- [23] L. Du, C. Sánchez, M. Chen, D. J. Edwards, B. Shen, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 623–642.
- [24] B. A. Pfeifer, C. C. C. Wang, C. T. Walsh, C. Khosla, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6698–6702.
- [25] C. Khosla, S. Kapur, D. E. Cane, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 135–143.
- [26] M. Stricker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–240.
- [27] Y. Mast, T. Weber, M. Götz, R. Ort-Winklbauer, A. Gondran, W. Wohlleben, E. Schinko, *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 192–206.
- [28] J. He, N. Magarvey, M. Pirae, L. C. Vining, *Microbiology* **2001**, *147*, 2817–2829.
- [29] V. Blanc, P. Gil, N. Bamas-Jacques, S. Lorenzon, M. Zagorec, J. Schleuniger, D. Bischof, F. Blanche, L. Debussche, J. Crouzet, D. Thibaut, *Mol. Microbiol.* **1997**, *23*, 191–202.
- [30] Y. J. Mast, W. Wohlleben, E. Schinko, *J. Biotechnol.* **2011**, *155*, 63–67.
- [31] J. M. Green, B. P. Nichols, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12971–12975.
- [32] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935–939.
- [33] T. S. Young, P. G. Schultz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11039–11044.
- [34] F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. E. O'Connor, C. T. Walsh, *Nature* **2005**, *436*, 1191–1194.
- [35] J. P. Shaw, G. A. Petsko, D. Ringe, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1329–1342.
- [36] P. K. Mehta, P. Christen, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2000**, *74*, 129–184.
- [37] D. Krug, R. Müller, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 741–750.
- [38] S. D. Christenson, W. Wu, M. A. Spies, B. Shen, M. D. Toney, *Biochemistry* **2003**, *42*, 12708–12718.
- [39] R. D. Süßmuth, W. Wohlleben, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 344–350.
- [40] O. Puk, D. Bischoff, C. Kittel, S. Pelzer, S. Weist, E. Stegmann, R. D. Süßmuth, W. Wohlleben, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6093–6100.
- [41] F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3364–3378.
- [42] B. K. Hubbard, M. G. Thomas, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 931–942.
- [43] F. Ningsih, S. Kitani, E. Fukushima, T. Nihira, *Microbiology* **2011**, *157*, 3213–3220.
- [44] Bildung von 2,3-Diaminopropionat in der Zwittermycin-Biosynthese: B. M. Kevany, D. A. Rasko, M. G. Thomas, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1144–1155.
- [45] C. Müller, S. Nolden, P. Gebhardt, E. Heinzelmann, C. Lange, O. Puk, K. Welzel, W. Wohlleben, D. Schwartz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1028–1037.
- [46] C. S. Vandenende, M. Vlasschaert, S. Y. K. Seah, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5596–5602.
- [47] a) T. G. Kinscherf, R. H. Coleman, T. M. Barta, D. K. Willis, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4124; b) R. D. Durbin, T. F. Uchytil, J. A. Steele, L. D. Ribeiro, *Phytochemistry* **1978**, *17*, 147–148.
- [48] X. Yin, T. M. Zabriskie, *Microbiology* **2006**, *152*, 2969–2983.
- [49] J. J. Barkei, B. M. Kevany, E. A. Felnagle, M. G. Thomas, *ChemBioChem* **2010**, *10*, 366–376.
- [50] J. N. Steenbergen, J. Alder, G. M. Thorne, F. P. Tally, *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 283–288.
- [51] I. Höfer, M. Crüsemann, M. Radzom, B. Geers, D. Flachschaar, X. Cai, A. Zeeck, J. Piel, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 381–391.
- [52] J.-H. Ahn, J. D. Walton, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, *10*, 207–214.
- [53] Biosynthese der Statin enthaltenden Thialandepsine E und B (auch Burkholdac B genannt): a) C. Wang, C. J. Flemming, Y.-Q. Cheng, *MedChemComm* **2012**, *3*, 976–981; b) C. Wang, L. M. Henkes, L. B. Doughty, M. He, D. Wang, F.-J. Meyer-Almes, Y.-Q. Cheng, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2031–2038; c) J. B. Biggins, C. D. Gleber, S. F. Brady, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1536–1539.
- [54] Mirazidin ist der einzige bekannte Naturstoff, der ein vinyloges Arginin enthält. Jamaicamide enthalten ein Methylpyrrolinon, das sich von vinylogem Alanin ableitet, siehe: a) D. J. Edwards, B. L. Marquez, L. M. Nogle, K. McPhail, D. E. Goeger, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 817–833. Cyclotheonamide enthalten vinyloges Tyrosin, siehe: b) N. Fuse-

- tani, S. Matsunaga, H. Matsumoto, Y. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053–7054. Das vinyloge Alanin der Jamaicamide wird in einer hybriden NRPS-PKS-Synthesestrecke gebildet; vinyloges Arginin und vinyloges Tyrosin werden vermutlich auf analogem Wege synthetisiert.
- [55] Y. Nakao, M. Fujita, K. Warabi, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462–1043.
- [56] Untersuchungen zur Biosynthese von Aba: a) O. K. Sebek, H. A. Barker, *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 2094–2098; b) Z. Tokarski, H. E. Klei, C. M. Berg, *Biotechnol. Lett.* **1988**, *10*, 7–10; c) I. G. Fotheringham, N. Grinter, D. P. Pantaleone, R. F. Senkpiel, P. P. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2209–2213.
- [57] a) Azd wurde erstmals aus *Streptomyces sp.* MD398-A1, isoliert: H. Naganawa, N. Usui, T. Takita, M. Hamada, H. Umeyama, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 828–829; b) Miraziridin hemmt Serinproteasen, und diese Aktivität wird dem Aziridinrest zugeschrieben: N. Schaschke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 855–857.
- [58] Andere aziridinhaltige Naturstoffe, darunter Azicemicin (ein Aziridin enthaltendes Polyketid aus *Kibdelosporangium sp.* MJ126-NF4, welches antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien entfaltet), Acinomycin, Mitomycin und Ficellomycin: a) T. Tsuji, H. Iinuma, N. Kinoshita, T. Ikeda, R. Sawa, Y. Takahashi, H. Nagawana, T. Sawa, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1772–1773; und b) Y. Ogasawara, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18066–18068 und zit. Lit. Siehe Hintergrundinformationen, Scheme S24.
- [59] Zum Einsatz synthetischer Derivate von Azd als Proteaseinhibitoren: a) A. Ponte-Sucré, R. Vicik, M. Schultheis, T. Schirmeister, H. Moll, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2439–2447; b) T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 560–572; c) T. Schirmeister, M. Peric, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1281–1291; d) R. Vicik, V. Hoerr, M. Glaser, M. Schultheis, E. Hansell, J. H. McKerrow, U. Holzgrabe, C. R. Caffrey, A. Ponte-Sucré, H. Moll, A. Stich, T. Schirmeister, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2753–2757.
- [60] Y. V. G. Schlippe, M. C. T. Hartman, K. Josephson, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10469–10477.
- [61] H. Shimamura, H. Gouda, K. Nagai, T. Hirose, M. Ichioka, Y. Furuya, Y. Kobayashi, S. Hirono, T. Sunazuka, S. Omura, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 932–935; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 914–917.
- [62] a) F. Kopp, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 735–749; b) J. W. Trauger, R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Nature* **2000**, *407*, 215–218; c) R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature* **2002**, *418*, 658–661.
- [63] a) D. R. Storm, K. S. Rosenthal, P. E. Swanson, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 723–763; b) M. Shaheen, J. Li, A. C. Ross, J. C. Vederas, S. E. Jensen, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1640–1648.
- [64] R. Krishnamoorthy, L. D. Vazquez-Serrano, J. A. Turk, J. A. Kowalski, A. G. Benson, N. T. Breaux, M. A. Lipton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15392–15393.
- [65] Übersichtsartikel über marine cyclische Depsipteptide: a) G. S. B. Andavan, R. Lemmens-Gruber, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 810–834; es gibt andere Naturstoffe, die β-Methoxy-Tyr enthalten, z.B. Mirabamid C: b) A. Plaza, E. Gustchina, H. L. Baker, M. Kelly, C. A. Bewley, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1753–1760; oder Neamphamid A: c) N. Oku, K. R. Gustafson, L. K. Cartner, J. A. Wilson, N. Shigematsu, S. Hess, L. K. Pannell, M. R. Boyd, J. B. McMahon, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1407–1411.
- [66] V. Miao, M.-F. Coëffet-LeGal, P. Brian, R. Brost, J. Penn, A. Whiting, S. Martin, R. Ford, I. Parr, M. Bouchard, C. J. Silva, S. K. Wrigley, R. H. Baltz, *Microbiology* **2005**, *151*, 1507–1523.
- [67] a) I. G. O'Brien, G. B. Cox, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *201*, 453–460; b) K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3584–3588.
- [68] D. G. Fujimori, S. Hrvatin, C. S. Neumann, M. Stricker, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16498–16503.
- [69] a) M. S. Yeh, Y. H. Wei, J. S. Chang, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1329–1334; b) F. Peypoux, J. M. Bonmatin, J. Wallach, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 553–563.
- [70] U. Wäspi, D. Blanc, T. Winkler, P. Rüedi, R. Dudler, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 727–733.
- [71] H. Amrein, S. Makart, J. Granado, R. Shakya, J. Schneider-Pokorny, R. Dudler, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2004**, *17*, 90–97.
- [72] a) M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, *452*, 755–758; b) B. Schellenberg, L. Bigler, R. Dudler, *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 1640–1650.
- [73] M. V. R. Reddy, M. K. Harper, D. J. Faulkner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10649–10656.
- [74] P. A. Smith, T. C. Roberts, F. E. Romesberg, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1223–1231.
- [75] T. C. Roberts, P. A. Smith, F. E. Romesberg, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 956–961.
- [76] Eine verwandte oxidative phenolische Kupplung in der Biosynthese von Teicoplanin und Vancomycin: P. F. Widboom, S. D. Bruner, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1757–1764.
- [77] M. Ito, M. Yamanaka, N. Kutsumura, S. Nishiyama, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7949–7952.
- [78] M. Kijima, M. Yoshida, K. Sugita, S. Horinouchi, T. Beppu, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22429–22435.
- [79] J. Walton, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1406–1413.
- [80] M. Yoshida, S. Horinouchi, T. Beppu, *Bioessays* **1995**, *17*, 423–430.
- [81] T. Yamada, Y. Mizuguchi, K. H. Nierhaus, H. G. Wittmann, *Nature* **1978**, *275*, 460–461.
- [82] M. Stricker, E. M. Nolan, C. T. Walsh, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13523–13530.
- [83] C. Keller-Juslén, M. Kuhn, H. R. Loosli, T. J. Pitcher, H. P. Weber, A. von Wartburg, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 4147–4150.
- [84] Biosynthese von 3-Hydroxy-4-methylprolin: a) A. A. Adefarati, R. A. Giacobbe, O. D. Hensens, J. S. Tkacz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3542–3545; b) A. A. Adefarati, O. D. Hensens, E. T. T. Jones, J. S. Tkacz, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1953–1957; c) M. Schönewolf, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 211–213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 183–185.
- [85] E. Rössner, A. Zeeck, W. A. König, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 84–85; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 64–65.
- [86] a) E. H. Duitman, L. W. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leenders, J. Vater, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13294–13299; b) D. B. Hansen, S. B. Bumpus, Z. D. Aron, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6366–6367.
- [87] R. A. Dixon, I. Chopra, *J. Antimicrob. Chemother.* **1986**, *18*, 557–563.
- [88] J. C. Kehr, D. Gatte Picchi, E. Dittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1622–1635.
- [89] H. Fujiki, M. Suganuma, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 4–18.
- [90] K. L. Rinehart, Jr., J. B. Gloer, J. C. Cook, Jr., S. A. Mizzak, T. A. Scahill, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1857–1859.
- [91] a) D. W. Montgomery, C. F. Zukoski, *Transplantation* **1985**, *40*, 49–56; b) B. V. SirDeshpande, P. L. Toogood, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9177–9184.
- [92] 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.

- [93] D. B. Li, K. Woithe, N. Geib, K. Abou-Hadeed, K. Zerbe, J. A. Robinson, *Methods Enzymol.* **2009**, *458*, 487–509.
- [94] B. Hadatsch, D. Butz, T. Schmiederer, J. Steudle, W. Wohlleben, R. Süssmuth, E. Stegmann, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1078–1089.
- [95] E. Stegmann, S. Pelzer, D. Bischoff, O. Puk, S. Stockert, D. Butz, K. Zerbe, J. Robinson, R. D. Süssmuth, W. Wohlleben, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 640–653.
- [96] B. I. Eisenstein, F. B. Oleson, Jr., R. H. Baltz, *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, S10–15.
- [97] L. Robbel, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27501–27508.
- [98] T. Schneider, K. Gries, M. Josten, I. Wiedemann, S. Pelzer, H. Labischinski, H. G. Sahl, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1610–1618.
- [99] a) G. Weber, E. Leitner, *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 461–467; b) A. Laupacis, P. A. Keown, R. A. Ulan, N. McKenzie, C. R. Stiller, *Can. Med. Assoc. J.* **1982**, *126*, 1041–1046.
- [100] M. Offenbacher, G. Santer, K. Totschnig, Z. Su, H. Moser, R. Traber, E. Schneider-Scherzer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8401–8412.
- [101] D. F. Farver, D. D. Hedge, S. C. Lee, *Ann. Pharmacother.* **2005**, *39*, 863–868.
- [102] a) P. Cudic, J. K. Kranz, D. C. Behenna, R. G. Kruger, H. Tadesse, A. J. Wand, Y. I. Veklich, J. W. Weisel, D. G. McCafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7384–7379; b) X. Fang, K. Tiyanont, Y. Zhang, J. Wanner, D. Boger, S. Walker, *Mol. BioSyst.* **2006**, *2*, 69–76.
- [103] C. Khosla, Y. Tang, A. Y. Chen, N. A. Schnarr, D. E. Cane, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 195–221.
- [104] L.-H. Zhang, J. O. Liu, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 5611–5618.
- [105] C. L. Bender, F. Alarcón-Chaidez, D. C. Gross, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 266–292.
- [106] E. R. Strieter, A. Koglin, Z. D. Aron, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2113–2115.
- [107] A. Fredenhagen, S. Y. Tamura, P. T. M. Kenny, H. Komura, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Nishiyama, M. Sugiura, H. Kita, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4409–4411.
- [108] Y. Chen, M. Yin, G. P. Horsman, B. Shen, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 420–424.
- [109] M. E. Tanner, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 237–246.
- [110] K. Kino, M. Sato, M. Yoneyama, K. Kirimura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1299–1305.
- [111] Y. H. Lim, K. Yokoigawa, N. Esaki, K. Soda, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 4213–4217.
- [112] T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5775–5787.
- [113] S. L. Clugston, S. A. Sieber, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2003**, *42*, 12095–12104.
- [114] C. J. Balibar, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1189–1200.
- [115] D. B. Stein, U. Linne, M. A. Marahiel, *FEBS J.* **2005**, *272*, 4506–4520.
- [116] B. Wu, W. Szymbański, G. G. Wybenga, M. M. Heberling, S. Bartsch, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, B. W. Dijkstra, D. B. Janssen, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 497–501; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 482–486.
- [117] B. Wu, W. Szymbański, M. M. Heberling, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 352–362.
- [118] *Posttranslational Modification of Proteins* (Hrsg.: C. T. Walsh), Roberts, Colorado, **2006**.
- [119] C. Mahlert, F. Kopp, J. Thirlway, J. Micklefield, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12011–12018.
- [120] T. Hamada, S. Matsunaga, G. Yano, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110–118.
- [121] a) W. J. K. Crone, F. J. Leeper, A. W. Truman, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3516–3521; b) J. P. Gomez-Escribano, L. Song, M. J. Bibb, G. L. Challis, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3522–3525.
- [122] T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 32–42.
- [123] A. O. Subtelny, M. C. T. Hartman, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6131–6136.
- [124] a) B. Entsch, D. P. Ballou, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 2550–2563; b) B. Entsch, D. P. Ballou, M. Husain, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7367–7369.
- [125] T. Wencewicz, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 175–200.
- [126] *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), 3. Aufl., Kluwer/Plenum, New York, **2005**.
- [127] M. M. Abu-Omar, A. Loaiza, N. Hontzeas, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2227–2252.
- [128] W. Zhang, B. D. Ames, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5401–5403.
- [129] M. J. Cryle, A. Meinhart, I. Schlichting, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24562–24574.
- [130] Y. Tang, C. Walsh, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [131] S. G. Van Lanen, S. Lin, G. P. Horsman, B. Shen, *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *300*, 237–241.
- [132] C. S. Neumann, D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 99–109.
- [133] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3960–3965.
- [134] O. Puk, P. Huber, D. Bischoff, J. Recktenwald, G. Jung, R. D. Süssmuth, K. H. van Pee, W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 225–235.
- [135] K. Podzelinska, R. Latimer, A. Bhattacharya, L. C. Vining, D. L. Zechel, Z. Jia, *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 316–331.
- [136] J. R. Heemstra, Jr., C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14024–14025.
- [137] C. S. Neumann, C. T. Walsh, R. R. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5798–5803.
- [138] J. Cheung, F. C. Beasley, S. Liu, G. A. Lajoie, D. E. Heinrichs, *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 594–608.
- [139] W. L. Kelly, M. T. Boyne II, E. Yeh, D. A. Vosburg, D. P. Gajlonić, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 359–368.
- [140] G. J. Gatto, Jr., M. T. Boyne II, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3838–3847.
- [141] C. S. Neumann, W. Jiang, J. R. Heemstra, Jr., E. A. Gontang, R. Kolter, C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 972–976.
- [142] M. G. Thomas, Y. A. Chan, S. G. Ozanick, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2823–2830.
- [143] V. Helmetag, S. A. Samel, M. G. Thomas, M. A. Marahiel, L. O. Essen, *FEBS J.* **2009**, *276*, 3669–3682.
- [144] a) M. Iwatsuki, R. Uchida, H. Yoshijima, H. Ui, K. Shiomi, A. Matsumoto, Y. Takahashi, A. Abe, H. Tomoda, S. Omura, *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 222–229; b) T. C. Holmes, A. E. May, K. Zaleta-Rivera, J. G. Ruby, P. Skewes-Cox, M. A. Fischbach, J. L. DeRisi, M. Iwatsuki, S. Omura, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17797–17806.
- [145] N. A. Magarvey, B. Haltli, M. He, M. Greenstein, J. A. Hucul, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2167–2177.
- [146] M. Okada, I. Sato, S. J. Cho, H. Iwata, T. Nishio, D. Dubnau, Y. Sakagami, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 23–24.
- [147] A. Broberg, A. Menkis, R. Vasiliauskas, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 97–102.
- [148] B. D. Ames, X. Liu, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8564–8576.
- [149] C. T. Walsh, S. W. Haynes, B. D. Ames, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 37–59.
- [150] K. L. Colabroy, W. T. Hackett, A. J. Markham, J. Rosenberg, D. E. Cohen, A. Jacobson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *479*, 131–138.
- [151] H. Chen, C. C. Tseng, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14901–14906.

- [152] C. C. Tseng, F. H. Vaillancourt, S. D. Bruner, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1195–1203.
- [153] G. R. Pettit, G. R. Pettit, K. C. Hazen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2961–2965.
- [154] D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 263–273.
- [155] Y. Xu, R. D. Kersten, S.-J. Nam, L. Lu, A. M. Al-Suwailem, H. Zheng, W. Fenical, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, P.-Y. Qian, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8625–8632.
- [156] M. Jin, M. A. Fischbach, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10660–10661.
- [157] M. Hagihara, N. J. Anthony, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568–6570.
- [158] a) G. Kaur, M. Hollingshead, S. Holbeck, V. Schaeuer-Vukašinović, R. F. Camalier, A. Dömling, S. Agarwal, *Biochem. J.* **2006**, *396*, 235–242; b) H. Steinmetz, N. Glaser, E. Herdtweck, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4996–5000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4888–4892.
- [159] H. Choi, A. R. Pereira, Z. Cao, C. F. Shuman, N. Engene, T. Byrum, T. Matainaho, T. F. Murray, A. Mangoni, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1411–1421.
- [160] L. Liu, D. W. Bearden, K. S. Rein, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1535–1538.
- [161] J. S. Scott-Craig, D. G. Panaccione, J. A. Pocard, J. D. Walton, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 26044–26049.
- [162] G. Christiansen, J. Fastner, M. Erhard, T. Börner, E. Dittman, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 564–572.
- [163] M. Offenbeller, Z. Su, G. Santer, H. Moser, R. Traber, K. Memmert, E. Schneider-Scherzer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26127–26134.
- [164] S. J. Darkin-Rattray, A. M. Gurnett, R. W. Myers, P. M. Dulski, T. M. Crumley, J. J. Allocco, C. Cannova, P. T. Meinke, S. L. Colletti, M. A. Bednarek, S. B. Singh, M. A. Goetz, A. W. Dombrowski, J. D. Polishook, D. M. Schmatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13143–13147.
- [165] Z. Jiang, M. O. Barret, K. G. Boyd, D. R. Adams, A. S. F. Boyd, J. G. Burgess, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 33–38.
- [166] H. S. Okumura, B. Philmus, C. Portmann, T. K. Hemscheidt, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 172–176.
- [167] J. McMurry, T. P. Begley, *Organic Chemistry of Biological Pathways*, Roberts, Colorado, **2005**.
- [168] C. J. Thibodeaux, W. C. Chang, H. W. Liu, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1681–1709.
- [169] J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [170] M. Berkheij, *Synthesis of 1,3-Diene-containing α-Amino Acids and Peptides via N-Acyliminium Ions*, Dissertation, University of Amsterdam, **2008**.
- [171] G. Dardenne, J. Casimir, M. Marlier, P. O. Larsen, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1897–1900.
- [172] M. F. Mackay, A. V. Donkelaar, C. C. J. Culvenor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1219–1221.
- [173] U. Sahm, G. Knobloch, F. Wagner, *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 389–390.
- [174] T. Yasuta, S. Okazaki, H. Mitsui, K. Yuhashi, H. Ezura, K. Minamisawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4999–5009.
- [175] S.-I. Hatanaka, Y. Niimura, K. Takishima, *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **1985**, *26*, 61–68.
- [176] Y. Yamaura, M. Fukuhara, E. Takabatake, N. Ito, T. Hashimoto, *Toxicology* **1986**, *38*, 161–173.
- [177] R. R. Rando, *Nature* **1974**, *250*, 586–587.
- [178] D. O. Gray, L. Fowden, *Biochem. J.* **1962**, *82*, 385–389.
- [179] K. Tanaka, E. M. Miller, K. J. Isselbacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 20–24.
- [180] a) L. Andersen, B. Nielsen, J. W. Jaroszewski, *Chirality* **2000**, *12*, 665–669; b) R. L. Dennis, W. J. Plant, C. G. Skinner, G. L. Sutherland, W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2362–2364.
- [181] J. P. Scannell, D. L. Pruess, T. C. Demny, F. Weiss, T. Williams, A. Stempel, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 239–244.
- [182] M.-Y. Sung, L. Fowden, D. S. Millington, R. C. Sheppard, *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1227–1233.
- [183] W. S. Chilton, G. Tsou, L. Kirk, R. G. Benedict, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 6283–6284.
- [184] a) G. Nass, K. Poralla, H. Zähner, *Naturwissenschaften* **1971**, *58*, 603–608; b) J. M. Crawford, S. A. Mahlstadt, S. J. Malcolmson, J. Clardy, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1102–1112.
- [185] R. R. Rando, N. Relyea, L. Cheng, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 3306–3312.
- [186] R. R. Rando, F. W. Bangerter, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6762–6764.
- [187] M. A. Hollenhorst, S. B. Bumpus, M. L. Matthews, J. M. Bollinger, Jr., N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15773–15781.
- [188] H. S. Kang, A. Krunic, J. Orjala, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 807–811.
- [189] R. G. Linington, D. J. Edwards, C. F. Shuman, K. L. McPhail, T. Matainaho, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 22–27.
- [190] A. Tooming-Klunderud, T. Rohrlack, K. Shalchian-Tabrizi, T. Kristensen, K. S. Jakobsen, *Microbiology* **2007**, *153*, 1382–1393.
- [191] E. M. Stocking, J. F. Sanz-Cervera, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7008–7009.
- [192] T. S. Young, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13053–13058.
- [193] J. P. Marcus, E. E. Dekker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 1066–1072.
- [194] C. C. Nawrat, C. J. Moody, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1426–1444.
- [195] a) J. Ehrlich, M. P. Knudsen, L. E. Anderson, H. J. Koepsell, G. L. Coffey, D. L. Kohberger, A. B. Hillegas, J. E. Oyaas, *Nature* **1954**, *173*, 72; b) Q. R. Bartz, T. H. Haskell, C. C. Elder, D. W. Johannessen, R. P. Frohardt, A. Ryder, S. A. Fusari, *Nature* **1954**, *173*, 72–73.
- [196] L. Allen, R. Meck, A. Yunis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1980**, *27*, 175–182.
- [197] D. Krahn, C. Ottmann, M. Kaiser, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1854–1867.
- [198] J. Dawlaty, X. Zhang, M. A. Fischbach, J. Clardy, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 441–446.
- [199] M. A. Hollenhorst, I. Ntai, B. Badet, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3859–3861.
- [200] S. A. Mahlstadt, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2010**, *49*, 912–923.
- [201] a) J. B. Parker, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3241–3251; b) J. B. Parker, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5622–5632.
- [202] H. Chmara, H. Zähner, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1038–1043.
- [203] H. Luesch, R. E. Moore, V. J. Paul, S. L. Mooberry, T. H. Corbett, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 907–910.