

Xanthomonine I–III: eine neue Klasse von Lassopeptiden mit einem Makrolactamring aus sieben Aminosäureresten**

Julian D. Hegemann, Marcel Zimmermann, Shaozhou Zhu, Holger Steuber, Klaus Harms, Xiulan Xie und Mohamed A. Marahiel*

Abstract: Lassopeptide gehören zu den ribosomal synthetisierten und posttranslatorisch modifizierten Peptiden. Ihr gemeinsames Erkennungsmerkmal ist ein N-terminaler Makrolactamring, der von einem C-terminalen Schwanz durchfädelt wird. Diese „Lassofaltung“ wird durch sterische Wechselwirkungen aufrechterhalten. In dieser Studie werden die Isolierung und Charakterisierung der Xanthomonine I–III, der ersten Lassopeptide mit einem nur aus sieben Aminosäuren bestehenden Makrolactamring, sowie die Kristallstruktur von Xanthomonin I und die NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur von Xanthomonin II beschrieben. Insgesamt wurden 25 Xanthomonin-II-Varianten generiert, um Aspekte der Biosynthese, der Stabilisierung und der Aufrechterhaltung der Lassofaltung zu testen. Diese Mutagenesestudie offenbart die Einschränkungen, die ein so kleiner Ring für das Durchfädeln bedeutet, und zeigt, dass jede Stöpselaminoäure größer als Serin eine hitzestabile Lassofaltung in Xanthomonin II aufrechterhalten kann.

Lassopeptide sind eine faszinierende Gruppe von Naturstoffen, die das einzigartige Strukturmotiv des Lassoknotens aufweisen. Dieses Strukturmerkmal besteht aus einem Makrolactamring, der zwischen der N-terminalen α -Aminogruppe und der Carbonsäureseitenkette eines Asp- oder Glu-Rests gebildet wird und durch den der C-terminalen Schwanz gefädelt ist, welcher durch Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten in Position gehalten wird.^[1–16] Diese Aminosäuren, sogenannte Stöpsel, sind über und unter dem Ring positioniert. Aufgrund ihrer Struktur sind Lassopeptide oft gegenüber proteolytischer und chemischer Degradation sowie in manchen Fällen auch thermisch außergewöhnlich stabil.^[1,3,8,10,14,16–23] Sie sind aber nicht nur wegen

ihrer beispiellosen Faltung und ihrer nichtkovalenten Formstabilisierung von Interesse, sondern auch oft mit interessanten biologischen Eigenschaften verbunden, die von antimikrobiellen^[3,10,11,18,20,24,25] über rezeptorantagonistischen^[26–28] zu inhibitorischen Wirkungen^[1,20,24,25,29–32] reichen. Da ihre Biosynthesemaschinerie hochpromiskuitiv ist, können die meisten Reste in ihrer Sequenz mühelos ausgetauscht werden, was ihre erfolgreiche Nutzung zum Aufprobieren von Peptidepitopen möglich machte.^[32]

Erst kürzlich wurde eine große Zahl neuer Lassopeptide identifiziert, die vor allem proteobakterieller Herkunft sind.^[2,14,15,23,33] Interessanterweise weisen alle bisher bekannten Lassopeptide Makrolactamringe auf, die entweder aus acht oder neun Aminosäuren bestehen.^[*] Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass Lassopeptide auf acht- oder neungliedrige Ringe beschränkt seien, wobei angenommen wurde, dass zehngliedrige Ringe zu groß und siebengliedrige Ringe zu klein seien, um die Lassofaltung aufrechtzuerhalten.

In einer umfangreichen Genom-Mining-Studie in Proteobakterien wurde jedoch eine kleine Untergruppe von mutmaßlichen Vorläufern mit einem für die Ringbildung geeigneten Glu-Rest an der siebten Position der postulierten Lassopeptidsequenz gefunden.^[23] Dies wurde bei insgesamt 7 von 74 identifizierten geeigneten Vorläufern beobachtet. Um herauszufinden, ob Lassopeptide mit siebengliedrigen Ringen existieren können, wurde der mutmaßliche Biosynthese-Gencluster von *Xanthomonas gardneri* für eine sorgfältige Untersuchung ausgewählt (Abbildung 1).

Für die heterologe Expression wurde der komplette Cluster in pET41a kloniert. Nach Fermentation in M9-Minimalmedium bei 20 °C über 3 Tage wurde die Produktion eines um vier Aminosäuren (AS) verkürzten Lassopeptids, das sich von XgaA1 ableitet, sowie eines um sechs AS verkürzten Lassopeptids, das sich von XgaA2 ableitet, durch hochauflösende FT-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die korrespondierenden Vollängeverbindungen wurden Xanthomonin I bzw. II genannt. Das M9-Medium wurde für die Expression gewählt, weil es sich in früheren Studien als das für die heterologe Produktion von Lassopeptiden geeignetste Medium erwiesen hatte.^[14,16,23]

Da die Ausbeute beim anfänglichen System sehr niedrig war, wurde eine Produktionsoptimierung gemäß früheren Arbeiten durchgeführt.^[14] Die Gesamtproduktion der Einzelvorläuferkonstrukte (Abbildung 1c und d) war 37 bzw. 11 mal besser als die des unmodifizierten Expressionssystems.

[*] Im Folgenden wird die Ringe als x-gliedrig bezeichnet, wobei x allerdings nicht die Zahl der Ringglieder, sondern die Zahl der Aminosäurereste im Ring angibt.

[*] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, S. Zhu, Dr. H. Steuber, Dr. K. Harms, Dr. X. Xie, Prof. Dr. M. A. Marahiel
Fachbereich Chemie
Fachgebiet Biochemie und LOEWE-Zentrum für Synthetische
Mikrobiologie
Philipps-Universität Marburg
Meerwein-Straße 4, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: marahiel@staff.uni-marburg.de

[**] Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des LOEWE-Programms des Staates Hessen und des Helmholtz-Zentrums Berlin. Außerdem danken wir Elena Schütz und Lara Golde für ihre Hilfe zu Beginn dieser Studien und den Mitarbeitern der Bessy-II-MX-Abteilung, die uns mit Messzeit, Equipment und bei der Datensammlung unterstützt haben.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309267> zu finden.

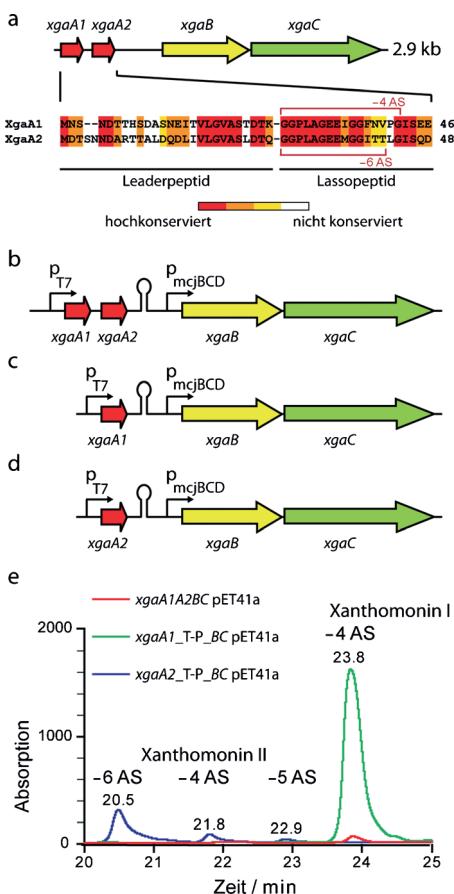


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung des Biosynthese-Genclusters von *X. gardneri* und der Aminosäuresequenzen der identifizierten Vorläuferpeptide. Gene wurden entsprechend der etablierten Nomenklatur gekennzeichnet. Das Hauptprodukt eines jeden Vorläuferpeptids ist markiert. b) Gencluster nach Austausch der Region zwischen *xgaA2* und *xgaB* mit der λ -t0-Terminator- (dargestellt als Schleife) und der *mcjBCD*-Promotor-Sequenz. c, d) Einzelvorläuferkonstrukte. e) UV-Spuren der Fermentationsextrakte der verschiedenen Konstrukte.

Mithilfe dieser Konstrukte war es möglich, das um vier AS verkürzte Xanthomonin I mit einer Ausbeute von 12.7 mg pro Liter Kulturmedium und das um sechs AS verkürzte Xanthomonin II mit einer Ausbeute von 4.1 mg pro Liter Kulturmedium zu isolieren.

Die Analyse der Primärstruktur wurde mit MS^2 durchgeführt, und ihr Ergebnis war in Einklang mit den vorhergesagten Aminosäuresequenzen und der Gegenwart von siebengliedrigen Ringen. Um die Ringgröße und die Lassotopologie zu bestätigen, wurde versucht, die Lassopeptide zu kristallisieren, was in beiden Fällen gelang. Während die Kristalle des verkürzten Xanthomonin I eine scharfe Kontur und eine definierte Struktur aufwiesen, bildete das des verkürzten Xanthomonin II lediglich unregelmäßig geformte, kristalline Plättchen. Wie erwartet lieferten die letztgenannten Kristalle schlechte Beugungsdaten, während mit den Kristallen des verkürzten Xanthomonin I hochauflöste (0.8 Å) Daten erhalten wurden, was die Strukturaufklärung ermöglichte. Das ist bislang erst die zweite aufgeklärte Kristallstruktur eines Lassopeptids.^[13] Die Struktur des verkürzten Xanthomonin II wurde mithilfe der NMR-Spektroskopie

ermittelt. In Abbildung 2 sind beide Strukturen dargestellt (für weitere Details siehe die Hintergrundinformationen). Die Stöpselaminoäurenpaare konnten als I9/F12 für Xanthomonin I und M9/I12 für Xanthomonin II identifiziert werden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Xanthomine wurden mithilfe mehrerer Experimente untersucht (siehe die Hintergrundinformationen). Proteasestabilität wurde mit Carboxypeptidase Y, Chymotrypsin und Proteinase K getestet. In fast allen Fällen zeigten sich die Lassopeptide komplett resistent gegen proteolytischen Abbau. Die einzige Ausnahme war, dass Carboxypeptidase Y langsam die letzten beiden C-terminalen Aminosäuren der bereits um vier AS verkürzten Variante von Xanthomonin I abspalten konnte, was zur Bildung von detektierbaren Spuren der um

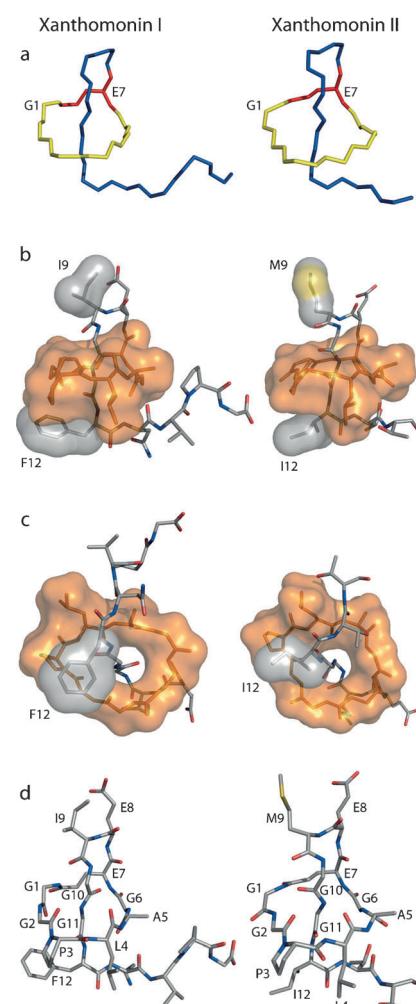


Abbildung 2. Verschiedene Darstellungen der Strukturen des um vier AS verkürzten Xanthomonin I (linke Seite, PDB-Code 4NAG) und des um sechs AS verkürzten Xanthomonin II (rechte Seite, PDB-Code 2MFV). a) Strukturen der Lassopeptidrückgrate. Der Schwanz ist in Blau, der Ring in Gelb und der ringbildende Glu7-Rest in Rot hervorgehoben. b, c) Die Interaktionen zwischen dem C-terminalen Schwanz und dem Makrolactamring gezeigt von der Seite (b) und von unten (c). d) Strukturen der Lassopeptide mit ihren Seitenketten, gefärbt nach den Elementen (Stickstoff in Blau, Sauerstoff in Rot, Schwefel in Gelb, Kohlenstoff in Grau).

fünf und sechs AS verkürzten Peptide führte. Zur Bewertung der Hitzestabilität wurden beide Verbindungen bis zu 8 h bei 95°C inkubiert. In beiden Fällen trat keine Änderung der Retentionszeit auf, was die hohe thermische Stabilität der Xanthomonine unterstreicht.

Des Weiteren wurden die neuen Lassopeptide auf eine mögliche antimikrobielle Aktivität getestet, zeigten jedoch keine Aktivität gegen irgendeinen der getesteten Bakterienstämme (siehe die Hintergrundinformationen).

Um die Spezifität der Biosynthesemaschinerie zu testen und um wichtige Strukturmerkmale zu untersuchen, wurden 25 Mutanten von Xanthomonin II mittels ortsgerichteter, Ligase-unabhängiger Mutagenese erzeugt.^[34,35] Xanthomonin II wurde für diese Experimente ausgewählt, weil sein kürzeres Hauptprodukt die Untersuchung der Schwanzregion unter dem Ring erleichtert. Einen Überblick über die Produktion aller Varianten bietet Abbildung 3.

Der Austausch des Thr-Rests an der vorletzten Position des Leaderbereichs offenbarte, dass das Xanthomoninsystem eine Substitution dieser Aminosäure wesentlich schlechter toleriert als andere Systeme. Normalerweise werden Aminosäuren, die Thr strukturell ähnlich sind, einigermaßen gut toleriert, während andere die Gesamtproduktion des Lassopeptids drastisch senken.^[14,16,22,36,37] Im Fall des Xanthomoninsystems führten jedoch nicht nur die T-2A-Variante, die als Negativkontrolle dienen sollte, sondern auch die Varianten T-2I, T-2S und T-2V zu einer sehr schlechten Produktion. Lediglich die T-2C-Variante wurde in gewissem Umfang toleriert.

Um zu ermitteln, ob unterschiedlich große Makrolactamringe durch den Ersatz von Glu durch Asp oder von Glu7 durch Ala erzeugt werden können, wurden mehrere Mutanten generiert. Zusätzlich sollte getestet werden, ob Pro3 essenziell für die Prozessierung ist, da die von Pro3 vermittelte

Rigidität wichtig für die Vorfaltung sein könnte. Während die Varianten P3A und E8A gut produziert wurden, führten die E7A-, E7D- und E7A/E8D-Mutationen zum kompletten Verlust der Lassopeptidproduktion. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Biosynthesemaschinerie darauf beschränkt ist, 23 Atome große Makrocyclen zu prozessieren.

Bei beiden Aminosäuren im Innern des Rings handelt es sich um Glycinreste, was die Frage aufwirft, ob das bereits das Limit für das Innere eines siebengliedrigen Rings ist. Um dies zu beantworten, wurden G10 und G11 unabhängig voneinander durch Ala, Leu oder Phe ersetzt. Dabei ging in allen Fällen die Lassopeptidproduktion fast vollständig verloren.

Schließlich sollte untersucht werden, wie klein eine Aminosäure sein kann, um immer noch als Stöpsel für einen siebengliedrigen Ring dienen zu können. Dazu wurde zunächst eine Reihe von Mutanten generiert, um zu testen, ob und welche Aminosäuren des Schwanzes außer I12 immer noch in der Lage sind, die Lassofaltung zu erhalten. Die Varianten I12A, I12A/T13A und I12A/T13A/T14A wurden alle in guten Ausbeuten produziert, während die vierfache Ala-Substitution (I12A/T13A/T14A/L15A) die Produktion signifikant senkte. Zusätzlich war das Hauptprodukt dieser Variante ein um zehn AS verkürztes Peptid, bei dem nach der Bildung des Makrolactamrings nur drei Aminosäuren für den Schwanz zur Verfügung stehen, was für die Bildung eines Lassoknotens zu wenig ist. Aufgrund der Datenlage ist es wahrscheinlich, dass diese Mutationen immer noch die Prozessierung des Vorläufers erlauben, dass jedoch das Lassopeptid danach direkt entfädeln kann und anschließend der Großteil seines Schwanzbereichs proteolytisch abgebaut wird.

Aus diesem Grund ist diese Variante der ideale Ausgangspunkt für eine Überprüfung der möglichen Stöpselaminosäuren. Daher wurde eine Reihe von I12X/T13A/T14A/L15A-Varianten hergestellt, wobei X Ile, Leu, Ser, Thr oder Val war.

Von diesen Varianten wurde lediglich jene mit Ser in geringen Mengen produziert; sie war auch die einzige, bei der ein um zehn AS verkürztes Peptid eines der Hauptprodukte war. Um die Topologie und die thermische Stabilität dieser Varianten zu prüfen, wurde ein kombinierter Carboxypeptidase-Y- und Hitze-Stabilitätsassay durchgeführt (siehe die Hintergrundinformationen). Während die Varianten mit Ile, Leu, Thr oder Val an Position 12 nicht um mehr als sechs AS verkürzt werden konnten, was in Einklang mit dem Ergebnis der Kontrollreaktion ist, wurden die Varianten mit Ala oder Ser an Position 12 bis auf den Makrolactamring und Glu8 abgebaut.

Da diese Ergebnisse unabhängig von einer vorherigen vierstündigen Inkubation bei 95°C erhalten wurden, ist nicht von einer thermisch indu-

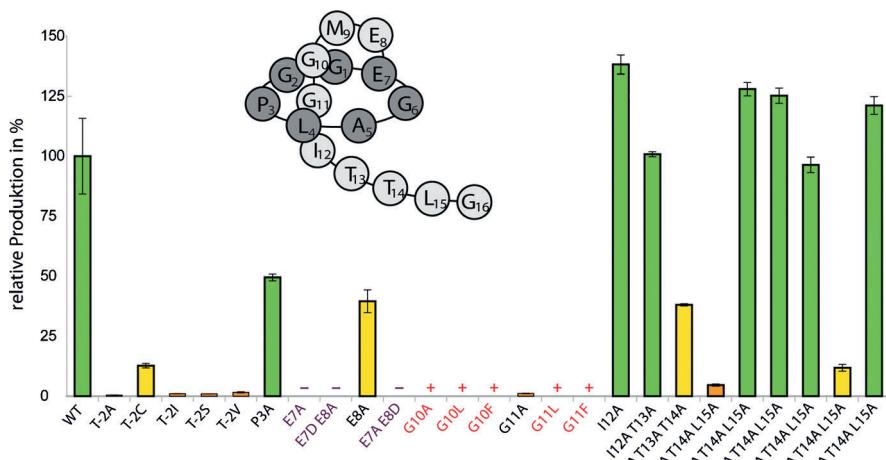


Abbildung 3. Überblick über die Gesamtproduktion aller getesteten Varianten von Xanthomonin II (siehe auch die Hintergrundinformationen). Ein grüner Balken steht für eine Produktion von 150–50%, ein gelber für eine von 50–10% und ein orangefarbener für eine von 10–1% im Vergleich mit dem Wildtyp. Varianten, die nur massenspektrometrisch detektiert werden konnten, sind mit einem roten Kreuz gekennzeichnet; Varianten mit einem violetten Minuszeichen waren nicht detektierbar. Eine schematische Darstellung des um vier AS verkürzten Xanthomonin II ist in der Mitte gezeigt.

zierten Veränderung der Topologie auszugehen. Damit sind alle Verbindungen mit Ile, Leu, Thr oder Val an Position 12 hitzestabile Lassopeptide, während die Varianten mit Ala oder Ser an Position 12 nur als verzweigt-cyclische Peptide isoliert werden konnten. Daraus folgt, dass alle Aminosäuren, die größer sind als Ser, die Lassofaltung eines siebengliedrigen Rings auch bei höherer Temperatur aufrechterhalten können. Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, da ähnliche Studien mit Caulosegnin I ergaben, dass Leu bei einem achtgliedrigen Ring kaum noch dazu in der Lage ist, die Lassofaltung zu erhalten.^[14]

Auffällig an den Strukturen der Xanthomonine ist, wie klein die Öffnungen der Makrolactamringe wirklich sind. Die Tatsache, dass diese Ringe aus lediglich 23 Atomen bestehen, erlaubt einen Vergleich mit der Klasse der chemisch zugänglichen [2]Rotaxane, die einige strukturelle Ähnlichkeiten mit den Lassopeptiden aufweisen. Interessanterweise bestehen die Makrocyclen der kleinsten bisher bekannten [2]Rotaxane aus 20 Atomen und sind somit nur wenig kleiner als die Xanthomoninringe.^[38–40] Allerdings sind die Ringe dieser [2]Rotaxane sowie die Segmente, die von den Ringen umschlossen sind, anders als Peptidketten nur aus linearen Ketten von Atomen aufgebaut. Darum und weil diese [2]Rotaxane als Limit (oder zumindest nahe dem Limit) dessen, was möglich ist, angesehen werden, ist es unwahrscheinlich, dass Lassopeptide mit sechsgliedrigen Ringen existieren können. Dagegen ist denkbar, dass es Lassopeptide gibt, die einen siebengliedrigen Ring mit einem Asp- statt eines Glu-Rests enthalten, wenn auch das Xanthomoninsystem nicht in der Lage war, eine solche Variante zu prozessieren. Leider sind bisher keine mutmaßlichen Lassopeptid-biosynthese-Gencluster bekannt, deren Vorläuferpeptide einen Asp-Rest an Position 7 enthalten, weswegen die Antwort auf die Frage, ob ein solches Lassopeptid natürlich vorkommen könnte, aufgeschoben werden muss, bis eine größere Menge an Genomdaten bekannt ist.

Um zu beweisen, dass die gezeigten Lassopeptide mit siebengliedrigem Ring keine Sonderfälle sind, wurde des Weiteren der Gencluster aus *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* (siehe die Hintergrundinformationen) untersucht, der ebenfalls in einer früheren Studie identifiziert worden war.^[23] Die Produktionsoptimierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt,^[14,23] wodurch die Gesamtausbeute um das Vierfache gesteigert werden konnte und die Isolierung der um sieben AS verkürzten vorhergesagten Verbindung, Xanthomonin III genannt, mit einer Ausbeute von 0.3 mg pro Liter Kulturmedium möglich war. MS² bestätigte die erwartete Aminosäuresequenz und den siebengliedrigen Ring. Kombinierte Carboxypeptidase-Y- und Hitze-Stabilitätsstudien führten zu keiner Veränderung von Länge oder Retentionszeit der isolierten Verbindung, was nahelegt, dass es sich wirklich um ein Lassopeptid handelt.^[14,23] Zur Identifizierung der Stöpselaminoäure wurde eine Reihe von Varianten generiert, in denen sukzessive alle größeren Aminosäuren an den Positionen 14 bis 11 durch Ala ersetzt wurden. Da die M11A/S12A/P13A/I14A-Variante als einzige nicht produziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass Met11 als Stöpsel von Xanthomonin III fungiert. Diese Experimente belegen, dass Lassopeptide mit siebengliedrigen

Ringen allgemein synthetisierbar sind und dass diese Klasse von Lassopeptiden nicht auf *X. gardneri* beschränkt ist.

Zusammenfassend waren wir also in der Lage, heterolog drei neuartige Lassopeptide aus zwei verschiedenen Biosynthese-Genclustern zu produzieren und zu isolieren. Diese Lassopeptide sind die ersten derartigen Naturstoffe, deren Makrolactamring aus sieben Aminosäureresten besteht. So konnte die bisherige Ansicht, dass nur Lassopeptide mit acht- oder neungliedrigen Ringen produziert werden können, widerlegt werden. Außerdem ergab unsere Mutagenesestudie das Limit in Bezug auf die Aminosäure, die im Innern eines siebengliedrigen Rings vorhanden sein kann, und offenbarte auch die minimale Größe, die eine Aminosäureseitenkette benötigt, um als Stöpsel in diesem System eine hitzestabile Lassofaltung aufrechtzuerhalten. Des Weiteren präsentierte wir die NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des um sechs AS verkürzten Xanthomonin II und die Kristallstruktur des um vier AS verkürzten Xanthomonin I, die mit einer Auflösung von 0.8 Å erhalten wurde.

Eingegangen am 23. Oktober 2013
Online veröffentlicht am 20. Januar 2014

Stichwörter: Biosynthese · Lassopeptide · Makrocyclen · Naturstoffe · Sterische Hinderung

- [1] D. Frechet, J. D. Guitton, F. Herman, D. Faucher, G. Helynck, B. Monegier du Sorbier, J. P. Ridoux, E. James-Surcouf, M. Vuilhorgne, *Biochemistry* **1994**, *33*, 42–50.
- [2] S. Um, Y. J. Kim, H. Kwon, H. Wen, S. H. Kim, H. C. Kwon, S. Park, J. Shin, D. C. Oh, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 873–879.
- [3] O. Potterat, H. Stephan, J. W. Metzger, V. Gnau, H. Zähner, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, *741*–743.
- [4] K. L. Constantine et al., *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 271–286.
- [5] D. J. Detlefsen et al., *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1515–1517.
- [6] R. Katahira, K. Shibata, M. Yamasaki, Y. Matsuda, M. Yoshida, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1273–1280.
- [7] M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. Swapna, J. Y. Huang, L. C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382–12383.
- [8] K. J. Rosengren, R. J. Clark, N. L. Daly, U. Goransson, A. Jones, D. J. Craik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12464–12474.
- [9] K. A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov, S. A. Darst, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12475–12483.
- [10] M. Iwatsuki, H. Tomoda, R. Uchida, H. Gouda, S. Hirono, S. Omura, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7486–7491.
- [11] T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11446–11454.
- [12] T. A. Knappe, U. Linne, X. Xie, M. A. Marahiel, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 785–789.
- [13] H. Nar, A. Schmid, C. Puder, O. Potterat, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1689–1692.
- [14] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 210–222.
- [15] M. O. Maksimov, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12038–12047.
- [16] M. Zimmermann, J. D. Hegemann, X. Xie, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 558–569.
- [17] D. F. Wyss, H. W. Lahm, M. Manneberg, A. M. Labhardt, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 172–180.
- [18] R. A. Salomon, R. N. Farias, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7428–7435.

- [19] M. Yamasaki, K. Yano, M. Yoshida, Y. Matsuda, K. Yamaguchi, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 276–280.
- [20] K. Yano, S. Toki, S. Nakanishi, K. Ochiai, K. Ando, M. Yoshida, Y. Matsuda, M. Yamasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 115–120.
- [21] A. Blond, M. Cheminant, D. Destoumieux-Garzón, I. Ségalas-Milazzo, J. Peduzzi, C. Goulard, S. Rebuffat, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 6212–6222.
- [22] T. A. Knappe, U. Linne, L. Robbel, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1290–1298.
- [23] J. D. Hegemann, M. Zimmermann, S. Zhu, D. Klug, M. A. Marahiel, *Biopolymers* **2013**, *100*, 527–542.
- [24] M. Tsunakawa et al., *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 433–434.
- [25] K. Kimura, F. Kanou, H. Takahashi, Y. Esumi, M. Uramoto, M. Yoshihama, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 373–378.
- [26] Y. Morishita, S. Chiba, E. Tsukuda, T. Tanaka, T. Ogawa, M. Yamasaki, M. Yoshida, I. Kawamoto, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 269–275.
- [27] T. Ogawa, K. Ochiai, T. Tanaka, E. Tsukuda, S. Chiba, K. Yano, M. Yamasaki, M. Yoshida, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1213–1220.
- [28] O. Potterat, K. Wagner, G. Gemmecker, J. Mack, C. Puder, R. Vettermann, R. Streicher, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1528–1531.
- [29] J. Yuzenkova, M. Delgado, S. Nechaev, D. Savalia, V. Epshtein, I. Artsimovitch, R. A. Mooney, R. Landick, R. N. Farias, R. Salomon, K. Severinov, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50867–50875.
- [30] K. Adelman, J. Yuzenkova, A. La Porta, N. Zenkin, J. Lee, J. T. Lis, S. Borukhov, M. D. Wang, K. Severinov, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 753–762.
- [31] E. Semenova, Y. Yuzenkova, J. Peduzzi, S. Rebuffat, K. Severinov, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3859–3863.
- [32] T. A. Knappe, F. Manzenrieder, C. Mas-Moruno, U. Linne, F. Sasse, H. Kessler, X. Xie, M. A. Marahiel, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8873–8876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8714–8717.
- [33] M. O. Maksimov, I. Pelczer, A. J. Link, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15223–15228.
- [34] J. Chiu, P. E. March, R. Lee, D. Tillett, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e174.
- [35] J. Chiu, D. Tillett, I. W. Dawes, P. E. March, *J. Microbiol. Methods* **2008**, *77*, 195–198.
- [36] S. J. Pan, J. Rajniak, M. O. Maksimov, A. J. Link, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1880–1882.
- [37] W. L. Cheung, S. J. Pan, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2514–2515.
- [38] S. Dasgupta, K. W. Huang, J. Wu, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4821–4823.
- [39] S. Dasgupta, J. Wu, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 425–432.
- [40] H. W. Gibson, D. S. Nagvekar, N. Yamaguchi, S. Bhattacharjee, H. Wang, M. J. Vergne, D. M. Hercules, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7514–7529.