

Einblicke in die Pamamycin-Biosynthese

Yuriy Rebets, Elke Brötz, Niko Manderscheid, Bogdan Tokovenko, Maksym Myronovskiy, Peter Metz, Lutz Petzke* und Andriy Luzhetskyy**

Abstract: Pamamycine sind Makrodiolide polyketider Herkunft, die antibakteriell wirken. Es wurde postuliert, dass ihre Biosynthese Succinat als Baustein verwendet. Jedoch war der Mechanismus des Succinat-Einbaus in ein Polyketid unklar. Hier berichten wir über die Identifizierung eines Pamamycin-Biosynthese-Genclusters durch Vergleich der Genome zweier Pamamycin-produzierender Stämme. Dieses einzigartige Cluster enthält Polyketid-Biosynthese(PKS)-Gene, die für sieben verschiedene Ketosynthase(KS)-Enzyme codieren und ein Gen, das ein Acyl-Transporter-Protein (ACP) codiert. Ein Cosmid, welches das vollständige Set an Genen zur Pamamycin-Biosynthese trägt, wurde erfolgreich in einem heterologen Wirt exprimiert. Genetische und biochemische Studien führten zur vollständigen Aufklärung der Pamamycin-Biosynthese. Diese führt über 3-Oxoacidyl-CoA, ein Schlüsselintermediat des Abbaus von aromatischen Verbindungen des Primärstoffwechsels, das in der Polyketid-Synthese den Einbau von Succinat ermöglichen könnte.

Pamamycine (**1**) sind eine Gruppe der Makrodiolid-Antibiotika, die von mehreren *Streptomyces*-Spezies hergestellt werden (Abbildung 1 und S1). Sie wurden durch ihre Fähigkeit, das Wachstum des Luft-Myzels von *Streptomyces alboniger* DSMZ40043 zu stimulieren, entdeckt und können nachweislich das Wachstum von Gram-positiven Bakterien und Pilzen hemmen.^[1] Anfänglich wurde eine Substanz mit der Struktur Pamamycin-607 ($R^1-R^4=Me$, $R^5=H$) aus *S. alboniger* isoliert,^[1b] jedoch zeigte eine erneute Untersuchung von Extrakten eine größere chemische Diversität von **1** durch unterschiedliche Seitenkettensubstituenten (Abbildungen 1 und S1).^[2] Die Verbindungen **1** sind aus zwei asymmetrischen Teilen, einer kleinen Hydroxysäure (**3**) und einer großen Hydroxysäure (**4**), zusammengesetzt (Schema 1). Die ausgeprägte biologische Aktivität und die herausfordernde Molekülstruktur dieser Naturstoffe haben intensive Bemühungen

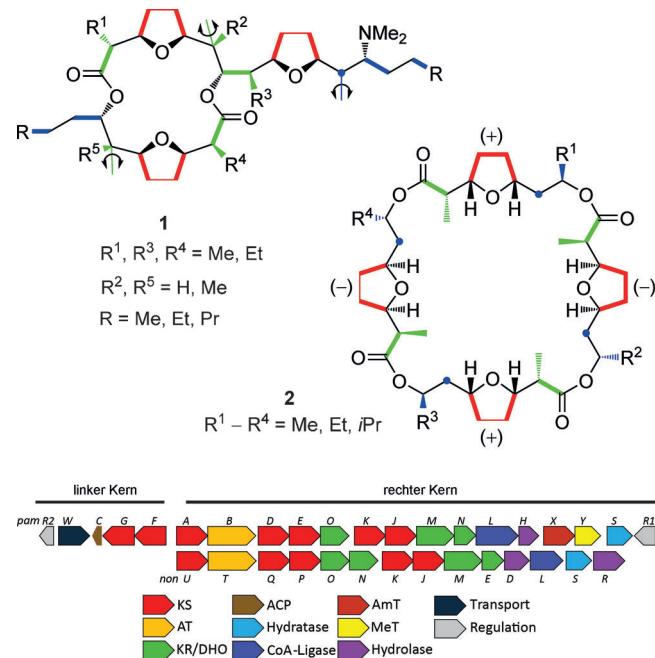


Abbildung 1. Strukturen von **1** und **2** und die genetische Anordnung der entsprechenden Biosynthesegenecluster. Die Herkunft der Kohlenstoffatome ist farbig codiert: blau – Acetat, grün – Propionat, rot – Succinat.^[6,7] Pfeile weisen auf eine Decarboxylierung hin. Die gefolgte Funktion der Gene basiert auf Biosynthesestudien für **2** und Sequenzhomologie. KS – Ketosynthase, AT – Acyltransferase, KR/DHO – Ktreduktase/Dehydrogenase, ACP – Acyl-Transporterprotein, AmT – Ami-notransferase, MT – Methyltransferase.

hinsichtlich ihrer Synthese ausgelöst,^[3] die bereits zur Totalsynthese von Pamamycin-607^[4] und einigen Homologen führten.^[5] Fütterungsversuche zeigten eindeutig die polyketide Herkunft von **1** durch den Einbau von ^{13}C -markiertem Acetat, Propionat und Succinat.^[6] Diese Tatsache ist besonders interessant, da Succinat nicht direkt durch eine Claisen-Kondensation eingebaut werden kann. Im Hinblick darauf blieben die biochemische Reaktion sowie das dazugehörige Enzym bisher unentdeckt.

Die einzigen anderen Naturstoffe, die Succinat als Baustein verwenden, sind die Makrotetrolid-Antibiotika wie Nonactin ($R^1-R^4=Me$; **2**), welche von *S. griseus* und *S. fulvissimus* hergestellt werden (Abbildung 1).^[7,8] Die Verbindungen **2** bestehen aus zwei enantiomeren Hydroxysäuren mit Tetrahydrofuran-Ringen, die stereospezifisch in das Endprodukt eingebaut werden. Das Gencluster zur Biosynthese von **2** (*non*) enthält 5-Ketosynthase(KS)-Gene.^[9]

Diese atypischen KS wurden als nichtiterative Typ-II-PKS aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit klassifiziert, obwohl ein Fehlen von ACP durch heterologe Expression und Dele-

[*] Dr. Y. Rebets, Dr. E. Brötz, N. Manderscheid, Dr. B. Tokovenko, Dr. M. Myronovskiy, Dr. A. Luzhetskyy
Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland
Metabolisches Engineering von Aktinomyzeten
UdS Campus, C2 3, 66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: andriy.luzhetskyy@helmholtz-hzi.de

Dr. L. Petzke
BASF AG (Deutschland)
E-Mail: lutz.petzke@bASF.com

Prof. Dr. P. Metz
Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie
Organische Chemie I
Technische Universität Dresden, 01062 Dresden (Deutschland)
E-Mail: peter.metz@chemie.tu-dresden.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408901> zu finden.

tionsexperimente bewiesen wurde.^[9a,b] Ausgiebige Studien mit ¹³C-markierten Vorstufen zeigten nicht nur, dass Acetat und Succinat als Bausteine zur Herstellung von **2**^[7] verwendet werden, sondern auch, dass 3-Oxoadipat als Vorstufe für **2**^[10] direkt eingebaut wird, was zu der Annahme führt, dass der erste verbindliche Schritt in der Biosynthese die Kondensation von Succinat und Malonat ist. Jedoch zeigte das Markierungsmuster von 3-Oxoadipat, das in dieser Studie verwendet wurde, nicht, wie diese Zwischenstufe von der Biosynthesemaschinerie für **2** hergestellt wird. Schließlich trägt das Acetat, das in Positionen von **1** und **2** inkorporiert ist, welche der von 3-Oxoadipat entsprechen, durch doppelte Decarboxylierung nur ein Kohlenstoffatom zum Produktmolekül bei. Diese ungewöhnlichen Merkmale unterscheiden die Biosynthesen von **1** und **2** von anderen Polyketiden. Trotz der Erkenntnisse über die Herkunft der Vorstufen von **1** und **2** reichen Fütterungsexperimente nicht aus, um deren Biosynthese aufzudecken. Außerdem haben die Experimente zur Inaktivierung der *non*-Gene die Hypothese zur Biosynthese der Makrotetrolide weiter verkompliziert.^[9a,11] Das Ziel dieses Projekts war die Aufklärung des Biosynthesewegs, der zur Produktion von **1** führt, mit besonderem Augenmerk auf das/die Enzym(e), das/die den Einbau von Succinat bewirken. Wir bemühen uns 1) darum, die Enzyme zu identifizieren, die in der Lage sind, Succinat als einen intakten Vier-Kohlenstoffatom-Baustein in der Biosynthese von **1** und **2** zu verwenden; 2) zu erklären, wie nur ein einzelnes Kohlenstoffatom von Acetat in das Polyketidrückgrat von **1** und **2** eingebaut werden kann; 3) die Enzyme zu identifizieren, die für die Verlängerung von **3** zu **4** durch die Hinzufügung der zweiten Succinat-Einheit verantwortlich sind; 4) den kompletten Biosyntheseweg aufzuklären, der zu **1** führt.

Um die Biosynthesegene von **1** zu identifizieren, wurden die Genome von zwei Produzentenstämmen, *S. alboniger* DSMZ40043 und *S. sp. HKI 118*, sequenziert, nach Sekundärstoffwechselgenclustern mit AntiSMASH^[12] durchsucht und miteinander verglichen, um Cluster zu identifizieren, die in beiden Stämmen vorhanden sind. Nur zwei Regionen, die für PKS und Terpenoid-Biosynthese codieren, waren in *S. alboniger* und *S. sp. HKI118* identisch. Das PKS-Gencluster von *S. alboniger* enthält 20 Gene mit den entsprechenden Gegenstücken in *S. sp. HKI118* und ist hochgradig homolog zu dem *non*-Cluster von *S. fulvissimus*^[8] und *S. griseus* subsp. *griseus*^[9] (Abbildung 1, Tabelle S3). Dieses Cluster (*pam*-Cluster) besteht aus zwei „Kernregionen“ mit KS-Genen. Der „rechte Kern“ ähnelt sehr stark den *non*-Genclustern und beinhaltet Gene für 5 KS (*pamA, D, E, K, J*), 3 KR/DHO (*pamO, M, N*), AT (*pamB*), *nonS*-artige Enoyl-CoA-Hydrolase (*pamS*, vermutlich beteiligt beim Tetrahydrofuran-Ringschluss^[13]), Acyl-CoA-Ligase (*pamL*) und ein vermeintliches Resistenzgen (*pamH*) (Abbildung 1). Zusätzlich sind noch Gene für eine Aminotransferase (AmT) und eine Methyltransferase (MT) (*pamX* und *Y*) in diesem Teil des Clusters angesiedelt. Der „linke Kern“ beinhaltet zwei KS-Gene (*pamF* und *G*) und ein ACP-Gen (*pamC*). Gene, die für ein putatives Transportprotein und zwei Transkriptionsregulatoren der TetR- und LuxR-Familien codieren, wurden ebenfalls flankierend zu den Biosynthesegegenen gefunden. Alle KS im Cluster, außer PamA, enthalten eine charakte-

ristische Triade aus CHN als aktives Zentrum, in dem vermutlich N als Bindestelle für Acyl-CoA fungiert (Tabelle S4). Dieser Aufbau des katalytischen Zentrums ist eher typisch für Typ-III-PKS-Enzyme als für Typ II, bei denen das CHH-Motiv konserviert ist.^[14]

Das *pamD*-Gen, das für eine KS des „rechten Kerns“ codiert (Abbildung 1), wurde vom Chromosom von *S. alboniger* deletiert. Diese Mutante war nicht mehr in der Lage, **1** herzustellen, was darauf hinweist, dass die identifizierte Region tatsächlich für dessen Biosynthese zuständig ist (Abbildung S2). Daraufhin wurde eine Cosmidbibliothek von *S. alboniger* erstellt und nach Klonen mit dem kompletten Satz an *pam*-Genen durchsucht. Dies geschah mittels zweier Gensonden, die das Cluster flankieren. Die Expression eines positiven Klons, genannt R2, in *S. albus* J1074 resultierte in der Produktion von **1** (Abbildung S3).

Um die aufeinanderfolgenden Biosynthesestufen für die Produktion von **1** zu bestimmen, wurde ein Satz von mutierten Cosmiden mit Deletionen der einzelnen *pam*-Gene erzeugt. Metabolite der rekombinanten *S.-albus*-Stämme, die diese Cosmide trugen, wurden mittels LC-MS untersucht (Tabelle 1). Im Gegensatz zu den Deletionen von *pamB*,

Tabelle 1: Anreicherung von **1** und deren Vorstufen produziert von *S.-albus*-Stämmen, die Cosmide mit verschiedenen *pam*-Gendeletionen tragen.

Cosmid\Substanz	1	3	4	5
R2	+	+	+	–
<i>pamC</i> ^[a]	+	+	+	–
<i>pamG</i>	–	+	–	–
<i>pamF</i>	–	+	–	–
<i>pamA</i> ^[a]	+	+	+	–
<i>pamB</i>	–	–	–	–
<i>pamD</i>	–	–	–	–
<i>pamO</i>	–	–	–	–
<i>pamK</i>	–	+	+	–
<i>pamJ</i>	–	+	+	–
<i>pamL</i>	–	+	+	–
<i>pamX</i>	–	+	–	+
<i>pamY</i>	–	+	–	+

[a] Andere *t_r* als **1**, **3** und **4** von *S.-albus*-R2.

pamD und *pamO*, die zum kompletten Erliegen der Biosynthese führten, behielten *S.-albus*-Stämme, die Cosmide mit Mutationen in *pamK*, *pamJ* und *pamL* aufwiesen, die Fähigkeit, **3** und **4** zu produzieren (Tabelle 1, Abbildung S4). Dies deutet darauf hin, dass PamB, D und O für die ersten Schritte in der Biosynthese von **1** verantwortlich sind, die für **3** und **4** dieselben sind, wohingegen PamK, PamJ und PamL an den letzten Schritten zur Bildung von **1** beteiligt sind. Eine Deletion der Aminotransferase- und Methyltransferase-Gene *pamX* und *pamY* resultierte in einer Akkumulation von **3** und der Hydroxsäure **K** (**5**) (Tabelle 1, Abbildung S5),^[15] einer nichtaminierten Vorstufe von **4**. Dies beweist, dass Aminierung und Methylierung vor der Cyclisierung zum Makrodiolid stattfinden, wie bereits zuvor postuliert.^[15] Dagegen führte die Deletion der KS-Gene *pamF* und *pamG* aus der linken „Kernregion“ des Clusters zur Anhäufung von **3**, wohingegen weder **1** noch **4** gefunden werden konnten. Dies

weist darauf hin, dass diese Enzyme zur Erweiterung von **3** zu **4** notwendig sind. Eine Deletion von *pamC*, das für ACP codiert, störte die bisherige strukturelle Vielfalt von **1**, mit einer verstärkten Akkumulation von Substanzen mit geringerem Molekulargewicht (Tabelle 1, Abbildung S6). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PamC an der Bereitstellung der Starteinheiten beteiligt ist, wie es für einige Fälle der bakteriellen Typ-III-PKS beschrieben ist.^[16]

Deletion von *pamA* führte zu einer signifikanten Reduktion der Produktion von **1** sowie Veränderungen in der strukturellen Vielfalt der angehäuften Substanzen (Tabelle 1, Abbildung S7, S8). Da postuliert wurde, dass PamA am ersten Kondensationsschritt der Biosynthese beteiligt ist, würde jegliche Störung seiner Funktion zu einem Ende der Produktion von **1** führen. Die von PamA katalysierte Kondensation von Succinat und Malonat sollte zu einer Produktion von 3-Oxoadipyl-CoA führen, das ein Schlüsselintermediat beim Abbau aromatischer Verbindungen in Bakterien ist.^[17] Eine KEGG-COMPOUND-Suche^[18] des *S. albus*-Genoms zeigte Gene, die eine Anreicherung dieses Metaboliten verursachen könnten, einschließlich des Gens zur 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase. In Abwesenheit von PamA zieht die Biosynthesemaschinerie für **1** folglich 3-Oxoadipyl-CoA aus dem Primärmetabolismus, was zu einer geringfügigen Anreicherung von **1** führt. *S. albus* mit einem fehlenden 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase-Gen wurde erzeugt. Diese Mutante war immer noch in der Lage, **1** herzustellen, wenn das *pamA*-defiziente Cosmid eingeführt wurde (Abbildung S8). Jedoch war die Produktion sehr stark reduziert. Somit ist 3-Oxoadipyl-CoA eine Schnittstelle zwischen dem Primärstoffwechsel und der Biosynthese von **1**. Die Tatsache, dass die Mutante immer noch fähig war, **1** zu produzieren, deutet auf einen alternativen Mechanismus der 3-Oxoadipat-Produktion über einen von der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase unabhängigen Prozess hin, vermutlich durch den Phenylsuccinsäure-Abbauweg.^[17]

Die Funktion von PamA in der Pamamycin-Biosynthese wurde weiterhin durch In-vitro-Rekonstruktion bewiesen. PamA wurde in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Abbildung S9). Die Enzymaktivität wurde in einem Assay getestet, der Malonyl-CoA und Succinyl-CoA enthielt. Die Reaktion wurde mittels HPLC überprüft (Abbildung 2). Fraktionen, die den detektierten Peaks entsprechen, wurden gesammelt und mittels LC-MS und einem HILIC-Ansatz analysiert.^[19] Die Bildung einer neuen Substanz mit einer HPLC-Retentionszeit (t_R) von 16.2 min und einem Adsorptionsspektrum, das typisch für CoA-Ester ist, wurde im Reaktionsgemisch nach 30 min Inkubationszeit beobachtet (Abbildung 2 E), und die Menge dieser Substanz erhöhte sich mit zunehmender Reaktionszeit. Eine HILIC-LC-MS-Analyse dieses Produkts ergab ein Signal bei m/z 909.6, was mit der Masse von 3-Oxoadipyl-CoA übereinstimmt (berechnet: m/z 909.61) (Abbildung 2 und S10). Die Seitenketten R^2 und R^5 in einigen Verbindungen **1** sind Methylgruppen (Abbildung 1), die vermutlich über die PamA-Reaktion eingebaut werden, was auf eine Enzym-Substrat-Promiskuität hindeutet. Entsprechend produziert PamA, das mit Succinyl-CoA und Methylmalonyl-CoA statt Malonyl-CoA inkubiert wurde, eine neue Substanz mit $t_R = 17.1$ min und m/z 924.

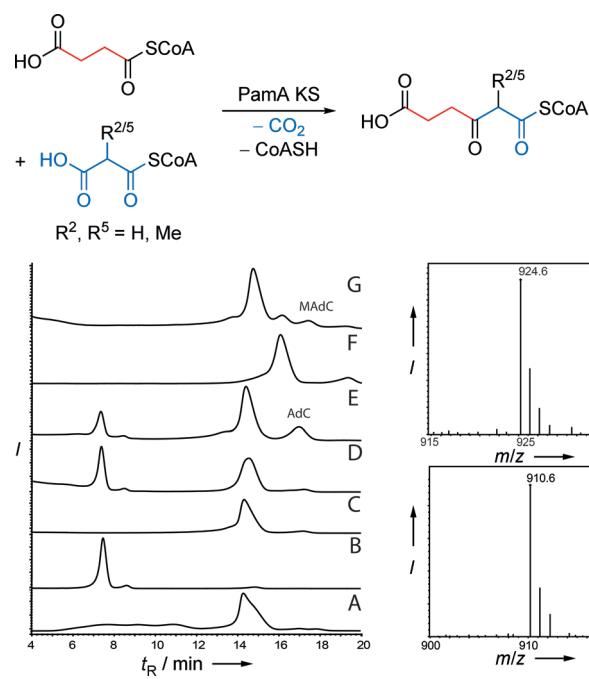
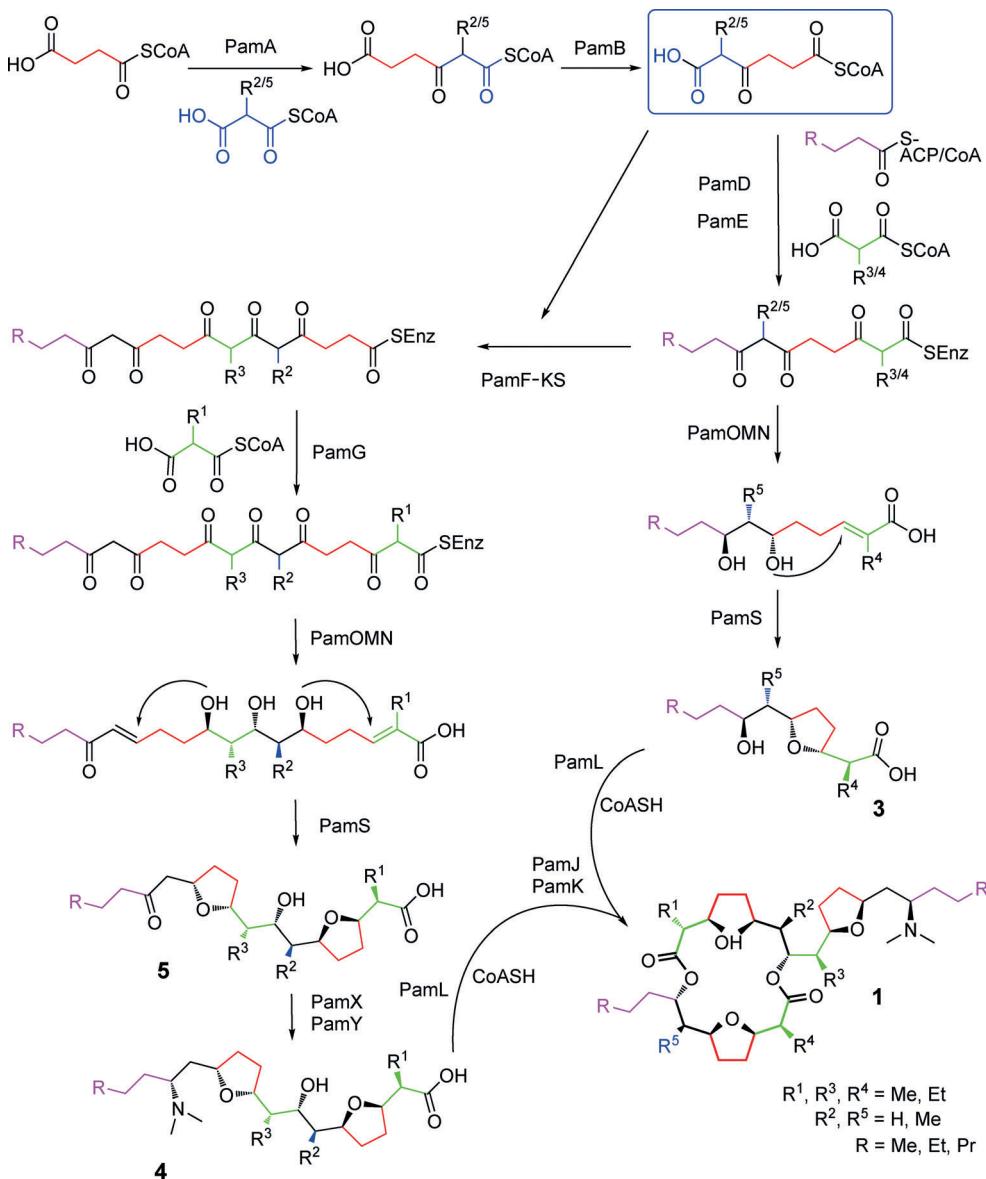


Abbildung 2. HPLC-Profil der CoA-Ester-Standards und Reaktionsgemische, die das PamA-Protein enthalten. A) CoA-SH, B) Malonyl-CoA, C) Succinyl-CoA, D) Reaktionsgemisch mit durch Hitze inaktiviertem PamA, E) Reaktionsgemisch mit PamA, F) Methylmalonyl-CoA, G) Reaktionsgemisch mit PamA und Malonyl-CoA ersetzt durch Methylmalonyl-CoA. AdC – 3-Oxoadipyl-CoA, MAadC – 2-Methyl-3-oxoadipyl-CoA.

(Abbildung 2 und S11). Dieser m/z -Wert stimmt mit der Masse von 2-Methyl-3-oxoadipyl-CoA überein (berechnet: m/z 925.64). Wenn die Reaktion in Gegenwart von sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA-Substraten durchgeführt wurde, war das Verhältnis der Produkte abhängig vom ursprünglichen Verhältnis der Substrate (Abbildung S12). Anders als NonU, das spezifisch für Malonat zu sein scheint, da keine Version von **2** mit Seitenkettensubstituenten bekannt ist, ist PamA somit flexibler in der Wahl seiner Substrate. Weiterhin konnte ein Einbringen von *nonU* in den *pamA*-Mutantenstamm nicht das ursprüngliche Spektrum der Produktion von **1** wiederherstellen, was daran liegt, dass NonU kein 2-Methyl-3-oxoadipat produzieren kann (Tabelle S5). Die Fähigkeit von NonU, 3-Oxoadipyl-CoA zu produzieren, wird von seiner Versorgung durch den Primärstoffwechsel kaschiert.

Durch Nutzung der gewonnenen genetischen und biochemischen Daten wurde der komplette Weg zur Bildung von **1** postuliert (Schema 1). Die erste Reaktion in der Biosynthese ist die von PamA katalysierte Kondensation von Succinyl-CoA mit Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA. Die resultierenden Substanzen werden anschließend von der PamB-Acyltransferase gedreht, wie von Rong et al. postuliert.^[20] Das resultierende 4-Oxoadipyl-CoA und 5-Methyl-4-oxoadipyl-CoA sind Schlüsselintermediate im Biosyntheseweg von **1** und werden als Bausteine der Claisen-Kondensation verwendet, die den Einbau von Succinat vermittelt. PamD katalysiert die erste Elongation einer kurzkettigen Acyl-Starteinheit mit einer dieser Substanzen, gefolgt von der



Schema 1. Vorgeschlagener Biosyntheseweg von **1**.

PamE-katalysierten Addition von Malonyl-CoA. Die Starteinheiten werden vermutlich als ACP-Ester bereitgestellt.^[16] Nach diesem Schritt teilt sich die Biosynthese in zwei Wege. In einem resultiert die Aktivität der KR PamO, M und N verbunden mit dem Ringschluss zum Tetrahydrofuranring durch PamS in der Bildung von **3**. Im anderen Weg addiert PamF das zweite Moleköl Adipat gefolgt von der letzten Verlängerung mit Malonat, die von PamG katalysiert wird. Die Ketoreduktion und Cyclisierung zum Tetrahydrofuranring durch PamO, M, N und S resultieren in der Bildung von **5**, das weiterhin von PamX und PamY reduktiv aminiert bzw. methyliert wird, um **4** zu produzieren. Sowohl **3** als auch **4** werden von PamL, einer Acyl-CoA-Ligase, reaktiviert. Die Fütterung einer Mischung der freien Säuren zur *S.-albus*-Kultur, welche die Gene *pamL*, *pamJ* und *K* exprimiert, führte zur Bildung von **1** (Abbildung S13). Der Ringschluss zum Makrodiolid **1** wird von den KS PamJ und PamK ver-

mittelt, die eine ungewöhnliche C–O-Kondensation katalysieren.^[11b]

Zusammengefasst wurde das Biosynthesegencluster des ungewöhnlichen Polyketid-Sekundärmetaboliten **1** kloniert, und die Schritte zu dessen Biosynthese wurden aufgeklärt. Insbesondere wurde der Mechanismus des Succinat-Einbaus in das Polyketidrückgrat über 3-Oxoacidyl-CoA demonstriert, das einen neuen Knotenpunkt zwischen dem Sekundär- und Primärmetabolismus darstellt. Soweit wir wissen, ist PamA das erste untersuchte Enzym, das den Einbau von Succinat in ein Polyketid-Moleköl vermittelt. Dieselbe Kondensation tritt auch bei der Biosynthese von **2** und einer Makrodiolid-Verbindung auf, die aus zwei Homononactinsäure-Molekülen besteht.^[21] Die Biosynthesegene, die für die Produktion der letzteren Verbindungen zuständig sind, könnten frühe Vorstufen der *pam*- und *non*-Gencluster sein. Die Biosynthese dieser Verbindungen ist ein interessantes Beispiel für die Nutzung unüblicher Substrate, um die strukturelle Diversität von Polyketid-Naturstoffen zu vergrößern. Zusätzlich werden die charakterisierten *pam*-Gene die Möglichkeiten der kombinatorischen Biosynthese neuer Polyketide in hohem Maße erweitern.

Eingegangen am 8. September 2014,
veränderte Fassung am 7. November 2014
Online veröffentlicht am 23. Dezember 2014

Stichwörter: Biosynthesen · Polyketide · Polyketid-Synthasen · *Streptomyces* · Succinat

- [1] a) P. A. McCann, B. M. Pogell, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 673–678;
b) S. Kondo, K. Yasui, M. Natsume, M. Katayama, S. Marumo, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1196–1204; c) P. Lefevre, P. Peirs, M. Braibant, M. Fauville-Dufaux, R. Vanhoof, K. Huygen, X. M. Wang, B. Pogell, Y. Wang, P. Fischer, P. Metz, J. Content, *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 824–827.

- [2] a) M. Natsume, K. Yasui, S. Kondo, S. Marumo, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3087–3090; b) M. Natsume, J. Tazawa, K. Yagi, H. Abe, S. Kondo, S. Marumo, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1159–1164; c) I. Kozone, N. Chikamoto, H. Abe, M. Natsume, *J. Antibiot.* **1999**, 52, 329–331.
- [3] a) P. Metz, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 244, 215–249; b) E. J. Kang, E. Lee, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4348–4378.
- [4] a) O. Germay, N. Kumar, E. J. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4969–4974; b) E. Lee, E. J. Jeong, E. J. Kang, L. T. Sung, S. K. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10131–10132; c) Y. Z. Wang, H. Bernsmann, M. Gruner, P. Metz, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7801–7804; d) S. H. Kang, J. W. Jeong, Y. S. Hwang, S. B. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1392–1395; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1450–1453; e) E. J. Jeong, E. J. Kang, L. T. Sung, S. K. Hong, E. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14655–14662; f) S. Lanners, H. Norouzi-Arasi, X. J. Salom-Roig, G. Hanquet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7086–7089; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 7216–7219.
- [5] a) P. Fischer, A. B. G. Segovia, M. Gruner, P. Metz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6231–6234; *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6387–6390; b) G. B. Ren, Y. K. Wu, *Org. Lett.* **2009**, 11, 5638–5641; c) G. B. Ren, Y. X. Huang, Y. P. Sun, Z. H. Li, Y. K. Wu, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 5048–5064; d) P. Fischer, M. Gruner, A. Jager, O. Kataeva, P. Metz, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 13334–13340.
- [6] M. Hashimoto, H. Komatsu, I. Kozone, H. Kawaide, H. Abe, M. Natsume, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, 315–320.
- [7] a) D. M. Ashworth, C. A. Clark, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 1461–1467; b) D. M. Ashworth, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 1327–1329; c) D. M. Ashworth, J. A. Robinson, D. L. Turner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 491–493; d) D. M. Ashworth, J. A. Robinson, D. L. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, 1719–1727.
- [8] M. Myronovskyi, B. Tokovenko, N. Manderscheid, L. Petzke, A. Luzhetsky, *J. Biotechnol.* **2013**, 168, 117–118.
- [9] a) H. J. Kwon, W. C. Smith, L. K. Xiang, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3385–3386; b) R. J. Walczak, A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 183, 171–175; c) A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1662–1668.
- [10] M. E. Nelson, N. D. Priestley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2894–2902.
- [11] a) R. J. Walczak, M. E. Nelson, N. D. Priestley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10415–10416; b) H. J. Kwon, W. C. Smith, A. J. Scharon, S. H. Hwang, M. J. Kurth, B. Shen, *Science* **2002**, 297, 1327–1330.
- [12] K. Blin, M. H. Medema, D. Kazempour, M. A. Fischbach, R. Breitling, E. Takano, T. Weber, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, W204–212.
- [13] A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1662–1668.
- [14] S. G. Van Lanen, B. Shen, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2008**, 11, 186–195.
- [15] M. Hashimoto, I. Kozone, H. Kawaide, H. Abe, M. Natsume, *J. Antibiot.* **2005**, 58, 722–730.
- [16] a) L. J. Song, F. Barona-Gomez, C. Corre, L. K. Xiang, D. W. Udwary, M. B. Austin, J. P. Noel, B. S. Moore, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14754–14755.
- [17] E. Díaz, J. I. Jiménez, J. Nogales, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24, 431–442.
- [18] M. Hattori, Y. Okuno, S. Goto, M. Kanehisa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11853–11865.
- [19] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* **2011**, 692, 1–25.
- [20] J. Rong, M. E. Nelson, B. Kusche, N. D. Priestley, *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 2009–2012.
- [21] H. R. Jois, A. Sarkar, S. Gurusiddaiah, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, 30, 458–464.