

Eine Dehydratase-Domäne in der Ambruticin-Biosynthese zeigt zusätzliche Aktivität als Pyran-bildende Cyclase**

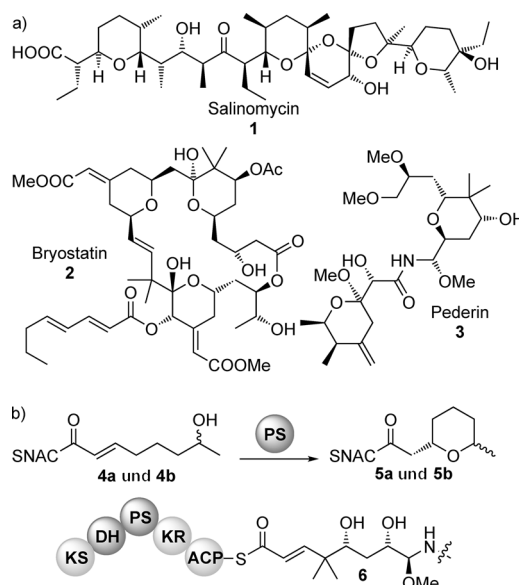
Gesche Berkhan und Frank Hahn*

Abstract: Hydropyranringe sind ein häufig anzutreffendes Strukturmotiv in Polyketiden. Es gibt nur wenige Informationen über ihre biosynthetische Bildung, besonders was die Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme angeht. Hier präsentieren wir unsere Befunde zur Dehydratase-Domäne AmbDH3 aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg, für die wir durch In-vitro-Testung der rekombinanten Domäne mit präparativ hergestellten Substratsurrogaten nachweisen konnten, dass sie eine zweite katalytische Aktivität als Oxa-Michael-Additionen durchführende Cyclase aufweist. Die Umsetzung von AmbDH3 mit synthetischen Substratanaloga offenbarte eine hohe Stereoselektivität und Substrattoleranz in beiden enzymatischen Teilschritten. Es handelt sich um die erstmalige Charakterisierung einer Pyran-bildenden Cyclase aus einem cis-AT-PKS-System sowie den ersten Bericht über eine Polyketidsynthase-Domäne mit dieser Art von dualer katalytischer Aktivität. Weiterhin zeigen wir, dass diese Domäne Potenzial für einen Einsatz in der chemoenzymatischen Synthese hat.

Polyketide sind eine wichtige Naturstoffklasse mit großem Potenzial für die Wirkstoff-Entwicklung. Besonders die Produkte der Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ I weisen eine hohe Strukturvielfalt auf und sind anspruchsvolle Synthesziele. Bei bakteriellen Typ-I-PKS handelt es sich um multimodulare Megaenzymkomplexe, welche die Verlängerung einer wachsenden Polyketidkette durch decarboxylierende Claisen-artige Kondensationen katalysieren.^[1] In den einzelnen Modulen bestimmt die so genannte reduktive Schleife das individuelle Funktionalisierungsmuster. Ketoreduktase(KR)-Domänen reduzieren 3-Oxothioester zu 3-Hydroxythioestern, Dehydratase(DH)-Domänen katalysieren die Eliminierung von Wasser und Enoylreduktase(ER)-Domänen reduzieren den erhaltenen α,β -ungesättigten Thioester

zur vollständig gesättigten Kette. Während des gesamten Prozesses verbleibt die wachsende Polyketidkette über einen Phosphopantethein-Arm an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden. PKS können weiterhin Domänen enthalten, die unkonventionelle Transformationen durchführen, die letztlich zur Bildung alternativer Strukturelemente führen.^[2] Obwohl solche biosynthetischen Mechanismen mehrfach auf Basis von Genclusteranalysen postuliert wurden, konnten nur wenige durch In-vitro-Experimente auf enzymatischer Ebene nachgewiesen werden.

Sauerstoff-Heterocyclen sind Bestandteil vieler Polyketide, insbesondere solcher mit hervorstechender biologischer Aktivität, wie Salinomycin (**1**) und Bryostatine (**2**; Schema 1 a).^[3] Es ist bekannt, dass diese Ringe durch Oxidations-Cyclisierungs- sowie Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaska-



Schema 1. a) Strukturen pharmakologisch relevanter Pyran-haltiger Polyketide. b) In-vitro-Aktivität der PS-Domäne aus der Pederin-PKS wurde kürzlich mit den strukturell vereinfachten Substratanaloga **4a** und **4b** nachgewiesen. Diese unterscheiden sich deutlich vom natürlichen Substrat **6**.^[2b, 3, 5h] PS: Pyransynthase, SNAC: N-Acetylcysteamin.

den gebildet werden.^[4] Weiterhin wurde auf Basis von Genclusteranalysen und Biotransformationsexperimenten postuliert, dass Domänen mit Sequenzähnlichkeiten zu Δ^5 -3-Ketosteroidisomerasen, Hydrolasen oder Dehydratasen als Oxa-Michael-Addition-katalysierende Cyclasen agieren.^[5]

Vor kurzem wurde über die erste In-vitro-Charakterisierung einer so genannten Pyransynthase(PS)-Domäne berichtet.^[2b, 5e] Die PS-Domäne aus Modul 7 des Pederin-PKS-

[*] G. Berkhan, Dr. F. Hahn
Institut für Organische Chemie
Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 1 B, 30167 Hannover (Deutschland)
E-Mail: frank.hahn@oci.uni-hannover.de
Homepage: <http://uhw3dev.uni-hannover.de/oci/de/arbeitskreise/hahn/index.php>

[**] Dieses Projekt wurde durch das Emmy Noether-Programm der DFG (HA 5841/2-1), das Marie Curie Programm der EU (Projekt-Nr.: 293430) und das Graduiertenkolleg MINAS (Promotionsstipendium für G.B.) gefördert. Wir danken Dr. Gerald Dräger und Dr. Anna Kromm für die Unterstützung bei der Einkristall-Röntgenstrukturanalyse und Claudia Holec für orientierende präparative Arbeiten. Weiterhin danken wir der NMR- und MS-Abteilung des OCI Hannover sowie Prof. Andreas Kirschning für Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407979> zu finden.

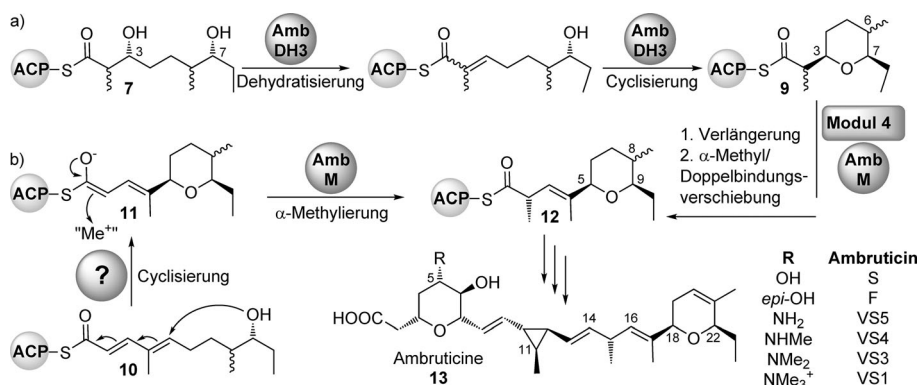
NRPS-Hybrids (PedPS7) katalysiert die Cyclisierung einfacher Vorstufensurrogate wie **4a** und **4b** zu den entsprechenden cyclisierten Produkten **5a** und **5b** mit Enantiomerenüberschüssen von 67 bzw. 89 % zugunsten der natürlichen 3-L-Konfiguration (Schema 1b). Wegen der starken strukturellen Abweichung der verwendeten Substrate von der natürlichen PedPS7-Vorstufe **6** sprechen diese Resultate für eine hohe Substrattoleranz der Domäne, lassen jedoch Fragen zu deren tatsächlicher Stereoselektivität offen. Weitere Experimente mit realistischeren Substratsurrogaten sind somit notwendig.

Genclusteranalysen belegten, dass PS-Domänen normalerweise in DH-haltigen Modulen kodiert sind und im Anschluss an die DH-Domäne deren α,β -ungesättigtes Produkt cyclisieren (Schema 1b). Die bisher bekannten PS-haltigen Systeme gehören alle zur Klasse der *trans*-AT-PKS. Bei den häufiger auftretenden *cis*-AT-PKS-Systemen scheinen andere Mechanismen abzulaufen, die bis heute noch nicht eingehend studiert wurden.^[5h,6] Obwohl die Gencluster zahlreicher Pyran-tragender *cis*-AT-PKS-Produkte, wie der ionophoren Polyether Salinomycin (**1**) und Nigericin, bereits sequenziert wurden, steht ein Vorschlag für die verantwortliche katalytische Einheit noch aus.^[5h,6a]

Die Ambruticine (**13**) sind wegen ihrer einzigartigen Interaktion mit dem hoch osmotischen Glycerinkinase-Signalweg wichtige Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Antimykotika (Schema 2).^[6b,7] Ihr Aufbau erfolgt durch eine

Eine Genclusteranalyse legte nahe, dass die Pyranbildung während der Prozessierung durch die Module 3 und 4 der PKS geschieht.^[6b] Beide Module enthalten ACP-, KS-, AT-, KR- und DH-Domänen, was in Einklang mit zweifacher Ketidverlängerung und der Prozessierung zu einem 2,4-Dienylthioester ist. Reeves et al. postulierten für die Bildung von **12** einen Biosynthesemechanismus, bei dem zunächst eine konjugierte 1,6-Addition an den vinylischen Michael-Akzeptor **10** stattfindet und anschließend das gebildete Enolat **11** durch die elektrophile Methylgruppe eines *S*-Adenosyl-L-methionins (Schema 2b) abgefangen wird.^[6b] Die Methylierung wird dabei durch die C-Methyltransferase AmbM katalysiert. Üblicherweise modifizieren Standard-PKS-Domänen Intermediate nur an C-2 und C-3. Aus diesem Grund favorisierten wir einen Mechanismus, in dem eine konjugierte 1,4-Addition in Modul 3 zur Bildung des Tetrahydropyrans **9** führt (Schema 2a). Anschließend Verlängerung zum α,β -ungesättigten System in Modul 4, gefolgt von Methylierung und Doppelbindungsverschiebung, würde zur Bildung des β,γ -ungesättigten Intermediates **12** führen.^[8] Da der Ambruticin-Gencluster keine PS-ähnliche Domäne aufweist, vermuteten wir, dass die DH-Domäne aus Modul 3 (AmbDH3) sowohl für die Dehydratisierung als auch für die folgende Cyclisierung verantwortlich ist.

Um unsere biosynthetische Hypothese zu belegen, planen wir die rekombinante Domäne AmbDH3 in vitro mit adäquaten Substratanaloga umzusetzen.^[9] Um mechanistische Details zu erhalten sowie die exakte Konstitution und Konfiguration der biosynthetischen Vorstufe zu bestimmen, sollten alle potenziellen Vorstufen, Intermediate und Produkte des Prozesses chemisch synthetisiert werden. Die Zahl der möglichen Substrate konnte durch bioinformatische Analysen verringert werden.^[10] So weisen die KR-Domänen der Module 1 und 3 der Ambruticin-PKS jeweils das charakteristische LDD-Motiv auf, das eine 3-D,7-D-Konfiguration der Vorstufe **7** nahelegt.^[10a,b] Die Anwendung eines anderen, kürzlich veröffentlichten Algorithmus ergab



Scheme 2. Zwei hypothetische Wege zur Hydropyranringbildung im östlichen Teil der Ambruticine, wie postuliert von uns (a) und von Reeves et al. (b).^[6]

Typ-I-*cis*-AT-PKS, und sie tragen einen Dihydropyranring im östlichen Teil des Moleküls. Es wurde postuliert, dass dieser Ring durch eine Oxa-Michael-Addition gebildet wird, auf die zu einem späteren Zeitpunkt der Biosynthese eine Dehydrierung durch das Fe-S-Rieske-Cluster-Protein AmbO folgt. Die Konfiguration des zwischenzeitlich an C-8 des Intermediates **12** gebildeten Stereozentrums ist unbekannt.

Die entsprechenden 20,21-Dihydroambruticine wurden zwar aus einer *ambO*-Knock-Out-Mutante isoliert und strukturell charakterisiert, es wurden im zugehörigen Manuskript allerdings beide Epimere des 20,21-Dihydroambruticins sowie seiner Vorstufe präsentiert und keine analytischen Daten gezeigt. Daher war keine eindeutige Zuordnung der absoluten Konfiguration an C-21 möglich.^[6b]

leider keine hinreichend eindeutige Vorhersage bezüglich der Konfiguration an C-2 und C-6, sodass wir uns entschlossen, alle möglichen Konfigurationsisomere zu synthetisieren.^[10c]

Surrogate für den 3-Hydroxy-ACP-Thioester **7**, Enolat-ACP-Thioester **8** und Tetrahydropyran-ACP-Thioester **9** wurden in Form von *N*-Acetylcysteamin(SNAC)-Thioestern synthetisiert, die eine gebräuchliche Ersatzform für ACP-gebundene DH-Substrate sind (Abbildung 1 a).^[9] Zwei Serien von Vorstufenmolekülen mit 6-L,7-D-Konfiguration (**14–18**) sowie 6-D,7-D-Konfiguration (**19–22**) wurden synthetisiert, und ihre absolute Konfiguration wurde durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie bestimmt (Schema S1, Abbildungen S16–18, Tabelle S2; S: Hintergrundinformationen).^[11] Die Domänengrenzen von

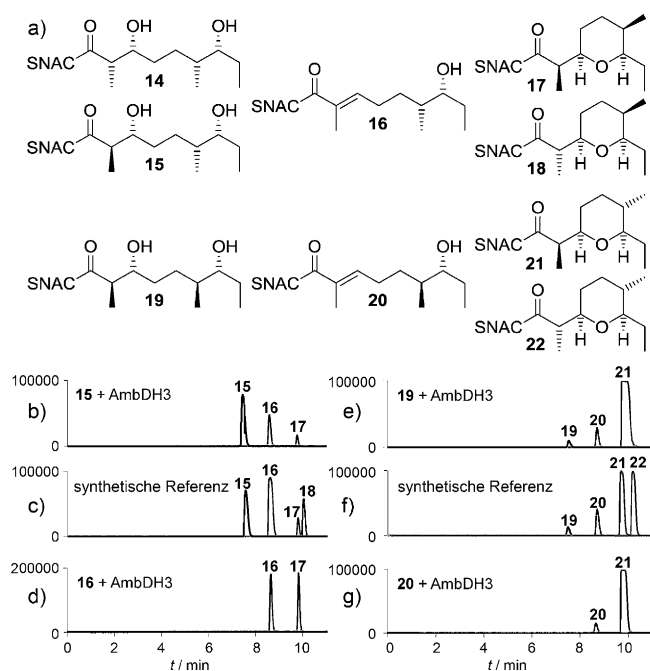


Abbildung 1. Strukturen der synthetischen Substrat- und Produktsurrogate **14–22**, die in den Assays verwendet wurden (a). HPLC-MS-Analyse der Inkubation von AmbDH3 mit **15** und **16** (b und d) sowie mit den Vorstufen **19** und **20** (e und g) über Nacht. Die individuellen Massenspektren der synthetischen Referenzmoleküle **15–22** wurden in den Diagrammen (c) und (f) zur besseren Übersicht vereint (unbearbeitete Daten siehe Abbildungen S5–S9).

AmbDH3 wurden durch Vergleich zu Aminosäuresequenzen zuvor charakterisierter DH-Domänen ermittelt.^[9a,b] Das erhaltene Gen wurde in den pET28a(+)-Vektor kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und nach Reinigung durch Affinitätschromatographie in den Enzymtests eingesetzt (Abbildung S1).

HPLC-MS-Analyse nach individueller Inkubation der 3-Hydroxythioester **14** und **15** mit AmbDH3 über Nacht zeigte nur im Fall der 2-D,3-D-konfigurierten Vorstufe **15** einen Umsatz (Abbildung 1 b, Abbildungen S3/S4). Diese Beobachtung ist in Einklang mit den vorhergegangenen Berichten über eine hohe Substratspezifität von DH-Domänen bezüglich der Konfiguration an C-2 und C-3.^[9] Die beiden hydrophoberen Produkte der enzymatischen Reaktion coeluierten mit den synthetischen Standards **16** und **17**, was auf eine Dehydratisierungs-Cyclisierungs-Kaskade schließen lässt (Abbildung 1 b,c). Zum Nachweis, dass es sich beim *E*-konfigurierten Olefin **16** tatsächlich um ein kompetentes Intermediat handelt, wurde dieses ebenfalls einzeln mit AmbDH3 inkubiert. Hierbei konnte ausschließlich die Bildung eines Produktes beobachtet werden, das ebenfalls mit dem 2-D,3-D-konfigurierten Pyran **17** coeluierte (Abbildung 1 d, Abbildung S5). Normalerweise stehen DH-katalysierte Reaktionen im Gleichgewicht zwischen hydratisierter und dehydratisierter Form. In unserem Fall wurde keine Bildung eines 3-Hydroxythioesters wie **15** beobachtet, was eine Gleichgewichtslage weit auf der Seite der ungesättigten (**16**) und der cyclisierten Form (**17**) nahelegt.^[9]

Die Gegenwart detektierbarer Mengen des Startmaterials **15**, des Intermediates **16** und des Produktes **17** (abnehmend in dieser Reihenfolge) bei Langzeitinkubation von AmbDH3 mit **15** lässt auf eine geringe Spezifität der DH-Domäne für das verwendete Startmaterial, besonders im Cyclisierungsschritt, schließen. Im Unterschied dazu zeigt die Langzeitinkubation des 2-D,3-D,6-D,7-D-konfigurierten **19** mit AmbDH3 nur Spuren des Startmaterials **19** und des α,β -ungesättigten Intermediates **20**, aber große Mengen des Tetrahydropyrans **21** (Abbildung 1 e,f, Abbildung S7). Inkubation des Intermediates **20** ergab einen nahezu vollständigen Umsatz zu **21** und keine Rehydratisierung zu **19** (Abbildung 1 g, Abbildung S8). Auf Basis der unterschiedlichen Umsätze schlossen wir, dass es sich bei den natürlichen Intermediaten um 2-D,6-D-7, (2*E*),6-D-8, 2-D,6-D-9 und 8-D-12 handeln muss (Schema 2).

Um die Cyclaseaktivität definitiv AmbDH3 zuzuordnen, führten wir eine Reihe von Kontrollexperimenten durch. Enzymfreie Inkubationen der synthetischen Analoga **14–16** und **19–22** über Nacht unter den etablierten Assaybedingungen zeigten keinerlei Umsatz, was spontane nichtenzymatische Nebenreaktionen ausschließt (Abbildungen S3a,b–8a,b, S9). Um sicherzustellen, dass die beobachtete enzymatische Reaktion nicht durch Spuren eines weiteren, während der Reinigung nicht von AmbDH3 abtrennbaren Proteins hervorgerufen wurde, stellten wir eine Punktmutante her, bei der das Histidin im aktiven Zentrum gegen ein Alanin ausgetauscht war. Bei individueller Inkubation dieser Mutante mit **19** und **20** konnte keine Umsetzung beobachtet werden, was zeigt, dass AmbDH3 tatsächlich für die Dehydratisierung verantwortlich war (Abbildung S10).

Abschließend wollten wir sicherstellen, dass die Cyclisierungsaktivität von AmbDH3 eine intrinsische Eigenschaft der Domäne und kein durch die Wahl der Substrate bedingtes Artefakt ist. Zu diesem Zweck inkubierten wir Substrat **19** mit der rekombinanten Domäne BorDH3 aus der Borrelidin-PKS. Wir hatten bereits in früheren Experimenten gezeigt, dass diese Domäne ausschließlich 2-D,3-D-konfigurierte Vorstufen akzeptiert und diese selektiv und mit breiter Substrattoleranz in *E*-konfigurierte Enoate überführt.^[9a,b] BorDH3 führte die erwartete Dehydratisierung zum *E*-konfigurierten Enoat **20** durch, jedoch erkennbar keine Cyclisierung zu Tetrahydropyranringen wie **21** oder **22** (Abbildung S11).

Um die Konfiguration der Produkte eindeutig zu bestätigen und weiterhin das Potenzial von AmbDH3 für die präparative Verwendung zu evaluieren, wiederholten wir alle Enzymreaktionen mit den Substraten **15**, **16**, **19** und **20** im semipräparativen Maßstab (jeweils >8 mg Substrat pro Ansatz) und analysierten das Ergebnis mithilfe von NMR-Spektroskopie (Abbildung 2, Abbildungen S12–15). In allen Fällen erhielten wir gleichartige Ergebnisse wie in den durch HPLC-MS analysierten Reaktionen. AmbDH3 überführte die Substrate **16** und **20** in die jeweiligen Produkte **17** und **21** mit Umsätzen von 18 bzw. 87 % (bestimmt anhand der ¹H-NMR-Spektren). Die Inkubation von AmbDH3 mit 8.0 mg der Vorstufe **20** ergab nach extraktiver Aufarbeitung annähernd reines Produkt **21**. Dieser Befund ist ein vielversprechender Startpunkt für eine Entwicklung von AmbDH3 zu

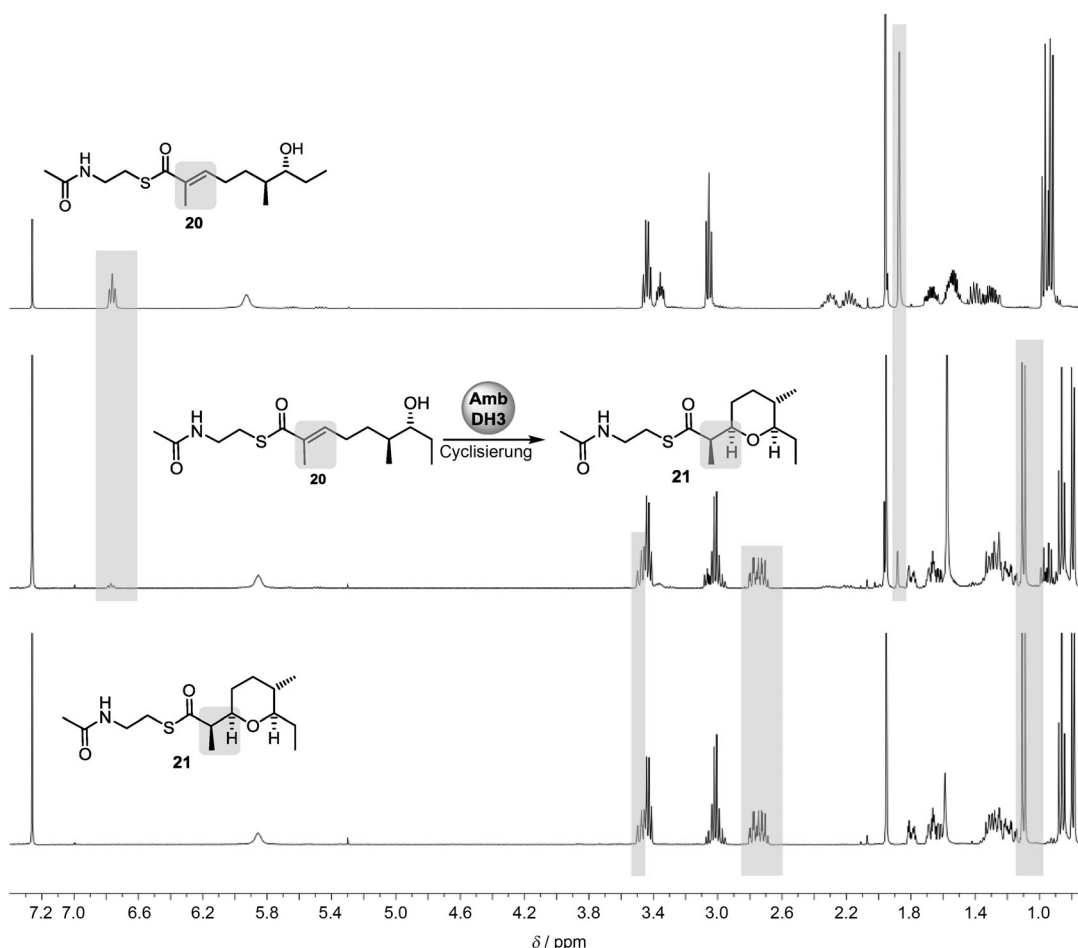


Abbildung 2. ¹H-NMR-spektroskopische Analyse der Umsetzung von **20** mit AmbDH3 im semipräparativen Maßstab (Mitte) sowie des Startmaterials **20** (oberes Teilschema) und des Produktes **21** (unteres Teilschema; alle Spektren wurden in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen). Charakteristische Signale sind grau hinterlegt.

einem nützlichen chemoenzymatischen Hilfsmittel für die stereoselektive Synthese von Tetrahydropyranringen.

Die Proteinsequenzen bisher untersuchter PS-Domänen zeigen hohe Homologien zu denen von DH-Domänen, erstere bilden jedoch einen eigenen phylogenetischen Zweig.^[2b] Weiterhin ist das DH-charakteristische Motiv His-Ser-Asp im aktiven Zentrum bei PS-Domänen hin zu His-Ser-His/Asn mutiert. Diese Mutation ist in Einklang mit der Tatsache, dass eine saure Seitenkette in räumlicher Nähe zu C-3 der α,β-ungesättigten Vorstufe kontraproduktiv für den vorgeschlagenen, konjugierten Additionsmechanismus wäre. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von AmbDH3 mit denen verschiedener PS- und DH-Domänen aus *cis*- und *trans*-AT-PS-KS ergab, dass AmbDH3 das DH-charakteristische His-Ser-Asp-Motiv im aktiven Zentrum trägt (Abbildung S19). Phylogenetische Analyse zeigte weiterhin, dass AmbDH3 dem gleichen phylogenetischen Zweig wie typische DH-Domänen aus *cis*-AT-PS-Systemen zuzuordnen ist (Abbildung S20).

Wir haben hier von der Entdeckung der ersten PKS-Domäne berichtet, die zwei katalytische Aktivitäten aufweist, zum einen als Dehydratase und zum anderen als Oxa-Michael-Addition-katalysierende Cyclase. Wir haben die erste

Charakterisierung einer Pyran-bildenden Cyclase aus einem *cis*-AT-PS-System und die erste Beschreibung einer PKS-Domäne mit dieser Art von dualer katalytischer Aktivität vorgestellt.^[2b] Die stereoselektive Synthese von Substratsurrogaten ermöglichte es uns, die AmbDH3-Domäne mit realistischen Vorstufen-, Intermediat- und Produktanaloga zur Reaktion zu bringen. Wir konnten zeigen, dass die beide Teilschritte ausgehend vom 2-D,6-D-**7** mit hoher Stereoselektivität zunächst zum Intermediat (2*E*),6-D-**8** und schließlich zum Tetrahydropyranprodukt 2-D,6-D-**9** führen. Die Substratspezifität von AmbDH3 ist strikt bezüglich der Konfiguration an C-2 und C-3, Veränderungen der Konfiguration an C-6 werden aber toleriert. Eindeutige Unterschiede in den Umsetzungen der diastereomeren Substrate **15** und **19** sowie **16** und **20** zeigen klar, dass die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht definierte Konfiguration des biosynthetischen Intermediates **12** an C-8 D sein muss.

Enzyme aus Biosynthesewegen von Sekundärmetaboliten sind vielversprechend für die Anwendung in der chemoenzymatischen Synthese von Naturstoffen.^[12] Wir haben gezeigt, dass AmbDH3 Reaktionen im semipräparativen Maßstab mit hohem Umsatz und unter neutralen Bedingungen durchführt. Dies bereitet weiteren Untersuchungen zur Anwendbarkeit

von AmbDH3 in der chemoenzymatischen Synthese von Pyran-haltigen Naturstoffen den Weg. Ausführliche Untersuchungen zur Substratspezifität von AmbDH3 sind hier der nächste Schritt. Die Aufklärung weiterer mechanistischer und struktureller Details wird dazu beitragen zu verstehen, wie zwei katalytische Aktivitäten in einer PKS-Domäne vereinigt werden.

Eingegangen am 5. August 2014,
veränderte Fassung am 4. September 2014
Online veröffentlicht am 19. Oktober 2014

Stichwörter: Biokatalyse · Cyclasen · Dehydratasen · Heterocyclen · Polyketide

- [1] a) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416; b) K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925–936; c) S. Dutta, J. R. Whicher, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, G. R. Congdon, A. R. H. Narayan, K. Hakansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, G. Skiniotis, *Nature* **2014**, *510*, 512–517; d) J. R. Whicher, S. Dutta, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, A. M. Dosey, A. R. H. Narayan, K. Hakansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, G. Skiniotis, *Nature* **2014**, *510*, 560–564; e) C. Khosla, D. Herschlag, C. E. Cane, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2875–2883; f) C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811.
- [2] a) T. Bretschneider, J. B. Heim, D. Heine, R. Winkler, B. Busch, B. Kusebauch, T. Stehle, G. Zocher, C. Hertweck, *Nature* **2013**, *502*, 124–128; b) P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13215–13218; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 13457–13460; c) T. A. M. Gulder, M. F. Freeman, J. Piel, *Top. Curr. Chem.* **2010**, *297*, 149–201.
- [3] a) P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, E. S. Lander, *Cell* **2009**, *138*, 645–659; b) B. A. DeChristopher, B. A. Loy, M. D. Marsden, A. J. Schrier, J. A. Zack, P. A. Wender, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 705–710.
- [4] a) M. E. A. Richter, N. Traitcheva, U. Knüpfer, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8872–8875; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9004–9007; b) S. M. Cooper, W. Laosripaiboon, A. S. Rahman, J. Hothersall, A. K. El-Sayed, C. Winfield, J. Crosby, R. J. Cox, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 825–833; c) A. Minami, M. Shimaya, G. Suzuki, A. Migita, S. S. Shinde, K. Sato, K. Watanabe, T. Tamura, H. Oguri, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246–7249; d) P. F. Leadlay, J. Staunton, M. Oliynyk, C. Bisang, J. Cortés, E. Frost, Z. A. Hughes-Thomas, S. G. Kendrew, J. B. Lester, P. F. Long, H. A. I. MacArthur, E. L. McCormick, Z. Oliynyk, C. B. W. Stark, C. J. Wilkinson, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 360–367.
- [5] a) A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1662–1668; b) W. C. Smith, L. Xiang, B. Shen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1809–1817; c) J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14002–14007; d) J. Piel, D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzer, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16222–16227; e) S. Sudek, N. B. Lopanik, L. E. Waggoner, M. Hildebrand, C. Anderson, H. Liu, A. Patel, D. H. Sherman, M. G. Haygood, *J. Nat. Prod.* **2006**, *70*, 67–74; f) C. Li, K. E. Roeger, W. L. Kelly, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1064–1072; g) H. Irschik, M. Kopp, K. J. Weissman, K. Buntin, J. Piel, R. Müller, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840–1849; h) M. E. Yurkovich, P. A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborsky, K. Kamiya, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 66–71; i) M. A. Matilla, H. Stöckmann, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39125–39138.
- [6] a) B. M. Harvey, T. Mironenko, Y. Sun, H. Hong, Z. Deng, P. F. Leadlay, K. J. Weissman, S. F. Haydock, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 703–714; b) B. Julien, Z.-Q. Tian, R. Reid, D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286.
- [7] a) D. T. Connor, R. C. Greenough, M. von Strandtmann, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3664–3669; b) P. Knauth, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1182–1190; c) K. Kojima, Y. Takano, A. Yoshimi, C. Tanaka, T. Kikuchi, T. Okuno, *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1785–1796; d) P. J. Westfall, D. R. Ballon, J. Thorner, *Science* **2004**, *306*, 1511–1512.
- [8] a) F. Taft, M. Brunjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812–3813; b) J. Moldenhauer, D. C. G. Götz, C. R. Albert, S. K. Bischof, K. Schneider, R. D. Süßmuth, M. Engeser, H. Gross, G. Bringmann, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465–1467; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1507–1509; c) B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1460–1464; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1502–1506.
- [9] a) O. Vergnolle, F. Hahn, A. Baerga-Ortiz, P. F. Leadlay, J. N. Andexer, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1011–1014; b) N. Kandziora, J. N. Andexer, S. J. Moss, B. Wilkinson, P. F. Leadlay, F. Hahn, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3563–3567; c) C. R. Valenzano, Y.-O. You, A. Garg, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14697–14699; d) X. Guo, T. Liu, C. R. Valenzano, Z. Deng, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14694–14696; e) D. Gay, Y.-O. You, A. Keatinge-Clay, D. E. Cane, *Biochemistry* **2013**, *52*, 8916–8928.
- [10] a) R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79; b) P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657; c) A. Kitsche, M. Kalesse, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851–865.
- [11] CCDC 1017520 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.
- [12] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012–4022; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086–4096.