

Strukturelle Charakterisierung von O- und C-glycosylierenden Varianten der Landomycin-Glycosyltransferase LanGT2^{**}

Heng Keat Tam, Johannes Härtle, Stefan Gerhardt, Jürgen Rohr, Guojun Wang, Jon S. Thorson, Aurélien Bigot, Monika Lutterbeck, Wolfgang Seiche, Bernhard Breit,* Andreas Bechthold* und Oliver Einsle*

Abstract: Strukturen der O-Glycosyltransferase LanGT2 und der generierten C-Glycosyltransferase LanGT2S8Ac zeigen, dass der Austausch eines kurzen Peptidfragments die Funktionalität eines Enzyms deutlich verändern kann. Eine synthetische TDP-Carbaolivose wurde mit den Enzymen kokristallisiert. Es zeigte sich, dass die Bindung des Carbazuckers zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt, die dann eine Bindestelle für ein Aglykonsubstrat erzeugt. Obwohl eine Bindung des Aglykons nicht experimentell nachgewiesen wurde, deuten Docking-Studien auf unterschiedliche Bindungsmodi im Fall von O- bzw. C-Glycosylierung hin.

Glycosyierte Naturstoffe spielen eine große Rolle in der Antiinfektivatherapie und zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Sehr häufig hängt die Wirksamkeit der Verbindung vom ankondensierten Zucker ab.^[1] In einigen Fällen ist die Glycosylierung eines Naturstoffs jedoch auch ein Resistenzmechanismus des Naturstoffproduzenten.^[2] Die stereo- und regiospezifische Glycosylierung wird durch Gly-

cosyltransferasen (GTs) katalysiert. Glycosylierungen finden häufig zu einem späten Zeitpunkt der Biosynthese statt, wobei durchaus sehr komplexe Naturstoffglyka (z.B. Polyketidderivate) als Substrate verwendet werden. Da O-Glycosyltransferasen oft eine gewisse Flexibilität bezüglich ihrer Substrate aufweisen, wurden zahlreiche In-vitro- und In-vivo-Strategien zur Erzeugung neuer glycosylierter Naturstoffe entwickelt.^[3] Dies führte dazu, dass Substanzbibliotheken mit glycosylierten Vertretern von therapeutisch interessanten Naturstoffen hergestellt werden konnten. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um O-glycosyierte, selten um N-glycosyierte Verbindungen.^[4] Die Bedeutung dieser Substanzbibliotheken wäre sicher als noch höher einzuschätzen, wenn auch C-glycosyierte Verbindungen erzeugt werden könnten.^[5] LanGT2 ist eine O-Glycosyltransferase (O-GT), die den ersten Glycosylierungsschritt während der Landomycin-Biosynthese katalysiert. LanGT2 weist 53 % identische Aminosäuren zu der C-Glycosyltransferase (C-GT) UrdGT2 auf, die an der Urdamycin-Biosynthese beteiligt ist. Beide Enzyme katalysieren den Transfer von D-Olivose an ein Angucyclin-Aglykon (Abbildung 1). LanGT2 katalysiert dabei

[*] Dr. H. K. Tam, Dr. S. Gerhardt, Prof. Dr. O. Einsle
Institut für Biochemie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: einsle@biochemie.uni-freiburg.de

Dr. J. Härtle, Prof. Dr. A. Bechthold
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: andreas.bechthold@pharmazie.uni-freiburg.de

Prof. Dr. J. Rohr, G. Wang, Prof. Dr. J. S. Thorson
Center for Pharmaceutical Research and Innovation
University of Kentucky College of Pharmacy, Lexington, KY (USA)

Dr. A. Bigot, M. Lutterbeck, Dr. W. Seiche, Prof. Dr. B. Breit
Institut für Organische Chemie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: bernhard.breit@chemie.uni-freiburg.de

Prof. Dr. O. Einsle
BIOS Centre for Biological Signalling Studies
Hebelstraße 25, 79104 Freiburg (Deutschland)

[**] Die Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GSC-4, Spemann Graduate School of Biology and Medicine, SGBM), durch die NIH (GM 105977-01A1 an J.R. und R37 AI52218 an J.S.T.) und durch ein EMBO „Short Term Fellowship“ (ASTF 261-2012) an H.K.T. gefördert. Wir bedanken uns bei den Mitarbeitern der Schweizer Synchrotron-Strahlungsquelle (PSI, Villigen) für die Zusammenarbeit.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409792> zu finden.

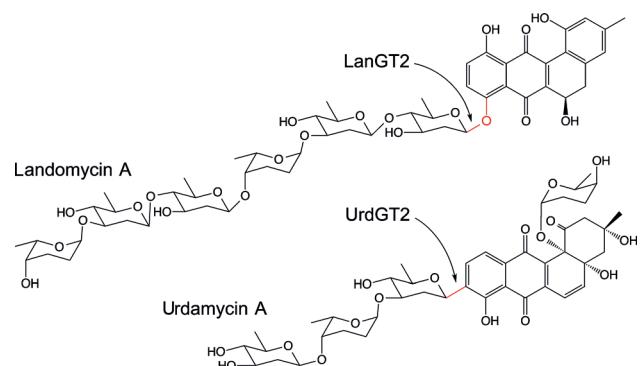


Abbildung 1. Strukturen der Angucycline Landomycin A und Urdamycin A. Die O-GT LanGT2 katalysiert eine O-glycosidische Verknüpfung einer D-Olivose, UrdGT2 katalysiert die C-glycosidische Verknüpfung einer D-Olivose. In beiden Fällen ist das Aglykon ein Angucyclinderivat.

den Transfer des Zuckers an die C8-OH-Gruppe, während UrdGT2 den Transfer des Zuckers an C9 katalysiert. In beiden Fällen kommt es zur Inversion des anomeren Sterozentrum.

Das natürliche Aglykonsubstrat für UrdGT2 ist 2-Hydro-3-hydroxyprejadomycin (UWM6),^[6] das natürliche Substrat für LanGT2 ist unbekannt. Die Expression von *urdGT2* in einer *lanGT2*-Mutante von *S. cyanogenus* S136

führte zur Bildung von 9-C-Olivosyltetraglucoside. Die Expression von *lanGT2* in derselben Mutante führte zur Bildung von 8-O-Olivosyl-D-11-deoxylandomycinon.^[7] Um die Substratspezifität beider GTs zu verändern wurden Sequenzvarianten beider Enzyme hergestellt.^[8] Ziel war es, eine C-glycosylierende Variante von LanGT2 zu generieren. Dies konnte durch Einbau der Aminosäuren (⁵¹VAT-TDLPPIRHF⁶²) von UrdGT2 in LanGT2 erfolgreich erreicht werden.^[7b] Außerdem konnte die Aktivität durch die Einführung eines Alaninrests an Position 8 in LanGT2 (Name des Enzyms: LanGT2S8Ac) erheblich gesteigert werden.^[7b] Es ist anzumerken, dass die C-GTs UrdGT2, SimB7, HedL und SsfS6 alle entweder ein Alanin oder ein Glycin an den jeweiligen Positionen aufweisen.^[9] In einer sehr ähnlichen Weise konnte kürzlich die O-GT *PcOGT* aus *Pyrus communis* in eine C-GT umgewandelt werden.^[10] Die molekularen Grundlagen von O-GTs und C-GTs sind noch wenig verstanden. In dieser Publikation beschreiben wir die Strukturen von LanGT2 und LanGT2S8Ac in Komplexen mit TDP-Carba-D-Olivose und TDP. Basierend auf unseren Daten schlagen wir vor, dass sowohl O-GTs als auch C-GTs bestimmte konservierte Aminosäuren für Säure-Base katalysierte Reaktionen verwenden. Das Geheimnis der O- bzw. C-Glycosylierung liegt in der spezifischen Orientierung des aktivierten Zuckers zum Aglykon begründet. In LanGT2S8Ac führten die Veränderungen zu einer Neuorientierung des Aglykons und daraus folgernd zur C-Glycosylierung. Mit unserer Studie können wir den Wechsel von O- zu C-Glycosylierung strukturell nachvollziehen, und wir legen somit den Grundstein für die rationelle Herstellung von C-GTs.

LanGT2 und LanGT2S8Ac wurden kristallisiert, und ihre Strukturen wurden mittels Röntgendiffraktometrie aufgeklärt. Beide Enzyme zeigen die für GTs ihrer Klasse typische Zweidomänenarchitektur. Am N-terminalen Bereich bindet das Aglykon, am C-terminalen Bereich der nukleotidaktivierte Zucker (Abbildung 2A). Die Struktur von LanGT2S8Ac ist mit der Struktur von LanGT2 nahezu identisch, sie unterscheidet sich jedoch im Bereich der Aminosäuren 51–62 (Helixstruktur; Abbildung 2B). Hier weisen auch LanGT2 und UrdGT2 große Unterschiede auf.^[8a] UrdGT2 und LanGT2S8Ac hingegen sind in diesem Bereich strukturell doch sehr ähnlich (Abbildung 2C).^[8a] Diese Beobachtung stützt unsere Hypothese, dass die Positionierung des Aglykons letztlich vorgibt, welche Art der Glycosylierungsreaktion katalysiert wird.

Die Reaktion folgt einem sequenziellen bi-bi-Mechanismus, wobei der nukleotidaktivierte Zucker vor dem Aglykon an das Enzym bindet. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, TDP-D-Olivose im Komplex mit LanGT2 und LanGT2S8Ac zu kristallisieren. Leider war TDP-D-Olivose nicht stabil genug, und es konnten nur Strukturen mit gebundenem TDP erhalten werden (Abbildung S1). Aus diesem Grund wurde nun der nichthydrolysierbare Carbazucker TDP-Carba- α -D-Olivose synthetisiert, bei dem D-Olivose durch Carba- α -D-Olivose ersetzt war, denn es wurde erwartet, dass durch den Austausch des Sauerstoffatoms gegen ein Kohlenstoffatom der „Glycosyltransfer“ nicht stattfinden kann (Schema 1).

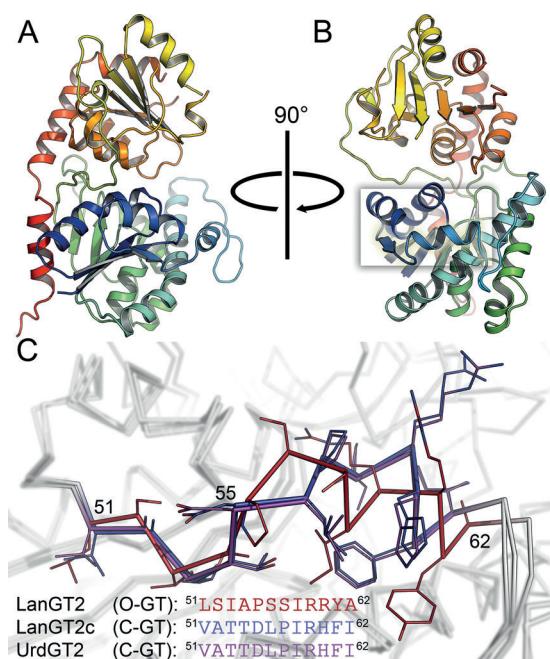
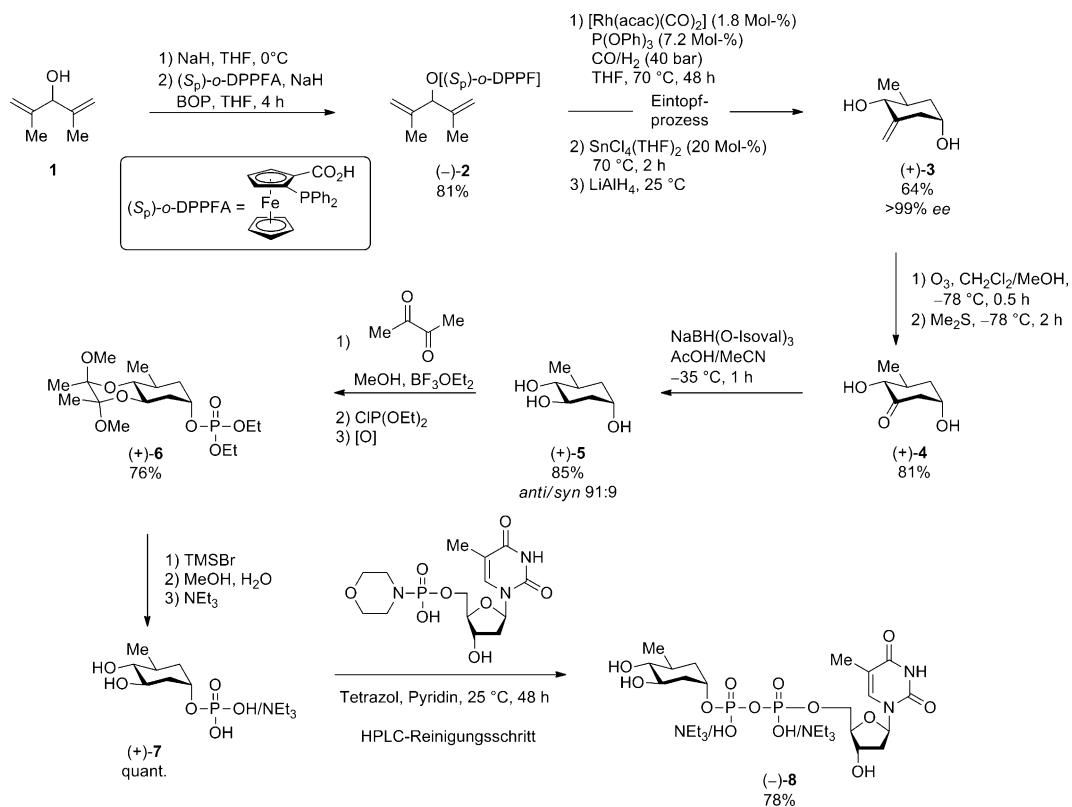


Abbildung 2. Dreidimensionale Struktur von LanGT2. A) Das LanGT2-Monomer ist farbig von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) gekennzeichnet. Das Protein lässt sich in eine Nukleotidzucker-Bindedomäne (oben) und eine Aglykon-Bindedomäne (unten), die über eine flexible Achse miteinander verbunden sind, unterteilen. B) Der im Rahmen dieser Arbeit veränderte Bereich im N-terminalen Bereich ist nach Rotation der Struktur um 90° gut erkennbar. C) Detail des veränderten Bereichs (LanGT2 (rot), LanGT2S8Ac (blau) und UrdGT2 (lila, PDB-ID: 2P6P)). Die Konformation von UrdGT2 in diesem Bereich entspricht der Konformation des chimären LanGT2S8Ac. Das Kästchen in (B) zeigt die Lage des Bereichs im Enzym an.

Als Schlüsselschritt für die gewünschte TDP-Carba- α -D-Olivose **8** verwendeten wir die kürzlich in unserem Labor entwickelte *o*-DPPF-dirigierte desymmetrisierende Hydroformylierung, gefolgt von einer intramolekularen Carbonyl-En-Reaktion im Eintopfverfahren.^[11] Danach wurde die dirigierende *o*-DPPF-Gruppe reduktiv entfernt und das Alken durch Ozonolyse oxidativ zum Keton gespalten. Eine dirigierte Keton-Reduktion lieferte das Carba- α -D-Olivose-Gerüst in guter Gesamtausbeute und Stereoselektivität. Die Einführung der Thymidindiphosphat-Einheit erfolgte unter Verwendung von Standardmethoden und ergab (–)-**8** in enantiomerenreiner Form (für Details siehe die Hintergrundinformationen).

Kristalle von LanGT2 und LanGT2S8Ac wurden in ähnlicher Weise wie zuvor mit TDP-D-Olivose mit TDP-Carba-D-Olivose getränkt bzw. kokristallisiert. Die Strukturen wurden zu einer Auflösung von 1.85 Å bis 2.22 Å verfeinert (Tabelle S1). Die Bindung von TDP war ähnlich der Bindung von TDP in anderen GTs.^[12] Neben der zusätzlichen Elektronendichte des Carbazuckers bewirkte die Bindung des Liganden eine Veränderung der Tertiärstruktur des Enzyms. Bereits die Bindung von TDP bewirkt eine interne Rotation, aus der eine Verengung der Spalte zwischen beiden Domänen resultiert. Auffallend ist, dass im TcO-Komplex die Verengung ausgeprägter ist. Es kommt hier zu einer 10°-Rotation



Schema 1. Synthese des α -D-Carbaolivose-Thymidindiphosphats **8**. acac = Acetylacetat, BOP = (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium, O-Isoval = Isovalerat, LAH = Lithiumaluminiumhydrid, THF = Tetrahydrofuran, TMS = Trimethylsilyl.

des C-Terminus bezüglich des N-Terminus (Abbildung 3 A); dies deutet auf einen auch für andere GTs beschriebenen „Induced-fit“-Mechanismus hin.^[8b,13] Im „geschlossenen Zustand“ lassen sich zusätzliche Sekundärstrukturen, vor allem ein längerer helikaler Bereich zwischen den Resten 218 und 223, beschreiben.

Bei GTs binden die Substrate nacheinander an das Enzym. Es ist anzunehmen, dass erst nach Bindung des Zuckers die Bindetasche für das Aglykon vollständig gebildet und durch Entropieeffekte stabilisiert wird. Während des Übergangs werden der Bereich S217–F223 und der Bereich ²⁸³HAGGV²⁸⁸ umorientiert, um mit dem Liganden zu wechselwirken. Die Reste S8–A12 und W136–R143 sind dabei durch Carba-D-Olivose (Abbildung S1) besetzt. Interessanterweise sind die Helices α 8a und α 8b in den Strukturen mit TDP-D-Olivose nur schlecht aufgelöst. Dies deutet darauf hin, dass die zuvor starre Struktur des Enzyms sich verändert; dieses nimmt nun eine offene Konformation an, aus der das Produkt freigesetzt werden kann (Abbildung S2).

Zwei Bereiche der Proteine sind an der TDP-Zucker-Bindung beteiligt. Der Bereich W267–D271 erkennt das Thymin des TDP. Dabei steht die Indolseitenkette des Restes W267 in π - π -Wechselwirkungen mit dem Aromaten der Base, außerdem kommt es zur Bildung von Wasserstoffbrücken. Diese Anordnung ist unter GTs der Familie GT-1 (z. B. CalG1, CalG2 und SpnG^[14]) konserviert.

Auf der Seite distal zu W267 gelegen, ist die Seitenkette von L270 über der Base angeordnet. Diese Anordnung ist charakteristisch für TDP-Zucker-verwendende GTs, z. B.

GtfA, CalG3, SpnG und SsfS6 (Abbildung 3 B).^[14,15] H283 in LanGT2 und in LanGT2S8Ac ist in Vertretern der GT-1-Familie konserviert. Es wird angenommen, dass H283 die Ladung des Phosphats während der Katalyse stabilisiert.^[16] Außerdem wird die negative Ladung des zentralen Pyrophosphats des Liganden dadurch kompensiert, dass dieser Molekülteil hin zum positiv geladenen Ende der Helix h10 des Enzyms positioniert ist. Zahlreiche Reste der Bereiche 217–220 und 283–288 in der resultierenden Bindetasche wechselwirken mit den beiden Phosphatgruppen. Dieser Bindungsmodus entspricht exakt dem für TDP alleine beobachteten (siehe Abbildung 3 B und S3). Ähnlich wie in anderen GTs erfolgt die Erkennung des Zuckers über Wasserstoffbrücken. In LanGT2 bilden nur drei Aminosäuren, A284, G286 (5'-OH) und D137 (4'-OH) Wasserstoffbrücken mit dem Zucker aus (Abbildung 3 B). Zu beachten ist, dass D137 die einzige Aminosäure der N-terminalen Aglykon-Bindedomäne ist, die mit dem Zuckerliganden wechselwirkt. Daraus lässt sich folgern, dass diese über zwei Domänen verlaufende Wechselwirkung essenziell für die beobachtete Konformationsänderung nach Bindung des Liganden ist.

Die Konformationsänderung des Enzyms hat auch Einfluss auf die Form der Bindetasche. Hier lassen sich zwischen LanGT2 und LanGT2S8c deutliche Unterschiede feststellen. Die Bindetaschen unterscheiden sich in Größe und Form, und darin begründet sich sicher auch die Tatsache, dass beide Enzyme unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Durchtränkungs- und Kokristallisationsexperimente der TcO-

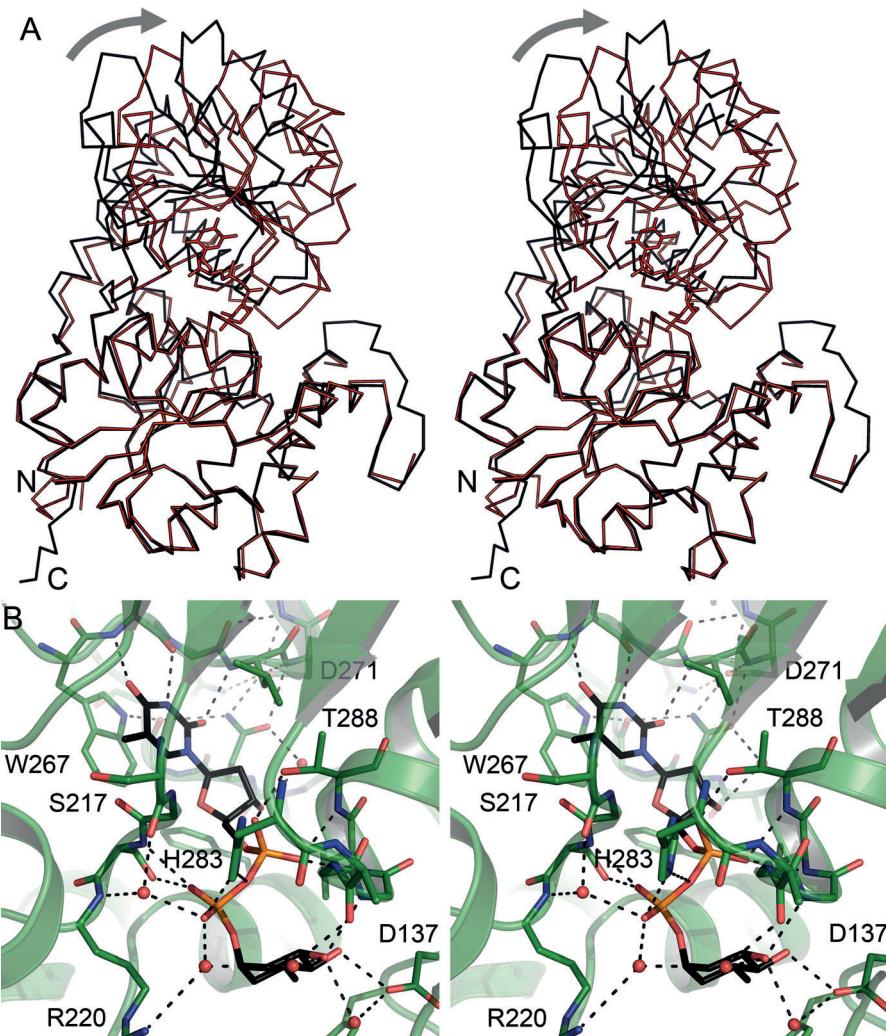


Abbildung 3. Bindung der Liganden in LanGT2. A) Stereobild einer Überlagerung der C_{α} -Ketten von LanGT2 ohne Ligand (schwarz) und von LanGT2 mit gebundener TDP-Carba-d-Olivose (TcO, rot). Der Ligand induziert eine 10° Rotation der Zuckerbindedomäne hinsichtlich der Aglykon-Bindedomäne (grauer Pfeil). B) Stereoabbildung des aktiven Zentrums von LanGT2 mit gebundenem TDP. Während die Schleifenregion 267–271 die spezifische Bindung von TDP garantiert, wird der negativ geladene Phosphodiester durch einen Helixdipol der Helix h10 (Reste 286–295) stabilisiert. Die 4'- und 5'-OH-Gruppe der Olivose werden durch G286 und D137 erkannt. Dabei ist D137 die einzige Aminosäure, die zur Bindung des Liganden herangezogen wird.

Komplexe von LanGT2 und LanGT2S8Ac mit verschiedenen Aglykonsubstraten (11-Deoxylandomycinone, Alizarin, Anhydrolandomycinone oder Tetrangulol) führten nicht zu der gesuchten Komplexstruktur. Wahrscheinlich war die Spezifität der Enzyme für die eingesetzten Aglyka zu gering. Aus diesem Grund wurden, basierend auf den bekannten Strukturen, computerchemische Liganden-Docking-Studien und ein funktionelles Screening durchgeführt.^[7b] Dabei konnten in dem Raum zwischen beiden Domänen der GTs eine Reihe von hydrophoben Resten (F83, W87, F88, M91, M116 und W136) gefunden werden, die mit 11-Deoxylandomycinone und Tetrangulol wechselwirken könnten (siehe Abbildung 4 und S4). Die Aglykon-Bindestelle von LanGT2S8Ac ist jedoch sehr viel kleiner als diejenige in LanGT2. Dies liegt vor allem in der Konformation der Helix α 3 begründet (in

diesem Bereich orientieren sich die Reste I58 und I62 der erzeugten C-GT zum Spalt hin). Der Rest D137 ist in beiden Modellen nahe der C8-OH-Gruppe der Aglyka lokalisiert. Dies bestätigt die Rolle von D137 als katalytische Base.^[7b]

Im Docking-Modell ist D137 3.4 \AA von der C8-OH entfernt lokalisiert. Es scheint, dass ein Wassermolekül benötigt wird, um das Proton zu abstrahieren, wodurch wohl der nukleophile Charakter der C8-OH-Gruppe erhöht wird. Für die Bildung einer O-glycosidischen Bindung durch LanGT2 liegt C8-OH näher am Nukleotidzucker als das *ortho*-C9-Atom (Abbildung 4A). Im Unterschied dazu liegt bei LanGT2S8Ac das C9-Atom näher am Nukleotidzucker, was zur Knüpfung einer C-C-Bindung führt (Abbildung 4B). Im Modell ist der Abstand der C8-OH-Gruppe (11-Desoxylandomycinon) bzw. des C9-Atoms (Tetrangulol) zum C1'-Atom der d-Olivose zu groß, sodass sich eine für den Glycosyltransfer notwendige Orbitalüberlappung nicht ergibt. Es ist anzunehmen, dass das Enzym für den Transfer die Flexibilität der Schleife 64–76 benötigt.

Wir haben gezeigt, wie man die Substratspezifität eines Enzyms gezielt verändern kann. Aus dem Vergleich der Sequenzen verschiedener Mitglieder einer Proteinfamilie kann man auf die die Spezifität eines Enzyms bestimmenden Aminosäuren schließen, die dann verändert werden können. Durch die Synthese und Verwendung eines nichthydrolysierbaren Carbazuckers konnten wir die Reihenfolge der Substratbindung

an das Enzym ableiten und zeigen, dass die Zuckerbindung eine Konformationsänderung induziert, die für die Substratbindung bedeutend ist. Die Substratspezifität in LanGT2S8Ac konnte dadurch verändert werden, dass in das Enzym Bereiche von UrdGT2 eingebaut wurden, sodass die Substratbindetasche modifiziert wurde. Die Bindung des Substrats entscheidet Docking-Experimenten zufolge darüber, ob eine O- oder C-glycosidische Bindung geknüpft wird.

Eingegangen am 6. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 7. Januar 2015

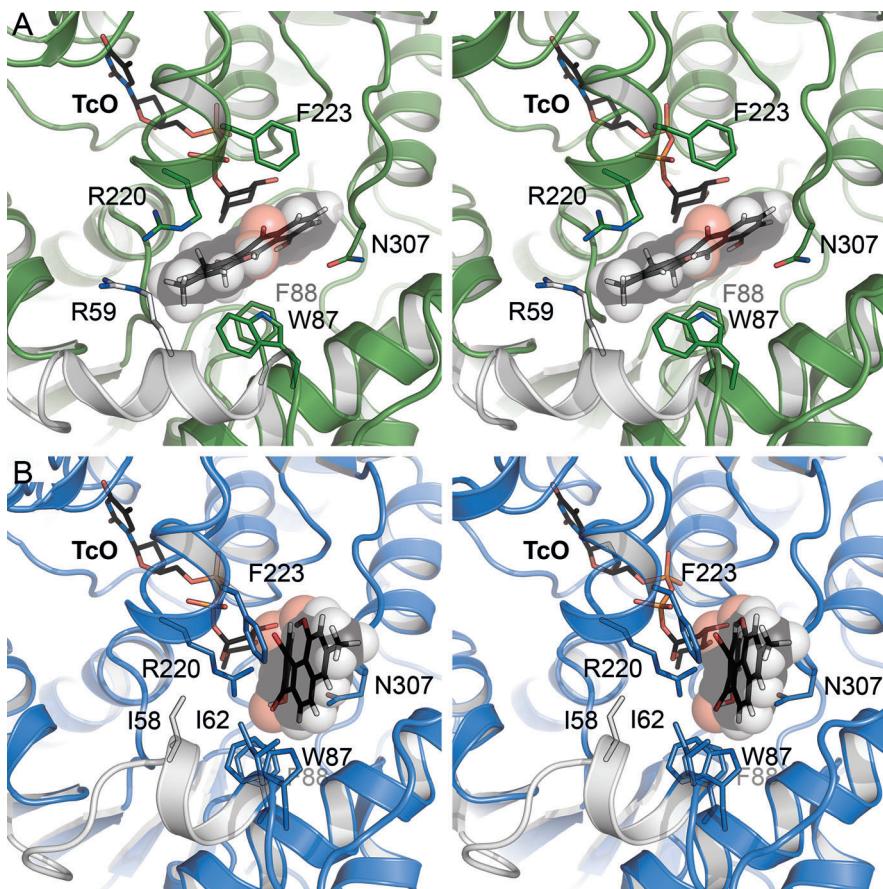


Abbildung 4. Computerchemische Analyse der Aglykon-Bindung. A) Stereobild eines Docking-Vorschlags von Desoxylandomycinone an LanGT2. Im Modell verdrängt der Ligand (gezeigt als Van-der-Waals-Kugeln) die Reste R220 und R59 und blockiert den Spalt, der von der Schleife 51–62 (weiß) gebildet wird. B) In LanGT2S8Ac wurden die Reste 51–62 von LanGT2 ersetzt (weiß); dadurch wird der Substratbindespalt geschlossen. Das molekulare Docking schlägt für Tetrangulol eine andere Bindung vor. R220 orientiert sich mehr zu beiden Substraten, sodass der Ligand anders angeordnet wird. In der angegebenen Orientierung ist die katalytische Base D137 hinter dem Liganden angeordnet.

Stichwörter: Carbazucker · C-Glycosylation · Enzym-Engineering · Friedel-Crafts-Alkylierungen · Glycosyltransferasen

- [1] a) P. L. Hamilton, D. P. Arya, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 134–143; b) V. Kren, T. Rezanka, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 858–889; c) A. C. Weymouth-Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 99–110.
- [2] C. Vilches, C. Hernandez, C. Mendez, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 161–165.
- [3] a) C. Dürr, D. Hoffmeister, S. E. Wohlert, K. Ichinose, M. Weber, U. von Mulert, J. S. Thorson, A. Bechthold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2962–2965; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3022–3025; b) R. W. Gant, R. D. Goff, G. J. Williams, J. S. Thorson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8889–8892; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9021–9024; c) D. Hoffmeister, B. Wilkinson, G. Foster, P. J. Sidebottom, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 287–295; d) S. H. Park, H. Y. Park, J. K. Sohng, H. C. Lee, K. Liou, Y. J. Yoon, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 988–994; e) G. J. Williams, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 657–662; f) S. E. Wohlert, G. Blanco, F. Lombó, E. Fernández, A. F. Braña, S. Reich, G. Udvarnoki, C. Méndez, H. Decker, J. Frevert, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10596–10601.

- [4] a) A. Luzhetskyy, C. Méndez, J. A. Salas, A. Bechthold, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 680–709; b) A. P. Salas, L. L. Zhu, C. Sanchez, A. F. Braña, J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 17–27; c) C. S. Zhang, E. Bitto, R. D. Goff, S. Singh, C. A. Bingman, B. R. Griffith, C. Albermann, G. N. Phillips, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 842–853.
- [5] a) R. W. Gant, P. Peltier-Pain, J. S. Thorson, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1811–1853; b) S. Singh, G. N. Phillips, J. S. Thorson, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1201–1237.
- [6] I. Baig, M. Kharel, A. Kobylansky, L. L. Zhu, Y. Rebets, B. Ostash, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, V. A. Fedorenko, J. Rohr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7842–7846; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8006–8010.
- [7] a) A. Luzhetskyy, T. Taguchi, M. Fedoryshyn, C. Dürr, S. E. Wohlert, V. Novikov, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1406–1410; b) J. Härle, S. Günther, B. Lauinger, M. Weber, B. Kammerer, D. L. Zechel, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 520–530; c) A. Mayer, T. Taguchi, A. Linnenbrink, C. Hofmann, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2312–2315.
- [8] a) M. Mittler, A. Bechthold, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 67–76; b) P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 53–62.
- [9] a) T. Biliqin, C. G. Hyun, J. S. Williams, A. M. Czisny, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 959–969; b) B. Faust, D. Hoffmeister, G. Weitnauer, L. Westrich, S. Haag, P. Schneider, H. Decker, E. Kunzel, J. Rohr, A. Bechthold, *Microbiology* **2000**, *146*, 147–154; c) L. B. Pickens, W. Kim, P. Wang, H. Zhou, K. Watanabe, S. Gomi, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17677–17689; d) A. Trefzer, S. Pelzer, J. Schimana, S. Stockert, C. Bihlmaier, H. P. Fiedler, K. Welzel, A. Vente, A. Bechthold, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1174–1182.
- [10] A. Gutmann, B. Nidetzky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12879–12883; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 13051–13056.
- [11] a) B. Breit, A. Bigot, *Chem. Commun.* **2008**, 6498–6500; b) B. Breit, D. Breuninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10244–10245; c) B. Breit, D. Breuninger, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3916–3929; d) B. Breit, D. Breuninger, *Synthesis* **2005**, 2782–2786.
- [12] B. Schuman, J. A. Alfaro, S. V. Evans, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *272*, 217–257.
- [13] S. Moréra, L. Larivière, J. Kurzeck, U. Aschke-Sonnenborn, P. S. Freemont, J. Janin, W. Rüger, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 569–577.
- [14] a) A. Chang, S. Singh, C. A. Bingman, J. S. Thorson, G. N. Phillips, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, *67*, 197–203; b) E. A. Isoirho, H. W. Liu, A. T. Keatinge-Clay, *Biochemistry* **2012**, *51*, 1213–1222; c) A. M. Mulichak, H. C. Losey, W. Lu, Z. Wawrzak, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9238–9243.
- [15] F. B. Wang, M. Q. Zhou, S. Singh, R. M. Yennamalli, C. A. Bingman, J. S. Thorson, G. N. Phillips, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2013**, *81*, 1277–1282.
- [16] S. Ha, B. Gross, S. Walker, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2001**, *1*, 201–213.