



Die Struktur eines transienten Komplexes einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase mit einer P450-Monooxygenase**

Kristina Haslinger, Clara Brieke, Stefanie Uhlmann, Lina Sieverling, Roderich D. Süssmuth und Max J. Cryle*

Abstract: Untersuchungen zum Verständnis des Wechselspiels von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), einer wichtigen Quelle für Sekundärmetaboliten, mit modifizierenden Enzymen stellen eine große Herausforderung dar, da diese Interaktionen oft von transienter Natur sind. Mithilfe einer Reihe von synthetischen inhibitorartigen Verbindungen gelang es, einen stabilisierten Komplex eines solchen modifizierenden Enzyms mit einer NRPS-Domäne zu bilden und strukturell zu charakterisieren. Es handelt sich um eine Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)-Domäne der NRPS gebunden an ein Cytochrome-P450-Enzym, das essentiell für die Bereitstellung von β -hydroxylierten Aminosäurevorläufern in der Biosynthese des cyclischen Depsipeptids Skyllamycin ist. Die Struktur zeigt, dass die Komplexbildung vorwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, deren Auftreten durch geringfügige Änderungen in der PCP-Struktur kontrolliert wird, und somit Selektivität gegenüber strukturell sehr ähnlichen PCP-Domänen vermittelt.

Die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) sind für die Synthese bedeutender Sekundärmetabolite wie Penicillin,^[1] Cephalosporin^[1] und Vancomycin^[2] zuständig. Dabei wird aufgrund der modularen Organisation und des Zusammenspiels mit einer Vielzahl an Aminosäure- und Peptid-modifizierenden Enzymen eine enorme Ausweitung des biosynthetischen Potentials jenseits der Möglichkeiten der ri-

bosomalen Biosynthese möglich.^[3] Dies macht die Untersuchung von NRPS und deren Wechselwirkungspartnern sowohl für die Grundlagenforschung als auch für biotechnologische Anwendungen interessant.^[2] Die Mehrheit der für die NRPS-Biosynthese benötigten Aminosäurevorläufer wird vor der Aktivierung durch die NRPS synthetisiert.^[4] Kürzlich wurde jedoch für das cyclische Depsipeptid Skyllamycin ein neues Modell für die Vorläuferherstellung gefunden, das auf der selektiven und unmittelbaren Interaktion modifizierender Enzyme mit NRPS-gebundenen Aminosäuren basiert.^[5,6] Hierbei erfolgt die β -Hydroxylierung von hydrophoben Aminosäuren, die an Carrier-Protein(CP)-Domänen gebunden sind, durch ein Cytochrome-P450(P450)-Enzym (Abbildung 1).^[7,8] Der zugrunde liegende Selektionsmechanismus

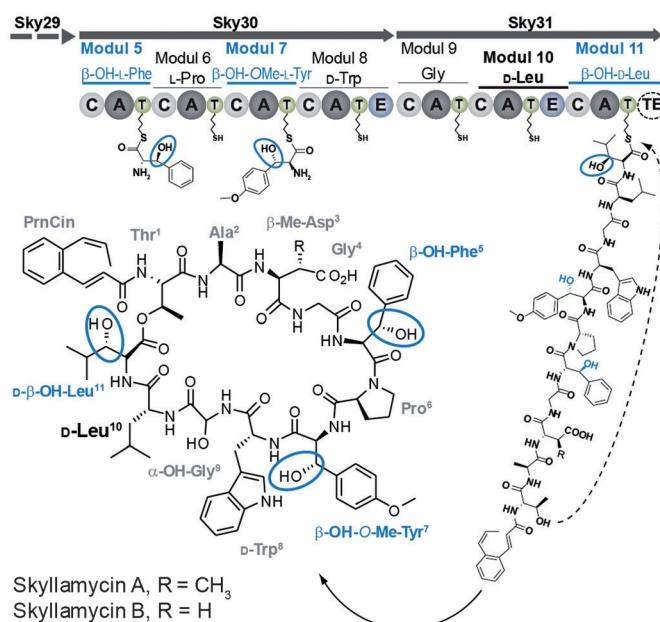


Abbildung 1. Übersicht über zentrale Schritte der Skyllamycin-Biosynthese, in der nur die relevanten Module der NRPS (Sky29, Sky30, Sky31) dargestellt sind. C: Kondensation, A: Adenylierung, E: Epimerisierung, T: Peptidyl-Carrier-Protein oder Thiolierungsdomäne.

hängt nicht von den Aminosäureseitenketten ab, sondern vielmehr von den entsprechenden CP-Domänen^[9] und bietet somit einen Ansatzpunkt für die In-vivo-Gewinnung von neuen, modifizierten nicht-ribosomalen Peptiden.

Um die Grundlage der P450/CP-Selektivität zu verstehen, war eine strukturelle Charakterisierung des Komplexes unmöglich, da isolierte P450-Strukturen nur begrenzt Rückschlüsse zulassen.^[7,10] Die strukturelle Charakterisie-

[*] K. Haslinger, Dr. C. Brieke, L. Sieverling, Dr. M. J. Cryle
Abteilung für Biomolekulare Mechanismen
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Jahnstraße 29, 69120 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: Max.Cryle@mpimf-heidelberg.mpg.de

Dr. S. Uhlmann, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)

[**] Die Autoren danken A. Koch und E. Maximowitsch (MPI-Hd) für die Unterstützung bei der Genexpression und Aufnahme der UV/Vis-Spektren, A. Meinhart und T. Barends (MPI-Hd) für Hilfe bei der Datenverarbeitung, J. Yin (University of Chicago) für das R4-4 Sfp-Expressionsplasmid, G. Stier (BZH-Hd) für den Thioredoxin-Fusionsproteinvektor und C. Roome (MPI-Hd) für IT-Unterstützung. Die Beugungsdaten wurden an der Swiss Light Source, X10SA-Strahlungsquelle des Paul-Scherrer-Instituts, Villigen (Schweiz) aufgenommen. Wir danken dem Heidelberger Team für die Datensammlung und dem PXII-Team für ihre Unterstützung bei der Bereitstellung der Strahlungsquelle. M.J.C. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Emmy-Noether-Programm, CR 392/1-1), R.D.S. dem Exzellenzcluster UniCat und dem DFG-Project SU 239/12-1.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404977> zu finden.

rung wurde jedoch durch die schwachen Interaktionen der beteiligten Enzyme erschwert, was eine Cokristallisation ausschloss. Um dieses Hindernis zu überwinden, nutzten wir die Tatsache, dass Stickstoff-Liganden hochstabil und inhibitorartig an das Eisen(III) der Häm-Gruppe in P450-Enzymen koordinieren.^[11] Daher wurde eine Reihe von Inhibitor-Coenzym A-Konjugaten synthetisiert, in vitro auf eine isolierte CP-Domäne übertragen und als „Köder“ zur Stabilisierung der P450/CP-Komplexe verwendet. Dieser Ansatz ermöglichte uns die Kristallisation eines Komplexes von P450 und PCP₇ aus der Skyllamycin-Biosynthese. Die Struktur zeigt, dass im Vergleich zu anderen NRPS-CP-Komplexen^[12] zwar ähnliche Sekundärstrukturelemente den CP-Interaktionsbereich bilden, dass diese jedoch im P450/PCP-Komplex in einer neuartigen Anordnung vorliegen. Überdies beruht die PCP-Selektivität nicht auf der Primärsequenz der direkt wechselwirkenden Seitenketten, sondern auf geringfügigen Änderungen der relativen Anordnung der Helices in den verschiedenen PCPs, wobei geeignete Bindungsflächen nur von jenen PCPs ausgebildet werden, die mit dem P450-Enzym wechselwirken.

Die Untersuchung der Wechselwirkungen von NRPS-Carrier-Domänen mit in *trans*-Bindungspartnern ist eine große Herausforderung. Zum einen sind PCPs, die aus der Multidomänenumgebung herausgelöst werden, oftmals instabil, neigen zur Aggregation oder können nicht durch Transferasen modifiziert werden. Zum anderen erschweren die mäßige Affinität und der transiente Charakter der Wechselwirkung die Experimente. Im Rahmen dieser Studie verwendeten wir das mit dem P450 interagierende PCP₇ und das nicht interagierende PCP₁₀ der Skyllamycin-NRPS, die jeweils mit Thioredoxin fusioniert waren.^[13] In Analogie zu früheren Studien zu CP-Wechselwirkungen^[12,14,15] konnten wir zeigen, dass spezielle, Inhibitor-ähnliche CP-Frachtmoleküle wertvolle Werkzeuge zur Verringerung der Dissoziationsfähigkeit des P450/PCP-Komplexes darstellen, um NRPS-CP-P450-Komplexe zu stabilisieren. Für das Inhibitordesign wurde die langlebige, stabile Koordination von heterocyclischem Stickstoff an Fe^{III} ausgenutzt,^[11] wie sie für Imidazol beobachtet wird (**1**, Abbildung 2, siehe Hintergrundinformationen (SI), Abbildung S2 und Tabelle S2). Es wurden inhibitorartige Sonden als drei verschiedene Konjugate entworfen: als verkürzte Pantethein-Amide (**R**₁), als Coenzym-A-Thioester (**R**₂), und als mit dem CoA-Thioester beladene Carrier-Proteine (**R**₃; PCP₇, PCP₁₀, ACP) (Abbildung 2, Hintergrundinformationen Tabelle S1, Abbildung S1). Die Strukturen der Inhibitoren umfassen Imidazolderivate (**2**, **3**) und andere Stickstoff-haltige heterocyclische Inhibitoren (**4**–**8**). Diese Serie von Sonden deckt verschiedene Abstände zwischen dem CP und dem Häm-bindenden Stickstoffatom sowie verschiedene Grade an Rotationsfreiheit und Substratmimese ab. Um die geeigneten Verbindungen für Kristallisationsexperimente zu ermitteln, untersuchten wir zunächst das Bindungsverhalten der PCP-Konjugate mit UV/Vis-Spektroskopie. Die Kontrollexperimente wurden mit Imidazol (**1**), seinen **R**₁- und **R**₂-Konjugaten (**2**–**2**–**R**₂) und mit **2**–**R**₃-beladenem ACP bzw. PCP₁₀ durchgeführt. Wie erwartet führt die Titration von P450_{sky} mit Imidazol zu einer charakteristischen Typ-II-Spektralver-

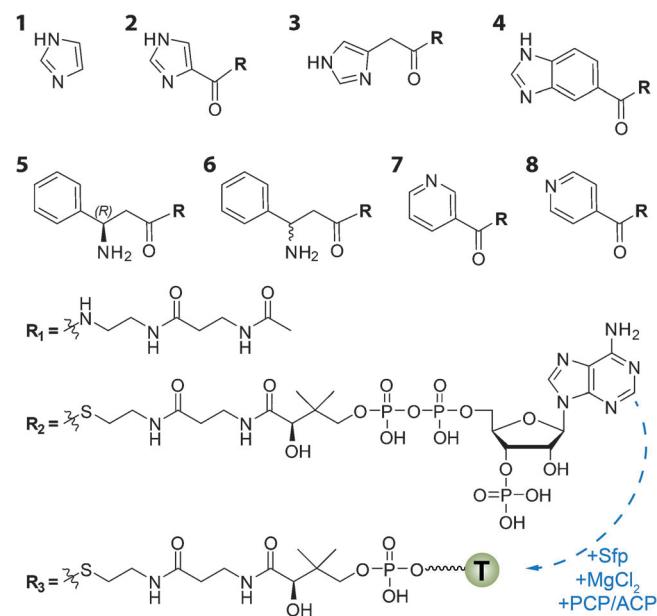


Abbildung 2. Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Inhibitoren (**1**–**8**) in drei verschiedenen Ausführungen: **R**₁ = verkürztes Pantethein-Amid, **R**₂ = CoA-Thioester und **R**₃ = Thioester von 4'-phosphopantetheinylierten Carrier-Proteinen (PCP₇, PCP₁₀, ACP).

schiebung (N-Koordination, Inhibitor-Typ) mit einem K_d von 2.6 ± 0.2 mm (siehe SI, Abbildung S2 a und Tabelle S2).

Die Titration mit dem Konjugat **2**–**R**₂ führt zu einer substratartigen Typ-I-Verschiebung (SI, Abbildung S2 b) und wurde bereits früher beschrieben.^[7,10] Spektren von Verbindung **2**–**R**₁ zeigen eine anti-Typ-II-Verschiebung (SI, Abbildung 2b), die durch Wasserstoffbrücken zwischen Häm gebundenem Wasser und dem Stickstoffatom des Liganden zustande kommt.^[16] Angelehnt an das Binden jeglicher hydrophober Aminosäurefracht der interagierenden PCP-Domäne durch P450_{sky}^[7] wurden die hydrophoben PCP₇-Konjugate dem P450 dargeboten (Abbildung 3). Wie erwartet bindet **2**–**R**₃(PCP₇) in einer ähnlichen Weise wie Verbindung **1**, allerdings mit einer Dissoziationskonstante, die um zwei Größenordnungen kleiner ist ($K_d = 10.1 \pm 0.5$ μM), und bindet somit sogar fester als das natürliche Substrat (OMe)-Tyr ($K_d = 89 \pm 3$ μM).^[7] Die nicht-wechselwirkenden Proteine PCP₁₀ und *E. coli*-ACP wurden ebenfalls beladen und zu **2**–**R**₃(PCP₁₀/ACP) umgesetzt, führten aber zu keiner nennenswerten Bindung oder Spektralverschiebung (SI, Abbildung S2 e,f). Daraus folgern wir, dass die beobachtete Bindung von **2**–**R**₃(PCP₇) hochspezifisch ist und zwei Triebkräften unterliegt, der Protein-Protein-Wechselwirkung und der günstigen Koordination des Inhibitor-Stickstoffs an das Eisenatom der Häm-Gruppe.

Auch die Verbindungen **3**–**R**₃(PCP₇) bis **8**–**R**₃(PCP₇) wurden auf die Bindung an P450_{sky} untersucht. Stark ausgeprägte und hoch reproduzierbare Spektralverschiebungen wurden für die Verbindungen **3**–**4**–**6**–**R**₃(PCP₇) erhalten, während die anderen Verbindungen geringere Effekte aufwiesen (SI, Tabelle S2 und Abbildung S3). Daraufhin wurden Cokristallisationsexperimente mit den Verbindungen **2**–, **3**–, **4**– und **6**–**R**₃ durchgeführt. Während alle Versuche ohne gebun-

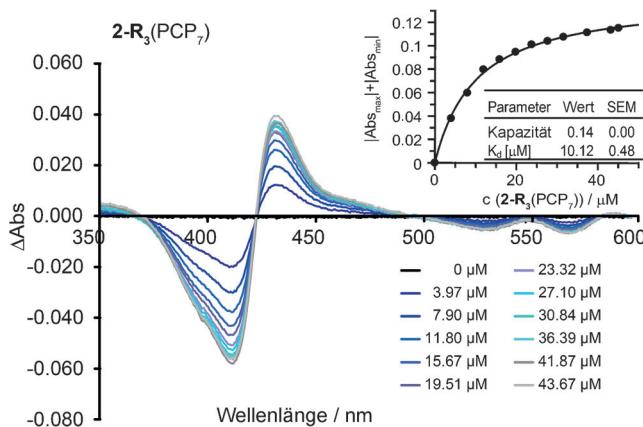


Abbildung 3. UV/Vis-Differenzspektren von P450_{sky} titriert mit $\mathbf{2\text{-}R}_3(\text{PCP}_7)$. Die extrapolierten Amplituden wurden gegen die Titrant-Konzentrationen aufgetragen und an ein Einseitenbindungsmodell angepasst (Einschub).

denen Inhibitor scheiterten, bildeten sich für den stabilisierten $\text{P450}_{\text{sky}}/\mathbf{2\text{-}R}_3(\text{PCP}_7)$ -Proteinkomplex Kristalle.

Die Phasenzuordnung wurde mit Selenomethionin-markierten Kristallen in einem anomalen Dispersionsexperiment durchgeführt (Auflösung 3.0 Å) und auf einen nativen Datensatz, der auf 2.7 Å verfeinert wurde, angewendet (SI, Tabelle S3). Das im Komplex gebundene P450_{sky} nimmt eine charakteristische P450-Faltung ein (Abbildung 4),^[11] bei der im Vergleich zur ungebundenen P450_{sky} -Struktur nur Unterschiede im Bereich der die Interaktionsfläche bildenden F- und G-Helices auftreten (RMSD $\text{C}\alpha$ 1.7 Å; siehe SI, Abbildung S4a,b).^[7] Überraschenderweise bleibt eine Reorganisation der B/B₂- bzw. B₂/C-Schleifen aus, die häufig in substratgebundenen P450-Strukturen beobachtet wird.^[11] PCP₇ nimmt die erwartete Faltung eines Vier-Helix-Bündels mit zwei Haupthelices (α -1, α -2) und zwei Nebenhelices (α -3, α -4) ein. Das konservierte Serin (S42), das die posttranskriptionale Modifizierung (4'-Phosphopantethein oder Ppant abgeleitet von Coenzym A) trägt, ist am Anfang der α -2-Helix gelegen. Bei fehlender Elektronendichte für Thioredoxin beginnt die wohlgeordnete PCP₇-Peptidkette einige Reste nach dem Beginn der PCP₇-Sequenz.^[*] Die PCP₇-Domäne ist strukturell verwandt mit einigen ACP^[17] und PCP-Strukturen^[9,14] (SI, Tabelle S5), einschließlich des ACP des $\text{P450}_{\text{Biol}}$ /ACP-Komplexes (RMSD $\text{C}\alpha$ 1.6 Å, SI, Abbildung S5).^[17] Ein automatisierter Strukturvergleich von P450_{sky} belegte die größte Ähnlichkeit für $\text{P450}_{\text{Biol}}$,^[17] OxyD^[10] und verschiedene mykobakterielle P450 (siehe SI, Tabelle S4). Die $\text{P450}_{\text{sky}}/\text{PCP}_7$ -Kontaktfläche enthält nur wenige ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken. R63 in der α -3-Helix, T46 und K47 in der α -2-Helix von PCP₇ wechselwirken mit D191, N197 (G-Helix) und E235 (I-Helix) vom P450 (Abbildung 5a), während das Amid von L62 in α -3 eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke mit E198 ausbildet. Im Vergleich dazu ist der hydrophobe Charakter der Kontaktfläche

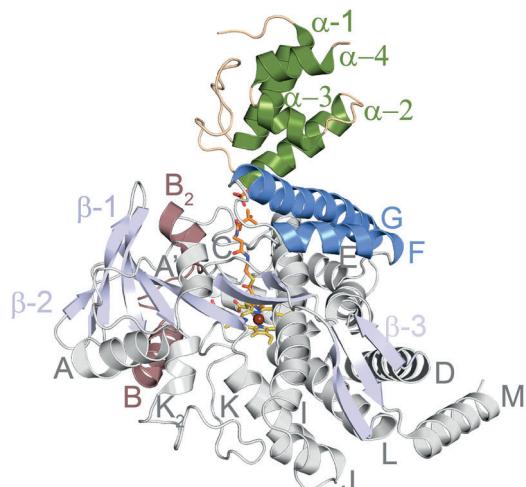


Abbildung 4. Komplex von P450_{sky} und PCP₇, stabilisiert durch einen Azol-Inhibitor. P450-Monooxygenase: grau; Helices F und G in der Interaktionsfläche: blau; B/C-Region: rot; β -Faltblätter: hellblau; Häm-Gruppe: gelb; PCP: goldfarben bzw. grün; Inhibitor: orange. Alle Sekundärstrukturen sind gekennzeichnet.

stärker ausgeprägt. In beiden Proteinfaltungen werden Cluster von hydrophoben Seitenketten gefunden, die hydrophobe Reste des Interaktionspartners aufnehmen. So befinden sich die Reste von W193 und L194 des P450 (Abbildung 5b) in großer räumlicher Nähe (Abstände 4–5.6 Å) von Resten, die eine hydrophobe Tasche innerhalb des PCP₇-Helixbündels ausbilden, während L43 von PCP₇ in eine kleinere Spalte zwischen der I- und G-Helix und der C/D-Schleife vom P450 hineinreicht (blau markierte Seitenketten, Abstände 4–5.5 Å). Diese hydrophobe Tasche nimmt auch die *gem*-Dimethylgruppe des Pantethein-Arms auf. Somit wird die Interaktionsfläche von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Sekundärstrukturelementen dominiert. Ähnliche Kontaktflächenarchitekturen mit hydrophobem Charakter wurden für Strukturen von Carrier-Proteinen in Komplexen mit anderen NRPS-Domänen^[14,15,18] oder Aminosäureligasen gefunden.^[19] Komplementär zu den Protein-Protein-Wechselwirkungen befinden sich einige Aminosäureseitenketten, die den Substrat-Eintrittskanal der P450-Monooxygenase auskleiden, in der Nähe des Ppant-Cofaktors. Diese Abstände lassen allerdings bestenfalls schwache Wasserstoffbrücken zu (Abbildung 5c). Diese Anordnung könnte von der Inhibitor-Ppant-Gruppe herrühren, die an den Enden über die S42-Ppant-Bindung bzw. die Fe-N-Bindung fixiert ist (diese Bindungslänge wurde während der Strukturverfeinerung auf 2.0 Å gesetzt und ist durch die Elektronendichte begründet, siehe SI, Abbildung S6) und demzufolge der Inhibitor in seiner Drehbarkeit um die Bindung zwischen Carboxygruppe und Imidazolgruppe eingeschränkt ist. Die anderen stark interagierenden Inhibitor-Konjugate (3-, 4- und 6-R₃(PCP₇)), die keine solche Spannung aufweisen, konnten nicht kristallisiert werden, was wahrscheinlich auf die zusätzlichen Konformations- und Rotationsfreiheitsgrade zurückgeführt werden kann.

Die PCP-Reste, die die Kontaktfläche des $\text{P450}_{\text{sky}}/\text{PCP}_7$ -Komplexes ausbilden, sind unter allen Carrier-Proteinen der

[*] Rest 6 entspricht nach UniProt-Nummerierung Aminosäure 3079 von Sky30.

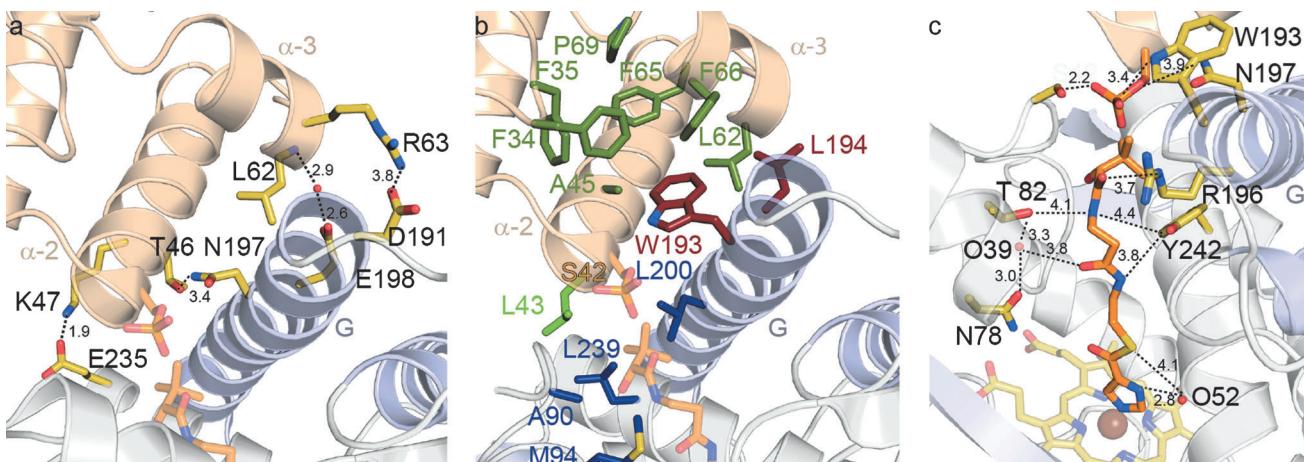


Abbildung 5. Protein-Protein-Interaktionsbereich (a, b) und aktives Zentrum des P450_{sky}/PCP₇-Komplexes (c); P450_{sky}: blau/grau, PCP₇: goldfarben. a) Wasserstoffbrücken im Interaktionsbereich (schwarz gestrichelte Linien). b) Hydrophobe Taschen werden auf jeder Seite der Proteinoberfläche ausgebildet: Blaue Seitenketten bilden auf der P450-Seite eine Tasche, um L43 (hellgrün) von PCP₇ und die zwei Methylgruppen von Ppant (orange) aufzunehmen. Seitenketten des PCP₇ (grün) bilden eine große Vertiefung für die Wechselwirkung mit W193 und L194 von P450_{sky} (rot). c) Wasserstoffbrücken (schwarz gestrichelte Linien) zwischen den Seitenketten des P450 Substrateintrittskanals (gelb) und dem Ppant-Arm, der den Azol-Inhibitor trägt (orange).

Skyllamycin-NRPS hoch konserviert. Zusätzlich gibt es keine wesentliche strukturelle Reorganisation des P450 nach Komplexbildung. Vielmehr scheinen alle Aminosäuren-oxidierenden P450-Monoxygenasen die Architektur der Interaktionsfläche mittels einer definierten Konsensussequenz aufrechtzuerhalten.^[10] Somit ist eine korrekte Anordnung der PCP-Reste, die die Wechselwirkung eingehen, bereits vor der Interaktion der Proteine notwendig. Dies legt nahe, dass die Veränderungen der PCP-Tertiärstruktur die wahrscheinlichste Erklärung für die Selektivität des P450 sind. Der Vergleich eines Homologiemodells des nicht-interagierenden PCP₁₀ mit dem des bindenden PCP₇ im Komplex mit P450_{sky} zeigt, dass sich solche Unterschiede in geringfügigen Änderungen der Ausrichtung der α -2- und α -3-Helix manifestieren (siehe SI, Abbildung S7) und wahrscheinlich zum Verlust der hydrophoben Wechselwirkung durch die beteiligten Aminosäureseitenketten W193/L194 von P450_{sky} führen.

Im Hinblick auf die Orientierung von PCP und P450 ist die relative Positionierung von PCP₇ zu P450_{sky} sehr verschieden zu dem einzigen anderen bekannten Komplex – dem von P450_{Biol} mit ACP.^[17] PCP₇ besetzt den Raum oberhalb der G-Helix von P450_{sky}, sodass die α -2-Helix in einem 25°-Winkel zur Häm-Ebene liegt und vom Zentrum des P450 nach außen weist. Die α -2- und α -3-Helices bilden eine X-förmige Spalte, die die G-Helix des P450 aufnimmt (Abbildung 4 und 5a,b). Der Ppant-Arm, der das Azol trägt, ragt von S42 in einem ähnlichen Winkel in die Häm-Ebene hinein wie die gebundene Fettsäure im P450_{Biol}/ACP-Komplex, obwohl die Eintrittsseite bei beiden Strukturen vollkommen verschieden ist (Abbildung 6). In der P450_{Biol}/ACP-Struktur ist die α -2-Helix von ACP zwischen der F/G-Schleife und der B/B₂-Schleife des P450 zentriert und verläuft entlang der Spalte zwischen der α -helikalen Hälfte und der β -Faltblatt-Struktur des P450. Der Ppant-Arm und die gebundene Fettsäure erreichen das aktive Zentrum von der β -Faltblatt-Seite in der Nähe der β_2 -Kehre, nähern sich dem Häm und biegen

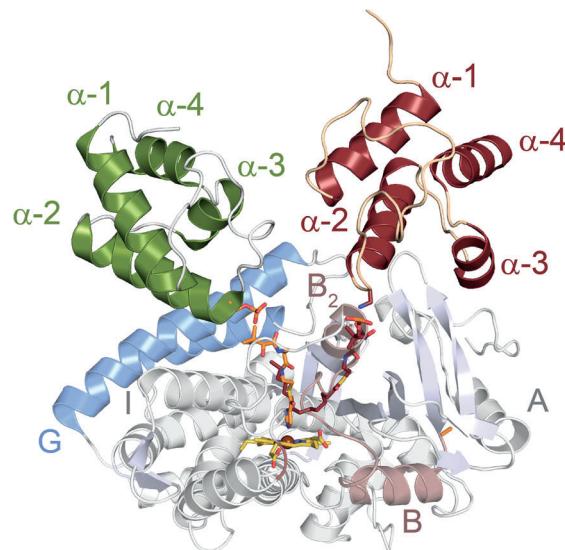


Abbildung 6. Überlagerung von P450_{sky}/PCP₇ mit P450_{Biol}/ACP basierend auf den P450-Polypeptidketten. Es sind nur ACP, P450_{sky} und PCP₇ gezeigt. ACP und Tetradecansäure sind rot dargestellt, P450_{sky} und PCP₇ sind wie in Abbildung 4 gefärbt.

sich nach oben in Richtung der F-Helix. Mit Ausnahme der M-Helix von P450_{sky} sind die Strukturen der P450-Proteine höchst deckungsgleich (RMSD Ca 2.2 Å). Kleinere Unterschiede sind in den F- und G-Helices zu finden, größere Unterschiede hingegen in der Region zwischen den B- und C-Helices (siehe SI, Tabelle S6 und Abbildung S8). Dieser Bereich beeinflusst den Bindungsmodus des Carrier-Proteins sehr stark. Einige Strukturen von verwandten P450, die mit NRPS- oder PKS-Systemen interagieren, sind mit dem P450_{sky}/PCP₇ Bindungsmodus kompatibel (OxyD)^[10] und einige mit dem des P450_{Biol}/ACP-Komplexes (CalO2).^[20] Die Charakterisierung weiterer P450-CP-Komplexe, die z. B. an

der Biosynthese von Makroliden^[21] oder Glykopeptidantibiotika^[22] beteiligt sind, wird zeigen, ob die hier beschriebenen Bindungsmodi alle PKS- und NRPS-Systeme erschöpfend erfasst haben.

Zusammenfassend präsentieren wir hier einen Ansatz, der die strukturelle Charakterisierung einer transienten P450-PCP-Interaktion zum ersten Mal ermöglicht hat. In Anbetracht der Wichtigkeit dieser Wechselwirkungen in der nicht-ribosomalen Peptidsynthese und ihrer potentiellen Rolle in der Polyketidsynthese, messen wir unseren Ergebnissen große Bedeutung bei. Sowohl unsere Strategie zur Herstellung dieser P450-CP-Komplexe als auch die Charakterisierung des P450_{sky}/PCP₇-Komplexes und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen stellen eine wichtige Basis für zukünftige Untersuchungen und möglicherweise für die Umprogrammierung der Selektivität von mit NRPS interagierenden, modifizierenden Enzymen in vivo dar.

Eingegangen am 5. Mai 2014

Online veröffentlicht am 9. Juli 2014

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Biosynthese ·
Metalloenzyme · Protein-Protein-Wechselwirkungen ·
Strukturbioologie

- [1] J. E. Baldwin, E. Abraham, *Nat. Prod. Rep.* **1988**, *5*, 129–145.
- [2] K. M. G. O'Connell, J. T. Hodgkinson, H. F. Sore, M. Welch, G. P. C. Salmond, D. R. Spring, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10904–10932; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10706–10733.
- [3] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496.
- [4] G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1074–1098.
- [5] S. Pohle, C. Appelt, M. Roux, H.-P. Fiedler, R. D. Süssmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6194–6205.

- [6] V. Schubert, F. Di Meo, P.-L. Saaidi, S. Bartoschek, H.-P. Fiedler, P. Trouillas, R. D. Süssmuth, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4948–4955.
- [7] S. Uhlmann, R. D. Süssmuth, M. J. Cryle, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586–2596.
- [8] M. J. Cryle, C. Brieke, K. Haslinger, *Oxidative Transformations of Amino Acids and Peptides Catalysed by Cytochromes P450*, Bd. 39 (Hrsg.: E. Farkas, M. Ryadnov), The Royal Society of Chemistry, London, **2014**, S. 1–36.
- [9] T. Weber, R. Baumgartner, C. Renner, M. A. Marahiel, T. A. Holak, *Structure* **2000**, *8*, 407–418.
- [10] M. J. Cryle, A. Meinhart, I. Schlüting, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24562–24574.
- [11] *Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry*, (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), Kluwer Academic/Plenum, New York, **2005**.
- [12] J. Crosby, M. P. Crump, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1111–1137.
- [13] J. Bogomolovas, B. Simon, M. Sattler, G. Stier, *Protein Expression Purif.* **2009**, *64*, 16–23.
- [14] Y. Liu, T. Zheng, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1482–1488.
- [15] J. A. Sundlov, C. Shi, D. J. Wilson, C. C. Aldrich, A. M. Gulick, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 188–198.
- [16] N. Mast, W. Zheng, C. D. Stout, I. A. Pikuleva, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 4613–4624.
- [17] M. J. Cryle, I. Schlüting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15696–15701.
- [18] A. Tanovic, S. A. Samel, L.-O. Essen, M. A. Marahiel, *Science* **2008**, *321*, 659–663.
- [19] M. Mocibob, N. Ivic, M. Luic, I. Weygand-Durasevic, *Structure* **2013**, *21*, 614–626.
- [20] J. G. McCoy, H. D. Johnson, S. Singh, C. A. Bingman, I.-K. Lei, J. S. Thorson, G. N. Phillips, Jr., *Proteins* **2009**, *74*, 50–60.
- [21] L. Song, L. Laureti, C. Corre, P. Leblond, B. Aigle, G. L. Challis, *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 71–76.
- [22] D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G. J. Nicholson, S. Stockert, M. Schirle, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4824–4827; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4688–4691.