

Enzymatische Halogenierung

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201509573
 Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201509573

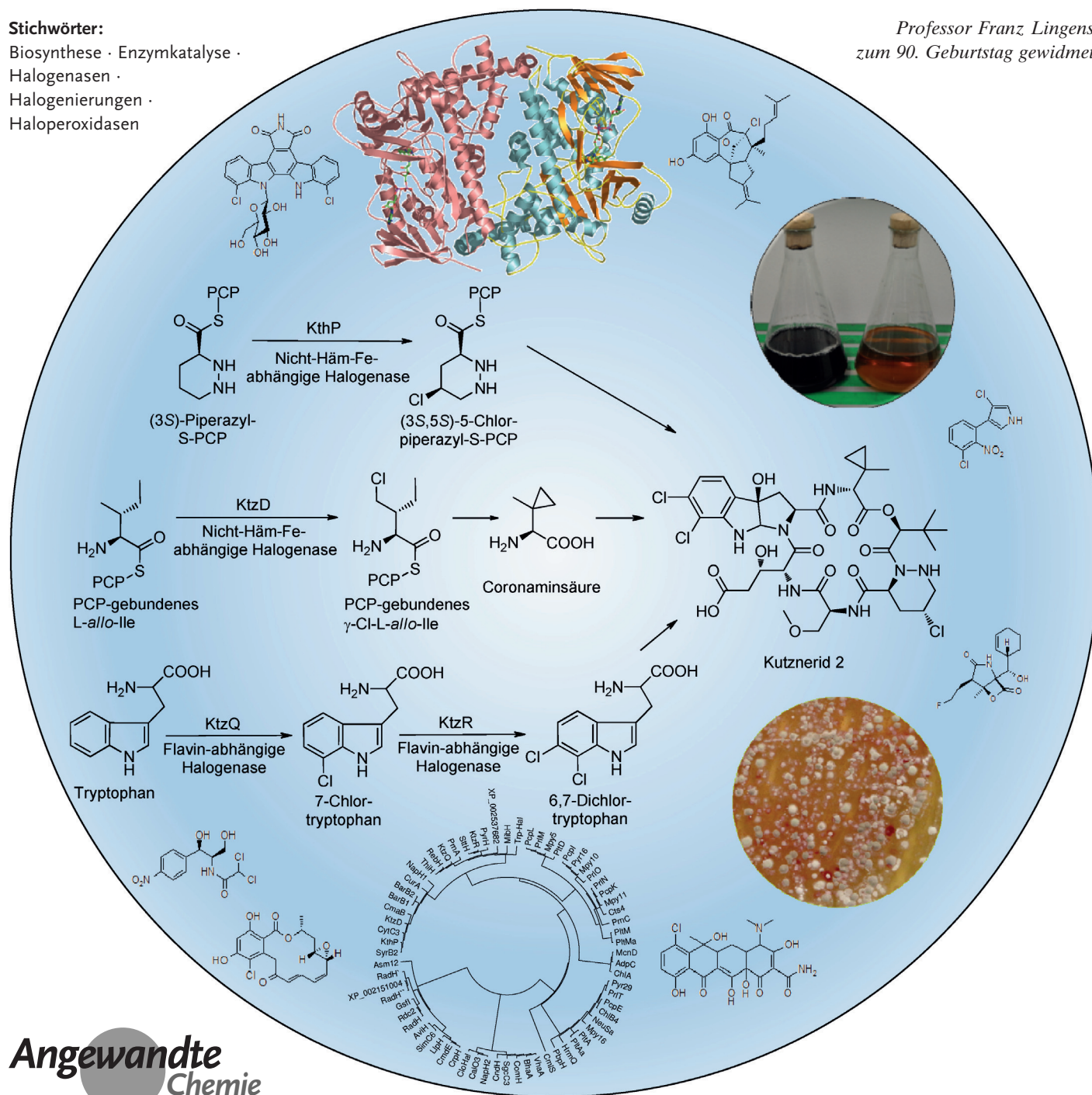
Die spezifische enzymatische Halogenierung – von der Entdeckung halogenierender Enzyme bis zu deren Anwendung in vitro und in vivo

Veit Weichold, Daniela Milbredt und Karl-Heinz van Pée*

Stichwörter:

Biosynthese · Enzymkatalyse ·
 Halogenasen ·
 Halogenierungen ·
 Haloperoxidasen

Professor Franz Lings
 zum 90. Geburtstag gewidmet



Im Verlauf der letzten 20 Jahre hat sich der Fokus von den Haloperoxidasen in Richtung der Flavin-abhängigen und der Nicht-Häm-Eisen-abhängigen Halogenasen verschoben. Für diese konnte in verschiedenen Organismen die Beteiligung an der Biosynthese halogener Metaboliten nachgewiesen werden. Während der ersten 10–12 Jahre lag der Fokus auf dem Nachweis von Halogenasen sowie der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur und des Reaktionsmechanismus. In diesem Aufsatz werden hauptsächlich Arbeiten über halogenierende Enzyme mit einem Veröffentlichungsdatum zwischen 2010 und 2015 besprochen. Sein Schwerpunkt liegt auf Arbeiten zur Aufklärung der Beteiligung halogenierender Enzyme an den Biosynthesen halogener Metaboliten, der Anwendung von Halogenasen in In-vivo- und In-vitro-Systemen, der In-vivo-Veränderung von Biosynthesewegen in Bakterien und Pflanzen, der Verbesserung der Enzymstabilität, der Erweiterung des Substratspektrums und der Verknüpfung von Biokatalyse mit chemischer Synthese zur Bildung neuer Verbindungen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung – die Entdeckung der halogenierenden Enzyme	6483
2. Neue Entwicklungen	6486
3. Ausblick	6496

1. Einleitung – die Entdeckung der halogenierenden Enzyme

1.1. Haloperoxidasen

Die Arbeiten zur biologischen Halogenierung begannen 1959 mit der Entdeckung der ersten Haloperoxidase, der Chlorperoxidase (CPO), aus dem Pilz *Caldariomyces fumago*.^[1] Etwa 35 Jahre lang waren Haloperoxidasen die einzigen bekannten halogenierenden Enzyme. Zusätzlich zu Häm-haltigen Haloperoxidasen, wie CPO, wurden auch noch Vanadium-haltige Haloperoxidasen entdeckt.^[2] Allerdings konnte für keines dieser Enzyme eine Beteiligung an der Biosynthese halogener Metaboliten zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen von CPO^[3] und von Vanadium-haltigen Haloperoxidasen^[4] und deren Reaktionsmechanismen zeigte, dass sie hypohalogenige Säure als halogenierendes Agens produzieren. Die hypohalogenige Säure diffundiert aus dem aktiven Zentrum heraus und reagiert in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit elektronenreichen Verbindungen; dies ist in Schema 1 (oben) gezeigt, in dem die allgemeinen Reaktionen, die von den verschiedenen Typen halogenierender Enzyme katalysiert werden, zusammengefasst sind. Im Verlauf dieser Arbeiten konnte weder eine spezifische Halogenidbindestelle noch eine Substratbindestelle in Haloperoxidasen gefunden werden.^[3–5] Bakterielle Enzyme, die mithilfe des Monochlordimedon-Tests, des Standard-Tests für halogenierende Enzyme in dieser Zeit,^[6] entdeckt wurden und weder Häm noch Vanadium enthielten, sind keine Peroxidasen, sondern Perhydrolasen. Diese Enzyme produzieren ebenfalls hypohalogenige Säure als eigentliches halogenierendes Agens, allerdings über die Bildung kurzkettiger aliphatischer Persäuren als Zwischenprodukte (Schema 1).^[7] Aufgrund der Bildung freier hypohalogeniger Säure als halogenierendes Agens verfügen Haloperoxidasen und Perhydrolasen über

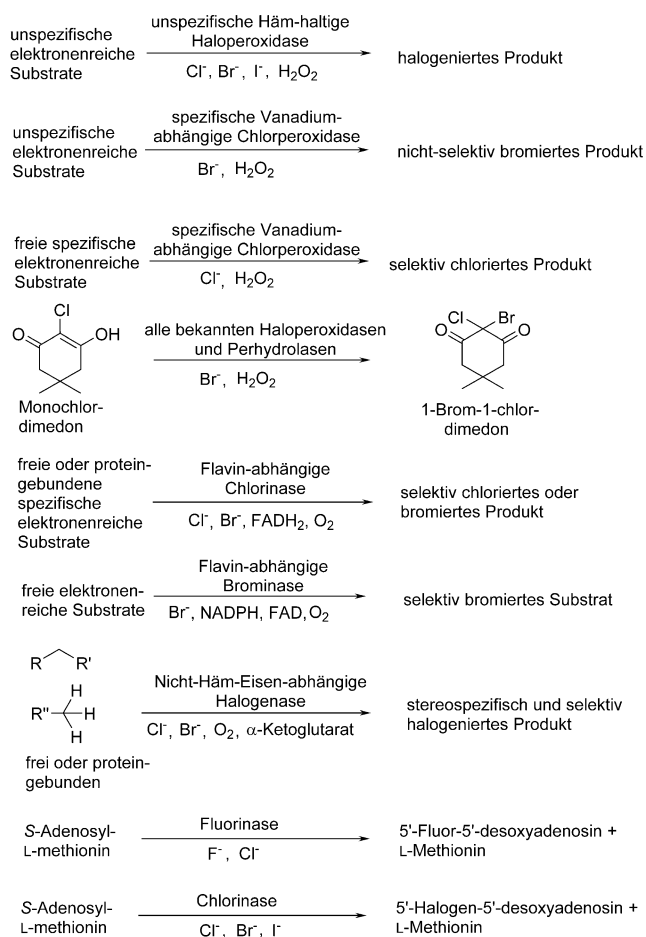
keine Substratspezifität, Regioselektivität und Stereospezifität.

1.2. Flavin-abhängige Halogenasen

Bis 1995 war unklar, wie die an den Biosynthesen halogener Metaboliten beteiligten Halogenasen aussehen. Dairi et al. klonierten im Rahmen ihrer Arbeiten über die 7-Chlortetracyclin-Biosynthese das Biosynthese-Gencluster.^[8] Die Konstruktion von Mutanten, in denen bestimmte Gene zerstört worden waren, führte zur Identifizierung des Gens *chl*, das für den Halogenierungsschritt notwendig ist. Leider war das identifizierte Gen verkürzt, und in der veröffentlichten Aminosäuresequenz fehlten daher 100 Aminosäuren am aminoterminalen Ende.^[9] Daher wurde nicht gleich erkannt, dass das Enzym eine Nukleotidbindestelle aufweist.

Die Entdeckung zweier Halogenasegene im Biosynthese-Gencluster des antimykotisch wirkenden Antibiotikums Pyrrolnitrin (**1**) aus *Pseudomonas fluorescens* führte zu der Erkenntnis, dass die Halogenase PrnC, welche die Chlorierung des Pyrrolrings von Monodechloraminopyrrolnitrin (Schema 2) katalysiert, hohe Homologie zu Chl zeigt. Die Tryptophan-7-Halogenase PrnA dagegen zeigt nahezu keine Ähnlichkeit zu Chl (Abbildung 1).^[9] Die beiden Halogenasen PrnA und PrnC enthalten das Sequenzmotiv für eine Nukleotidbindestelle, GxGxxG, das in der veröffentlichten Sequenz von Chl fehlte. Während Dairi et al. keine In-vitro-Aktivität für Chl zeigen konnten, gelang dies für PrnA und PrnC bei Verwendung ihrer natürlichen Substrate Tryptophan (**2**) bzw.

[*] V. Weichold, Dr. D. Milbredt, Prof. K.-H. van Pée
Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie
Allgemeine Biochemie, TU Dresden
01062 Dresden (Deutschland)
E-Mail: karl-heinz.vanpee@chemie.tu-dresden.de



Schema 1. Allgemeine Reaktionen der verschiedenen Typen von halogenierenden Enzymen. Die Chlorierung und Bromierung von Monochlorodimedon wurden ganz allgemein als Test für den Nachweis halogenierender Enzyme in der Zeit zwischen 1966 und 1997 eingesetzt.^[6]

Monodechloraminopyrrolnitrin (Schema 2).^[10] Für die Aktivität in zellfreien Rohextrakten musste Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zugegeben werden, und es wurde angenommen, dass dieses NADH über die Nukleotidbindestelle gebunden wird, auch wenn es keine Erklärung gab, weshalb NADH benötigt wird. Während der Versuche zur Reinigung von PrnC wurde festgestellt, dass auch Flavin-Adenin-Dinu-

kleotid (FAD) in irgendeiner Form an der Reaktion beteiligt ist. Detailliertere Untersuchungen an PrnA ergaben, dass für die Halogenierung von **2** durch PrnA noch ein zweites Enzym benötigt wird: eine Flavinreduktase, die FAD mittels NADH (oder Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, NADPH) als Reduktionsmittel zu FADH_2 reduziert.^[11] FADH_2 wird anschließend von der Halogenase unter Bildung eines enzymgebundenen Flavinhydroperoxids für die Bildung von hypochloriger Säure genutzt (Schema 3).

Im Unterschied zu den Haloperoxidasen und den Perhydroxidasen verlässt die von den Flavin-abhängigen Halogenasen gebildete hypochlorige Säure das aktive Zentrum des Enzyms nicht.^[12] Eine spezifische Flavinreduktase wird nicht benötigt. Selbst chemisch hergestelltes FADH_2 kann verwendet werden.^[13] Somit waren die Voraussetzungen für weitere Charakterisierungen der Flavin-haltigen Halogenasen geschaffen. Während der folgenden Jahre wurde eine große Anzahl Gene potentieller Flavin-abhängiger Halogenasen gefunden. Allerdings konnte nur in sehr wenigen Fällen die Aktivität der zugehörigen Enzyme nachgewiesen werden, da Flavin-abhängige Halogenasen eine hohe Substratspezifität zeigen und deshalb Kenntnisse über das natürliche Substrat benötigt werden. Allerdings ist häufig selbst in Fällen, in denen das natürliche Substrat bekannt ist, dieses nicht verfügbar, da in den Biosynthesen von nicht-ribosomalen Peptiden oder von Polyketiden Peptidyl- oder Acyl-Carrier-Protein-gebundene Substrate benötigt werden; dies gilt auch für viele der Halogenasesubstrate.

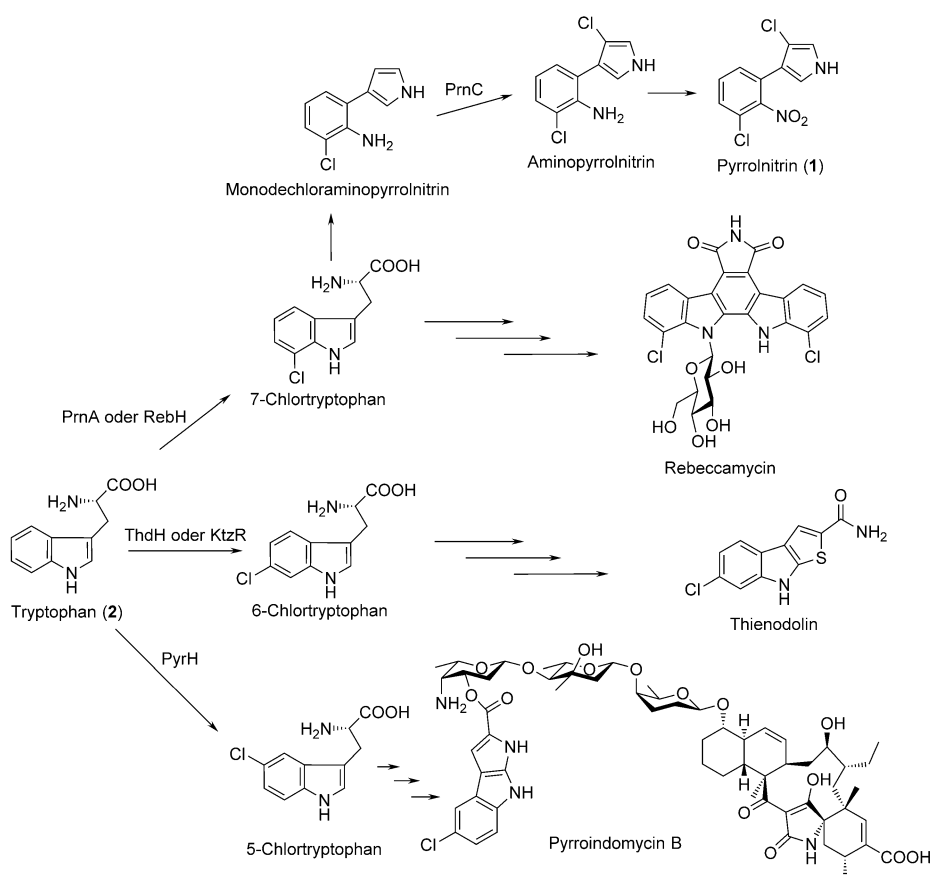
Die erste dreidimensionale Struktur einer Flavin-abhängigen Halogenase, die aufgeklärt wurde, war die der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus der Biosynthese von Pyrrolnitrin (**1**).^[12] Überraschenderweise zeigte die Struktur, dass keine direkte Wechselwirkung zwischen dem Isoalloxazinring des Flavins und dem Substrat Tryptophan möglich ist. Daher muss ein diffusionsfähiges halogenierendes Zwischenprodukt, hypohalogenige Säure, beteiligt sein. Diese hypohalogenige Säure wird durch die Reaktion von Flavinhydroperoxid mit einem Halogenidion (Chlorid oder Bromid) gebildet. Das Flavinhydroperoxid entsteht aus der Reaktion von FADH_2 mit Sauerstoff in einer analogen Reaktion wie bei den Flavin-abhängigen Monooxygenasen. Die hypohalogenige Säure wird anschließend durch einen etwa 10 Å langen Tunnel zum Substrat geführt. Ein Lysinrest in diesem Tunnel wurde als absolut notwendig für die Aktivität identifiziert.



Veit Weichold studierte Chemie an der TU Dresden und schloss sein Masterstudium 2012 ab. Während seiner Masterarbeit beschäftigte er sich bereits mit der Aufklärung der Pentachlorpseudilin-Biosynthese. Diese Arbeiten wurden im Rahmen seiner Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. van Pée an der TU Dresden mit dem Schwerpunkt auf den Halogenierungsschritten fortgesetzt.



Daniela Milbredt studierte Chemie an der TU Dresden und erhielt ihr Diplom 2006. Sie schloss 2011 ihre Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. van Pée an der TU Dresden ab. Dort führt sie auch ihre Untersuchungen an Tryptophan-Halogenasen und der Biosynthese von halogenierten Sekundärmetaboliten weiter.



Schema 2. Beispiele für die Halogenierung von Tryptophan (2) durch Flavin-abhängige Tryptophan-Halogenasen mit verschiedenen Regioselektivitäten während der Biosynthese von Pyrrolnitrin (1), Rebeccamycin, Thienodolin und Pyroindomycin B.^[15–18]

Interessanterweise wurde in der Kristallstruktur nahe am Isoalloxazinring ein einzelnes Chloridion gefunden. Dies zeigt, dass die Enzymmoleküle im Ruhezustand mit Chloridionen gesättigt vorliegen.^[12, 14]

1.3. Nicht-Häm-Eisen-, α -Ketoglutarat- und O_2 -abhängige Halogenasen

Haloperoxidasen und Flavin-abhängige Halogenasen benötigen elektronenreiche Substrate mit aktivierten Kohlen-

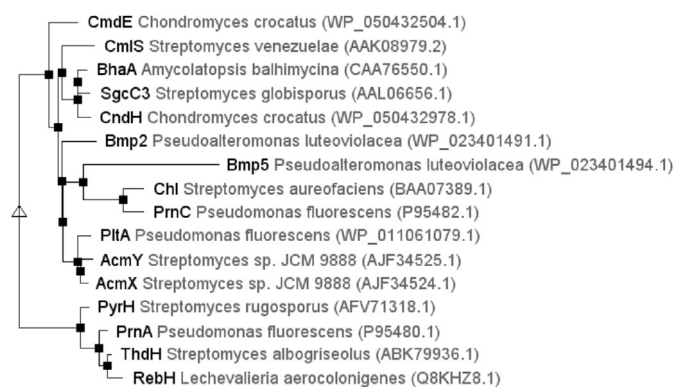


Karl-Heinz van Pée studierte Chemie an der Universität Stuttgart. Er schloss seine Dissertation 1983 bei Prof. Lingens an der Universität Hohenheim ab. Von 1986 bis 1987 verbrachte er ein Jahr als European Research Fellow am Manchester Institute of Science and Technology. Anschließend kehrte er an die Universität Hohenheim zurück, wo er in der Arbeitsgruppe von Prof. Lingens 1988 seine Habilitation abschloss. Er blieb anschließend als Heisenberg-Stipendiat der DFG in Hohenheim, bis er 1994 einen Ruf an die TU Dresden erhielt, wo er seitdem die Professur für Allgemeine Biochemie innehat.

stoffatomen in Form von aromatischen Ringen oder als Doppelbindungen in aliphatischen Verbindungen^[15–18] Diese Enzyme sind nicht in der Lage, an nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen, z. B. an Methylgruppen, zu halogenieren. Interessanterweise gibt es in der Natur eine ganze Reihe halogenierter Metaboliten mit halogenierten Methylgruppen oder Halogenatomen an anderen nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist Barbamid (3; Schema 4), das von dem marinen Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* produziert wird. Ältere Untersuchungen zur Biosynthese von 3 ergaben, dass sich die dreifach chlorierte Methylgruppe von 3 aus einem Leucinrest ableitet, wobei während der Biosynthese keine intermediäre Doppelbindung gebildet wird.^[19] Sitachitta et al. schlossen daraus, dass die Chlorierung der Methylgruppe des Leucinrests während der Biosynthese von 3 über einen Radikalmechanismus erfolgen könnte.^[20] Vergleiche der Aminosäuresequenzen von BarB1/BarB2 und BarC aus dem Barbamidbiosynthese-Genclus-

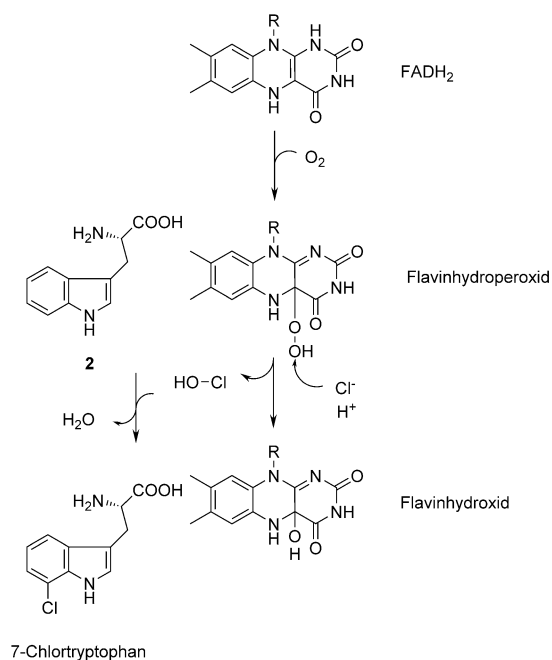
ter^[21] ergaben hohe Ähnlichkeiten mit den potentiellen Enzymen SyrB2 und SyrC aus der Syringomycinbiosynthese (Schema 4)^[22] und mit CmaA und CmaB aus der Coronatinbiosynthese (Schema 4).^[23] Vaillancourt et al. bemerkten, dass SyrB2 Homologie zu Nicht-Häm-Eisen- und α -Ketoglutarat(α -KG)-abhängigen Enzymen zeigt.^[24] Diese Enzyme verwenden Aspartat/Glutamat und zwei Histidinreste als Liganden für ein Nicht-Häm-Eisenzentrum und katalysieren typischerweise Oxygenierungsreaktionen.^[25, 26] Für gereinigtes SyrB2 konnte gezeigt werden, dass es die Chlorierung eines Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)-gebundenen L-Threonins katalysiert (Schema 4).^[24] Anschließend konnte die Monochlorierung von PCP-gebundenem L-allo-Isoleucin durch CmaB in vitro gezeigt werden, und Galonic et al. gelang die Dreifachchlorierung von PCP-gebundenem L-Leucin durch BarB1/BarB2 in vitro (Schema 4).^[27, 28]

In Anlehnung an den Reaktionsmechanismus der Nicht-Häm-Eisen- und α -KG-abhängigen Hydroxylasen wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem ein Substratradikal gebildet wird, das ein Chlorradikal vom energetisch hoch liegenden Ferryl-Oxo-Zwischenprodukt abstrahiert (Schema 5). Dieser Mechanismus wurde durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von SyrB2 gestützt, in der zu sehen ist, dass das Eisenzentrum durch zwei Histidinreste, Chlorid, Wasser und α -Ketoglutarat, aber kein



—, 10 PAM

Abbildung 1. Phylogenetischer Baum einiger Flavin-abhängiger Halogenasen. Die Clusterung der Tryptophan-Halogenasen mit unterschiedlichen Regioselektivitäten, PyrH, PrnA, ThdH und RebH, ist offensichtlich. Pyrrolo-carbonsäure-Halogenasen, die ein PCP-gebundenes Substrat verwenden (PltA, AcMY und AcMX), sind von der Pyrrol-Halogenase PrnC, die ein freies Substrat verwendet, getrennt. Interessanterweise scheint PrnC nahe mit der Halogenase aus der 7-Chlortetracyclin-Biosynthese, Chl, verwandt zu sein. Halogenasen, die ein anderes PCP-gebundenes Substrat als Pyrrolo-carbonsäure benötigen, sind ebenfalls zu einem Cluster zusammengefasst. PAM: Prozent der akzeptierten Punktmutationen.



Schema 3. Reaktionsmechanismus der Flavin-abhängigen Halogenasen am Beispiel der Chlorierung von Tryptophan (**2**) zu 7-Chlortryptophan. Das reduzierte Flavin wird durch eine unspezifische Flavinreduktase bereitgestellt. In vitro halogeniert die Halogenase beide Enantiomere von **2**. Das gebildete HOCl kann das aktive Zentrum nicht verlassen. Die Regioselektivität wird durch eine spezifische Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum erreicht.^[12]

Aspartat koordiniert wird (Schema 5).^[29] Obwohl man eine Konkurrenzreaktion zwischen dem Chlor- und einem Hydroxylradikal erwarten könnte, wurde für SyrB2 keine hydroxylierende Aktivität beobachtet (Schema 1).

1.4. Fluorierung

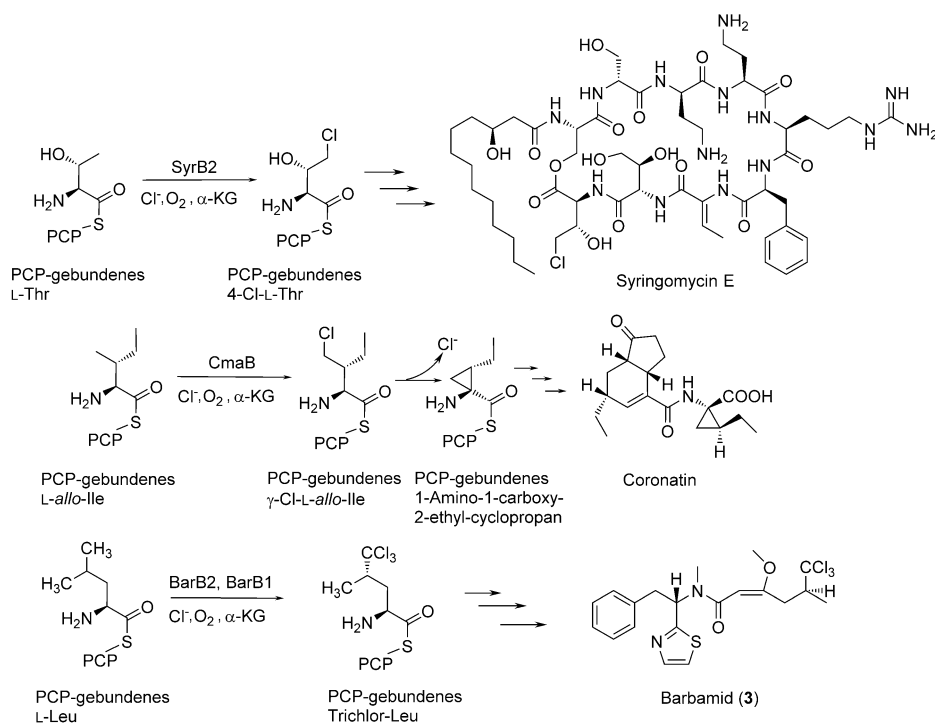
Eine Oxidation von Fluoridionen mit Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid ist nicht möglich. Deshalb werden für die Knüpfung von C-F-Bindungen andere Enzyme benötigt. Da Fluoridionen in wässriger Lösung sehr stark hydratisiert sind, müssen für einen direkten Einbau von Fluoridionen die Wassermoleküle um das Fluoridion entfernt werden. Ein Enzym, das dazu in der Lage ist, wurde in *Streptomyces cattleya*, dem Produzenten von Fluoreszinsäure, entdeckt.^[30,31] Diese Fluorinase (FIA) zeigt eine hohe Substratspezifität: Ihr bisher einziges bekanntes Substrat ist *S*-Adenosyl-L-methionin. Die Reaktionsprodukte dieser Reaktion sind L-Methionin und 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin (Schemata 1 und 13). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, ortsgerichtete Mutagenese und kinetische Untersuchungen zeigten, dass ein Serin- und ein Threoninrest die Wassermoleküle um das Fluoridion herum ersetzen. Dadurch entsteht ein „nacktes“ Fluoridion, welches das *S*-Adenosyl-L-methionin unter Abspaltung von L-Methionin angreifen kann.^[32] FIA kann in Gegenwart von Chloridionen auch als eine Chlorinase reagieren, hat aber keine Brominaseaktivität.^[33] Ein ähnliches Enzym mit Chlorinase-, Brominase- und Iodinaseaktivität, aber ohne Fluorinaseaktivität wurde in dem marinen Bakterium *Salinispora tropica* gefunden (Schema 1).^[34]

2. Neue Entwicklungen

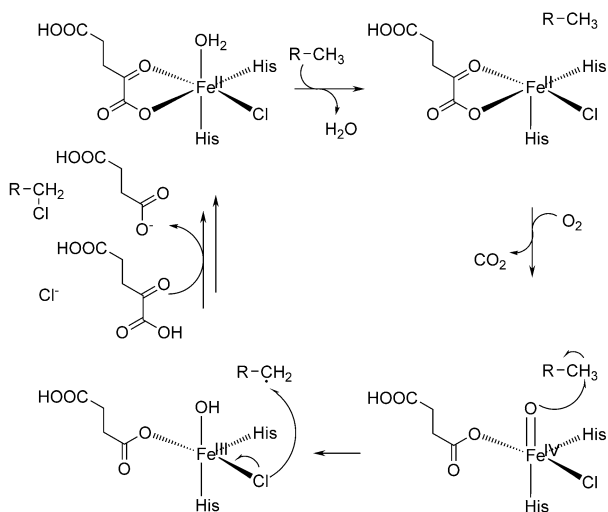
2.1. Halogenierende Enzyme und ihre Beteiligung an der Biosynthese halogener Metaboliten

Nach der Entdeckung von *chl*, dem Gen der Flavin-abhängigen Halogenase aus der 7-Chlortetracyclinsynthese, und den beiden Halogenasegenen *prnA* und *prnC* aus der Biosynthese von **1** wurde eine große Anzahl von Genen für weitere potentielle Flavin-abhängige Halogenasen auf der Basis von Sequenzhomologien gefunden. In den meisten Fällen wurden die Gene während der Klonierung und Charakterisierung von Biosynthese-Genclustern für Sekundärmetaboliten in Bakterien gefunden,^[35] aber es gibt auch einige Beispiele aus Pilzen^[36,37] und Schleimpilzen.^[38,39] Unglücklicherweise wurde aber eine große Zahl dieser Halogenasegene falsch annotiert. Viele Gene wurden als Tryptophan-Halogenasegene annotiert, obwohl **2** an der entsprechenden Biosynthese nicht beteiligt ist.^[39] Dies liegt vermutlich daran, dass Tryptophan-Halogenasen die ersten Flavin-abhängigen Halogenasen waren, die untersucht wurden. Daher wurden in diesem frühen Stadium der Arbeiten über Flavin-abhängige Halogenasen nahezu alle neu entdeckten Halogenasegene als Tryptophan-Halogenasegene annotiert. Da nur Gene gefunden und annotiert wurden, ohne dass die In-vitro-Aktivität der zugehörigen Enzyme nachgewiesen wurde, fielen diese Irrtümer lange Zeit nicht auf.

Die Expression der Gene Flavin-abhängiger Halogenasen und der Nachweis von In-vitro-Aktivität waren und sind



Scheme 4. Oben: Chlorierung von PCP-gebundenem L-Threonin durch die Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O_2 -abhängige Halogenase SyrB2 aus der Biosynthese von Syringomycin E. Mitte: kryptische Chlorierung von PCP-gebundenem L-allo-Isoleucin durch die Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O_2 -abhängige Halogenase CmaB aus der Coronatinbiosynthese. Unten: Chlorierung von PCP-gebundenem L-Leucin durch die Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O_2 -abhängigen Halogenasen BarB2 und BarB1 aus der Biosynthese von Barbamid (**3**).^[24, 27, 28]



Scheme 5. Reaktionsmechanismus der Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O_2 -abhängigen Halogenasen.^[29]

immer noch die Ausnahme. Hierfür gibt es zwei Gründe: Die meisten Halogenasegene stammen aus Actinomyceten und sind in *E. coli* als lösliche Proteine nicht leicht zu exprimieren. Eine gute Überexpression ist aber eine absolute Voraussetzung für den Nachweis der halogenierenden Aktivität in vi-

tro. Bis heute ist es noch niemandem gelungen, die In-vitro-Aktivität einer Flavin-abhängigen oder einer Nicht-Häm-Eisen-Halogenase in einem Wildstamm nachzuweisen; die Aktivität kann erst nach der Überexpression des Gens detektiert werden. Der zweite Grund dafür, dass In-vitro-Aktivität nur für sehr wenige Halogenasen gezeigt werden konnte, ist das Substratproblem: Halogenasen haben eine hohe Substratspezifität, weshalb entweder das natürliche Substrat oder eine strukturell eng verwandte Verbindung als Substrat benötigt wird. Allerdings ist in den meisten Fällen die chemische Struktur des natürlichen Substrats nicht bekannt, da normalerweise nicht geklärt ist, in welchem Schritt der Biosynthese die Halogenierung erfolgt. Es gibt Beispiele, in denen die Halogenierung der erste Biosyntheseschritt ist und die Biosynthese nicht fortgesetzt werden kann, wenn die Ausgangsverbindung nicht halogeniert wurde.^[15] In anderen Beispielen ist die Halogenierung

ebenfalls der erste Schritt, aber der Verlauf der Biosynthese wird nicht beeinflusst, wenn keine Halogenierung erfolgt, und es wird das entsprechende unhalogenierte Endprodukt gebildet.^[18] In diesen Fällen führt die Entfernung des Halogenasegens im Produzenten auch nicht zur Identifizierung des natürlichen Substrats der Halogenase.

2.1.1. Halogenierte Metaboliten, die sich von Tryptophan ableiten oder einen halogenierten Tryptophanrest enthalten

Bei den natürlichen Substraten der Tryptophan-7-Halogenase PrnA und der Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase PrnC, den ersten beiden Flavin-abhängigen Halogenasen, für die In-vitro-Aktivität gezeigt werden konnte, handelt es sich um freies **2** bzw. freies Monodechloraminopyrrolnitrin.^[10] Freies **2** ist ebenfalls das Substrat für die Tryptophan-6-Halogenase (ThdH oder Thal), die an der Thienodolinbiosynthese in *Streptomyces albogriseolus* beteiligt ist,^[17, 40] wie auch für die Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *Streptomyces rugosporus*, dem Produzenten von Pyrroindomycin B.^[18] Diese Tryptophan-Halogenasen katalysieren in vitro die Chlorierung und Bromierung beider Enantiomere von **2**, allerdings ist das L-Enantiomer von **2** das bessere Substrat.^[92]

Die Klonierung und Charakterisierung des Biosynthesengencusters für das antimikrobielle cyclische Hexapeptid Kutznerid **2** zeigte das Vorhandensein von zwei Genen für

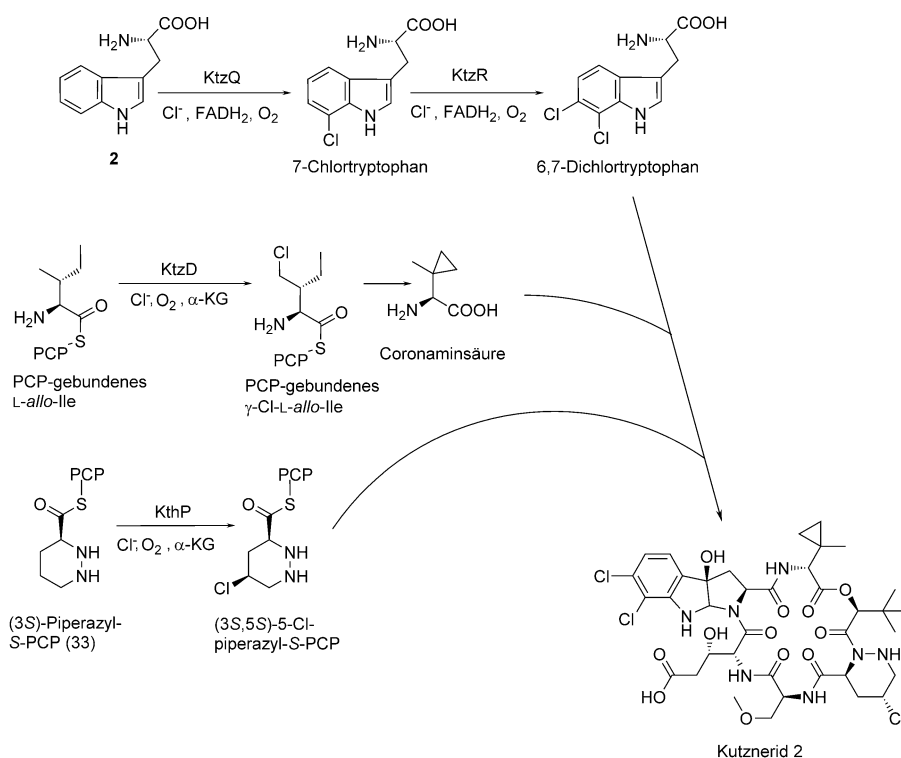
Flavin-abhängige Tryptophan-Halogenasen, KtzQ und KtzR, und eines Gens für eine Nicht-Häm-Eisen-Halogenase, KtzD.^[41] KtzQ, eine Tryptophan-7-Halogenase, katalysiert die regioselektive Chlorierung von freiem **2** zu 7-Chlortryptophan, das von der Tryptophan-6-Halogenase KtzR weiter zu 6,7-Dichlortryptophan chloriert wird.^[42] Es wird angenommen, dass dieses Produkt durch die Adenylierungsdomäne KtzH in die wachsende Kutznerid-Assemblierungs-Kette eingebaut wird.^[42] Die Nicht-Häm-Eisen-Halogenase KtzD katalysiert die kryptische Chlorierung von PCP-gebundenem *L-allo*-Isoleucin (Schemata 4 und 6).^[41] Das Gen für eine weitere Nicht-Häm-Eisen-Halogenase, KthP, wurde erst später etwas entfernt vom Kutzneridbiosynthese-Gencluster entdeckt. Für diese Halogenase wurde gezeigt, dass sie die stereospezifische Chlorierung eines PCP-gebundenen Piperazylrests katalysiert,^[43] von dem angenommen wird, dass er aus Glutamat/Glutamin synthetisiert wird (Schema 6).^[41] Dieses Beispiel zeigt sehr schön, dass die Halogenierung eines freien Substrats vor dem Einbau dieses Bausteins in den Biosyntheseweg erfolgen kann. Innerhalb von nicht-ribosomalen Peptidsynthesen geschieht die Halogenierung allerdings an PCP-gebundenen Substraten.

2.1.2. Metaboliten mit halogeniertem Pyrrolrest

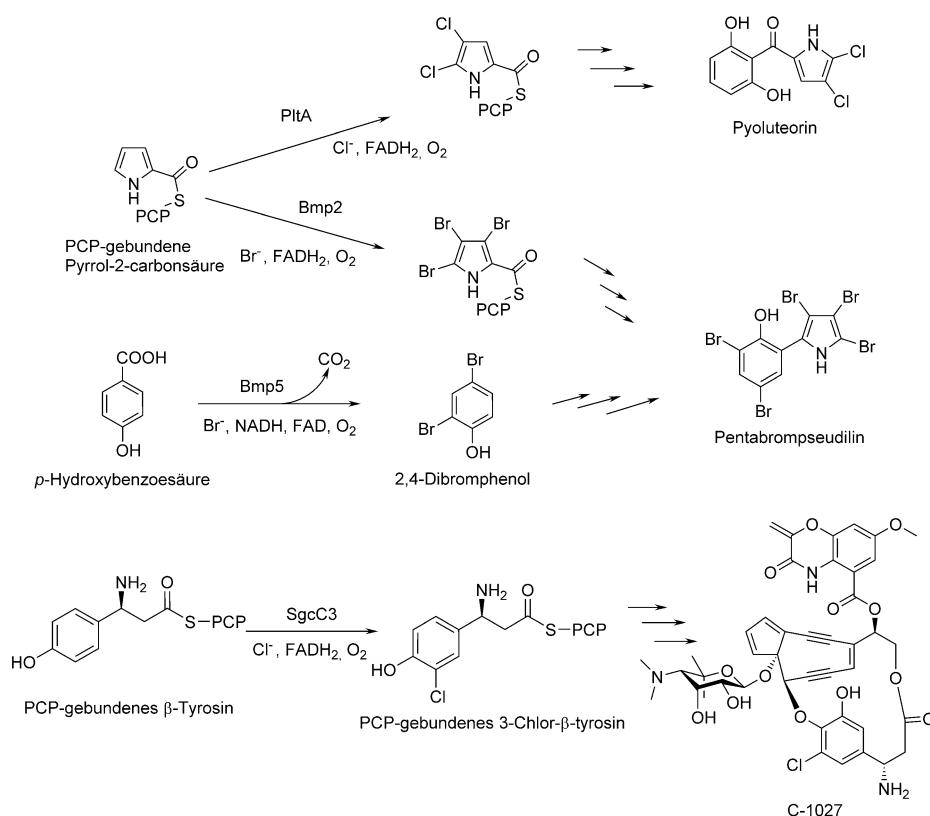
Während der Klonierung und Charakterisierung des Biosynthese-Genclusters des Antibiotikums Pyoluteorin

entdeckten Nowack-Thompson et al. die Gene von drei potentiellen Flavin-abhängigen Halogenasen: *pltA*, *pltD* und *pltM*.^[44] Pyoluteorin enthält aber nur zwei Chloratome. Eine der potentiellen Halogenasen, PltD, enthält kein korrektes Motiv für eine Nukleotidbindestelle (GxSxxV anstelle von GxGxxG), und ein zweites konserviertes Motiv, das in Chl, PrnC und den Tryptophan-Halogenasen gefunden wurde (das so genannte Tryptophan-Motiv), war ebenfalls verändert (GWxGxI anstelle von GWxWxI). Daraus wurde geschlossen, dass PltD nicht funktionsfähig oder aber prinzipiell keine Halogenase ist.^[44,45] Damit verblieben nur noch PltA und PltM als Kandidaten für die Einführung der beiden Chloratome in den Pyrrolrest von Pyoluteorin, der sich von Prolin ableitet. Die Bildung des Pyrrolrests benötigt die Aktivität einer nicht-ribosomalen Peptid-Synthetase, wodurch ein PCP-gebundener Prolylrest entsteht. Dieser ist das Substrat für eine Flavin-abhängige Dehydrogenase, die das PCP-gebundene Prolin in eine PCP-gebundene Pyrrol-2-carbonsäure umwandelt, die das natürliche Substrat für die Halogenase ist (Schema 7).^[46] Überraschenderweise gelang mit PltA allein bereits die Dichlorierung der PCP-gebundenen Pyrrolcarbonsäure in vitro, wohingegen für PltM keine chlorierende Aktivität detektiert werden konnte. Der Nachweis der In-vitro-Aktivität von PltA erforderte ein komplexes Enzymsystem aus einem Peptidyl-Carrier-Protein (PltL), an das mithilfe der unspezifischen 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp eine prosthetische 4'-Phosphopantethein-Gruppe

angebracht werden musste. PltL wurde anschließend durch die *L*-Prolyl-AMP-Ligase PltF mit Prolin beladen. Die Oxidation des Prolyl-S-Carrier-Proteins erfolgte durch die Dehydrogenase PltE. Für die Chlorierung des resultierenden Pyrrolyl-S-PCP wurde die Flavin-reduktase SsuE aus *E. coli* zur Bildung des von der Halogenase benötigten FADH₂ zugegeben. Für die Analyse des Reaktionsprodukts mussten Elektrospray-Ionisations-Fourier-Transformations-MS und *L*-[¹⁴C]Prolin verwendet werden, da die Gesamtaktivität dieses komplexen Enzymsystems nur sehr gering war.^[45] Agarwal et al. hatten das gleiche Problem bei der Analyse der Aktivität der Brominase Bmp2 aus der Biosynthese von Pentabrompseudilin (**4**). Bmp2 katalysiert die Dreifachbromierung des Pyrrolyl-S-Acyl-Carrier-Proteins (ACP; Schema 7).^[47] Obwohl hier der Pyrrolcarbonsäurerest an das holo-ACP durch chemische Synthese angebracht wurde, war LC/MS/MS für die Detektion des bromierten Produkts notwendig. Dies macht deutlich, wie schwierig es ist, die



Schema 6. Die Chlorierungsreaktionen im Verlauf der Kutzneridbiosynthese. Zweifachchlorierung von Tryptophan (**2**) zu 6,7-Dichlortryptophan durch die Flavin-abhängigen Halogenasen KtzQ und KtzR, Chlorierung von PCP-gebundenem *L-allo*-Isoleucin durch die Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O₂-abhängige Halogenase KtzD und Chlorierung eines PCP-gebundenen (3S)-Piperazylrests durch die Nicht-Häm-Eisen-, α -KG- und O₂-abhängige Halogenase KthP. Die chlorierten Bausteine werden dann in die Biosynthese von Kutznerid **2** eingeschleust.^[41–43]



Schema 7. Halogenierung von PCP-gebundenen Substraten durch Flavin-abhängige Halogenasen. Oben: PCP-gebundene Pyrrol-2-carbonsäure wird im Verlauf der Biosynthesen von Pyoluteorin und Pentabromopseudilin (**4**) durch PltA bzw. Bmp2 halogeniert.^[45,47] Mitte: Die Bildung von 2,4-Dibromphenol aus *p*-Hydroxybenzoesäure wird während der Biosynthese von **4** durch Bmp5 katalysiert.^[47] Unten: (S)- β -Tyrosyl-PCP wird durch SgcC3 während der Biosynthese des Endiin-Antibiotikums C-1027 chloriert.^[53]

In-vitro-Aktivität von Halogenasen nachzuweisen, selbst wenn das natürliche Substrat verwendet wird.

Vor kurzem wurde die dreidimensionale Struktur von PltA aufgeklärt.^[48] Der Bereich der Flavin-Bindestelle ist sehr ähnlich zu denen anderer Flavin-abhängiger Halogenasen und enthält wie PrnA und PyrH ebenfalls ein Chloridion in Nachbarschaft zum Isoalloxazinring.^[12,14] Der katalytisch aktive Lysinrest befindet sich ebenfalls an einer ähnlichen Position wie bei PrnA und PyrH, aber der für die Aktivität von PrnA und PyrH notwendige Glutamatrest ist nicht vorhanden. Leider konnte kein Komplex mit PCP-gebundener Pyrrolcarbonsäure erhalten werden. Der Abstand zwischen Substrat und Isoalloxazinring beträgt nur 6 und nicht 10 Å wie bei PrnA und PyrH. Ein wichtiger Unterschied zu PrnA und PyrH ist eine zusätzliche helikale Region am C-Terminus, die eine mutmaßliche Substratbindestelle blockiert. Dies lässt darauf schließen, dass eine Konformationsänderung notwendig ist, um diese Region für die Bindung des Substrats anders zu positionieren.^[48]

Bis auf Bmp2 und Bmp5^[47] katalysieren alle bisher entdeckten Flavin-abhängigen und Nicht-Häm-Eisen-Halogenasen sowohl Chlorierungs- als auch Bromierungsreaktionen. Allerdings ist, anders als bei Haloperoxidasen, die chlorierende Aktivität höher als die bromierende. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass Chlorid besser in das aktive Zentrum

passt, wo es in der Nähe des Isoalloxazinrings gebunden wird.^[12,14,48] Fütterungsstudien haben ergeben, dass die Substitution von Chlorid durch Bromid im Wachstumsmedium zur Bildung des entsprechenden bromierten Metaboliten führt.^[49] Interessanterweise kann der Produzent von Pentachlorpseudilin, *Actinoplanes* sp. ATCC 33002, nur Pentachlorpseudilin und nicht das Bromanalogon **4** synthetisieren. Dieses wird von den marinen Bakterien *Pseudoalteromonas luteoviolacea* und *P. phenolica* produziert, die andererseits das Chloranalogon nicht synthetisieren können. Aus Fütterungsstudien ist bekannt, dass sich der Pyrrolring von **4**, wie im Fall von Pyoluteorin, von Prolin ableitet^[44,50] und der Phenolring über *p*-Hydroxybenzoesäure aus dem Shikimatweg stammt.^[51] Dagegen wird der Phenolring von Pentachlorpseudilin über eine Polyketidsynthese gebildet.^[52] Im Verlauf ihrer Arbeiten zur Biosynthese von **4** klonierten und charakterisierten Agarwal et al. das Biosynthese-Gencluster von **4**.^[47]

Das Cluster enthält das Gen für die Flavin-abhängige Halogenase Bmp2, deren Aminosäuresequenz ähnlich zu denen von PltA und PltM aus der Pyoluteorinbiosynthese ist (Abbildung 1).^[44] Für Bmp2 konnte gezeigt werden, dass es die Einfach-, Zweifach- und Dreifachbromierung, aber nicht die Chlorierung von Pyrrolyl-S-Bmp1 katalysiert (Schema 7).

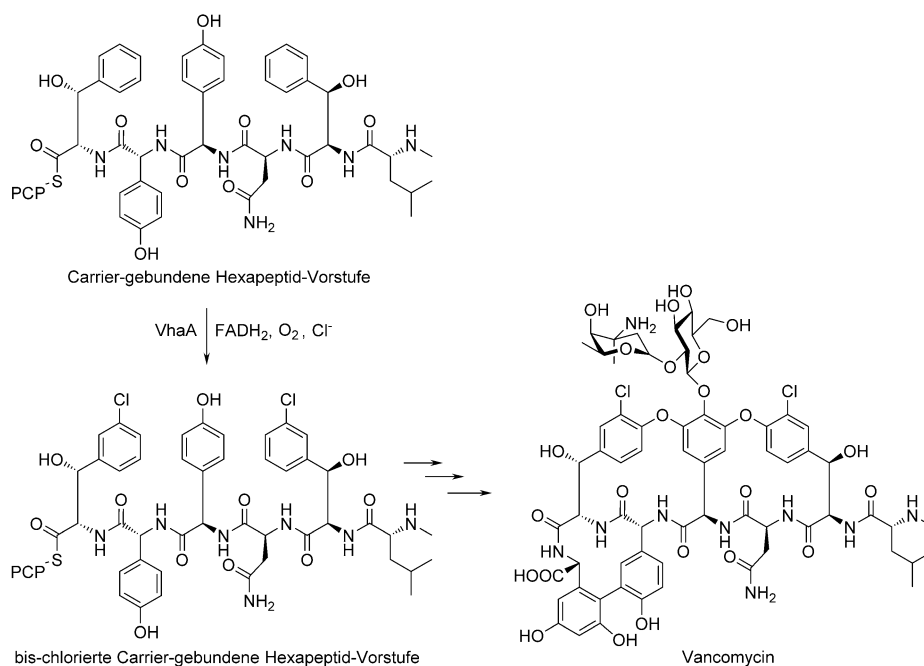
2.1.3. Metaboliten mit halogeniertem Phenolring

Das Gen der zweiten Flavin-abhängigen Halogenase aus der Pentabromopseudilinbiosynthese, *bmp5*, war nicht leicht zu finden, da seine Sequenzhomologie zu bekannten Flavin-abhängigen Halogenasen relativ gering ist (Abbildung 1). Bmp5 enthält die Nukleotidbindestelle, und der katalytisch aktive Lysinrest ist wie bei PrnC^[9] und anderen Flavin-abhängigen Phenylpyrrol-Halogenasen etwa 12 Aminosäurereste in Richtung des C-Terminus verschoben. Bmp5 katalysiert die Einfachbromierung von *p*-Hydroxybenzoesäure, und nach Decarboxylierung des 3-Brom-4-hydroxybenzoesäure-Zwischenprodukts wird ein zweites Bromatom eingebaut, wodurch der 2,4-Dibromphenolrest von **4** entsteht (Schema 7). Die Produktbildung von Bmp5 war hoch genug, um mittels HPLC analysiert zu werden. Die Zugabe einer Flavinreduktase war nicht notwendig, da Bmp5 auch gleichzeitig als Flavinreduktase fungiert. Dies spiegelt sich in der

Sequenzhomologie von Bmp5 zu den Flavin-abhängigen Einkomponenten-Oxygenasen und der Gegenwart einer NADPH-Bindestelle (GLGESSAD) wider. Bmp5 ist die erste entdeckte Flavin-abhängige Einkomponenten-Halogenase mit zusätzlicher Decarboxylase-Aktivität. Wie Bmp2 katalysiert auch Bmp5 keine Chlorierungsreaktion.^[47]

Die regioselektive Chlorierung von (S)- β -Tyrosyl-PCP gelang mit der Flavin-abhängigen Halogenase SgcC3 aus der Biosynthese des Endiin-Antitumor-Antibiotikums C-1027 (Schema 7). Wie im Fall der Chlorierung von PCP-gebundener Pyrrol-2-carbonsäure durch PltA wurde das Substrat enzymatisch synthetisiert. Die erhaltene Aktivität war gegenüber der von Pyrrolyl-S-PCP-Halogenasen relativ hoch, wodurch es möglich war, das Enzym kinetisch zu charakterisieren. Der k_{cat} -Wert für die Chlorierungsreaktion war sehr viel niedriger als die Werte, die für die Tryptophan-Halogenasen gefunden wurden (1.1 h^{-1} gegenüber $1\text{--}7 \text{ min}^{-1}$). Interessanterweise war die bromierende Aktivität etwa um die Hälfte geringer, was gut mit den für die Tryptophan-Halogenasen erhaltenen Daten übereinstimmt.^[53]

Die Glykopeptide Vancomycin, Balhimycin und Chloreremomycin enthalten alle einen chlorierten β -Hydroxytyrosinrest. Da die Fütterung von 3-Chlor- β -hydroxytyrosin nicht zur Bildung von Balhimycin führte, konnte ausgeschlossen werden, dass das Vorstufenmolekül β -Hydroxytyrosin vor seinem Einbau in das Peptidrückgrat von Balhimycin chloriert wird.^[54] Die Analyse des Balhimycinbiosynthese-Genclusters ergab das Vorhandensein von zwei potentiellen halogenierenden Enzymen: Bhp und BhaA. Bhp, eine „Cofaktor-freie Haloperoxidase“/Perhydrolase konnte als das Enzym identifiziert werden, das die Hydrolyse des β -Hydroxytyrosin-S-PCP katalysiert.^[55,56] BhaA wurde durch Zerstörung des Gens als die an der Balhimycinbiosynthese beteiligte Flavin-abhängige Halogenase identifiziert.^[54] Es wurde angenommen, dass BhaA den Einbau der Chloratome in beide β -Hydroxytyrosinreste von Balhimycin katalysiert. Es dauerte weitere vier Jahre, bis Schmartz et al. zeigen konnten, dass VhaA, die analoge Halogenase aus der Vancomycinbiosynthese, die Bis-Chlorierung des Hexapeptid-PCP-Konjugat-Zwischenprodukts katalysiert (Schema 8).^[57] Demnach findet die regioselektive Chlorierung beider β -Hydroxytyrosinreste direkt nach dem Einbau des zweiten β -Hydroxytyrosinrests in die wachsende Peptidkette und vor dem Einbau des letzten Aminosäurerests statt. VhaA zeigt eine hohe Substratspezifität und akzeptiert das Dipeptid, das ebenfalls einen C-terminalen β -Hydroxytyrosinrest trägt, nicht als

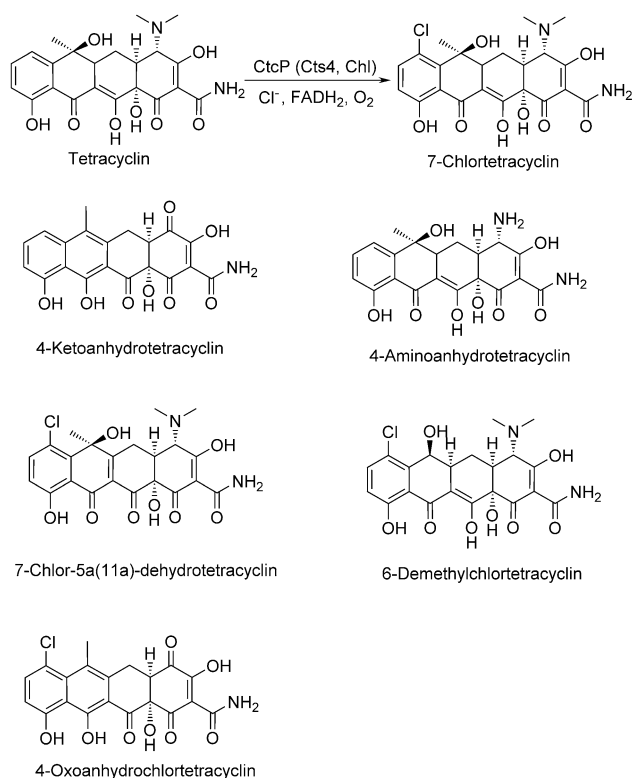


Schema 8. Chlorierung der Peptidyl-Carrier-Protein-gebundenen Hexapeptid-Vorstufe durch die Flavin-abhängige Halogenase VhaA während der Biosynthese von Vancomycin.^[57]

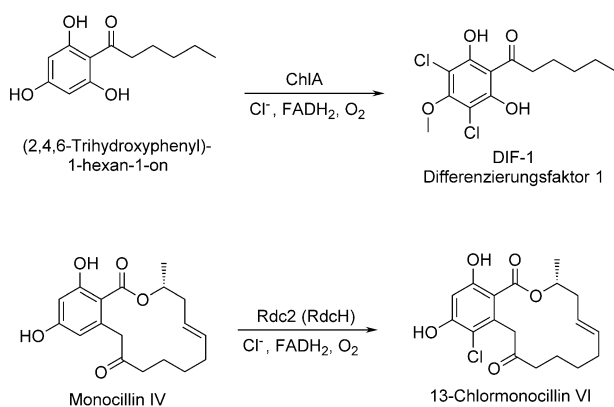
Substrat. Offensichtlich wird ein größerer Teil des Peptids von VhaA erkannt und für die Bindung des Substrats benötigt.

Fütterungsstudien zur Aufklärung der 7-Chlortetracyclinbiosynthese haben ergeben, dass das chlorierende Enzym, das an der 7-Chlortetracyclinbiosynthese beteiligt ist, eine hohe Substratspezifität und Regioselektivität aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass 4-Ketoanhydrotetracyclin das Substrat für das halogenierende Enzym sein muss und dass nach der Transaminierung zu 4-Aminoanhydrotetracyclin keine Chlorierung mehr möglich ist (Schema 9).^[58] Daher war es eine große Überraschung, als Zhu et al. veröffentlichten, dass CtcP, früher als Chl oder Cts4 bezeichnet, die Chlorierung von Tetracyclin als letzten Schritt der Biosynthese von 7-Chlortetracyclin katalysiert (Schema 9).^[8,59] Dieser Befund steht in absolutem Widerspruch zur Isolierung von 7-Chlor-5a(11a)-dehydrotetracyclin, 6-Demethylchlortetracyclin und insbesondere 4-Oxoanhydrochlortetracyclin (Schema 9).^[60–62] Wenn die Chlorierung der letzte Schritt in der Biosynthese von 7-Chlortetracyclin ist, ist die Existenz dieser Verbindungen nicht zu erklären.

Neumann et al. zeigten die chlorierende Aktivität von ChlA, einer Flavin-abhängigen Halogenase aus der sozialen Amöbe *Dictiostelium discoideum*.^[38] ChlA katalysiert in vivo beide Chlorierungen in der Biosynthese des Differenzierungsfaktors 1. Für In-vitro-Untersuchungen wurde (2,4,6-Trihydroxyphenyl)-1-hexan-1-on (THPH) als Substrat verwendet (Schema 10). Die gefundene chlorierende Aktivität war sehr gering, insbesondere für den Einbau des zweiten Chloratoms. THPH wird durch eine Polyketidsynthese gebildet, und es sollte in Betracht gezogen werden, dass das natürliche Substrat ein noch an das Acyl-Carrier-Protein StIB gebundenes Zwischenprodukt sein könnte.



Schema 9. Chlorierung von Tetracyclin zu 7-Chlortetracyclin durch die Flavin-abhängige Halogenase CtcP (auch als Cts4 und Chl bezeichnet) und einige 7-Chlortetracyclin-Derivate, deren Existenz nicht erklärbar ist, wenn die Chlorierung der letzte Schritt in der Biosynthese von 7-Chlortetracyclin ist.^[8, 58–62]



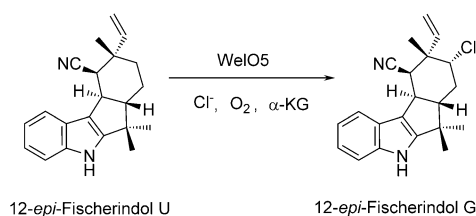
Schema 10. Chlorierung von (vermutlich) nicht-natürlichen Substraten durch verschiedene Flavin-abhängige Halogenasen.^[37, 38]

Radicalol ist ein chlorhaltiges Polyketid, das von dem Pilz *Pochonia chlamydospora* gebildet wird. Das Biosynthese-Gencluster enthält das Gen einer Flavin-abhängigen Halogenase (*rdc2*).^[36, 63] Zeng und Zhan analysierten die halogenierende Aktivität von Rdc2 in vitro mit Monocillin I, dem unhalogenierten Analogon von Radicalol, als Substrat.^[37] Allerdings waren im HPLC-Chromatogramm viele Peaks sichtbar. Daher wurde ein Substrat mit weniger Doppelbin-

dungen, wie Monocillin IV, eingesetzt, wobei Einfach- und Zweifachchlorierungen und Bromierungen am Phenolring erhalten wurden (Schema 10). Die Bildung der dichlorierten Produkte war überraschend, da dichloriertes Monocillin I noch nie in der Natur gefunden wurde. Monocillin IV ist sehr wahrscheinlich nicht das natürliche Substrat von Rdc2. In Experimenten mit 6-Hydroxyisochinolin als Substrat für Rdc2 wurden wiederum mono- und dichlorierte Produkte erhalten.^[64]

2.1.4. An aliphatischen Resten oder an nicht-aromatischen Ringen halogenierte Metaboliten

In Biosynthesewegen, in denen die zu halogenierende Verbindung kein Teil einer nicht-ribosomalen Peptidsynthese oder einer Polyketidsynthese ist, wie in den Biosynthesen von 1, Rebeccamycin, Thienodolin, Pyrroindomycin B (Schema 2) oder Kutznerid 2 (Schema 6), erfolgt die Halogenierung an einem freien Substrat.^[10, 16, 18, 40, 42, 45] Wenn die Halogenase innerhalb einer nicht-ribosomalen Peptidsynthese oder einer Polyketidsynthese arbeitet, ist es sehr unwahrscheinlich, dass das Substrat ein freies Molekül ist. Dies wäre nur dann der Fall, wenn die Halogenierung der erste Schritt vor einer Aktivierung der Aminosäure für eine Peptidsynthese oder als Startereinheit für eine Polyketidsynthese wäre. Daher ist es nicht überraschend, dass in einem Biosyntheseweg, in dem weder Peptidyl- noch Acyl-Carrier-Proteine verwendet werden,^[65] wie im Fall von Welwitindolinon, die Halogenierung an einem freien Substrat erfolgt. 12-*epi*-Fischerindol U (Schema 11) und 12-*epi*-Hapalindol C werden von der Nicht-Häm-Eisen-Halogenase WelO5 chloriert.^[66]



Schema 11. Chlorierung von freiem 12-*epi*-Fischerindol U durch die Nicht-Häm-Eisen-, α-KG- und O₂-abhängige Halogenase WelO5 aus der Biosynthese von Welwitindolinon.^[65, 66]

Die Umwandlung von Zwischenprodukten der Snyderolbiosynthese in bromierte Produkte durch eine Vanadium-abhängige Haloperoxidase ergab eine Reihe von Nebenprodukten und nur einen sehr geringen Anteil des bromierten Biosynthesezwischenprodukts.^[67] Bisher gibt es noch keine molekulargenetischen Daten für die Beteiligung der verwendeten Vanadium-Haloperoxidase an der Snyderolbiosynthese.

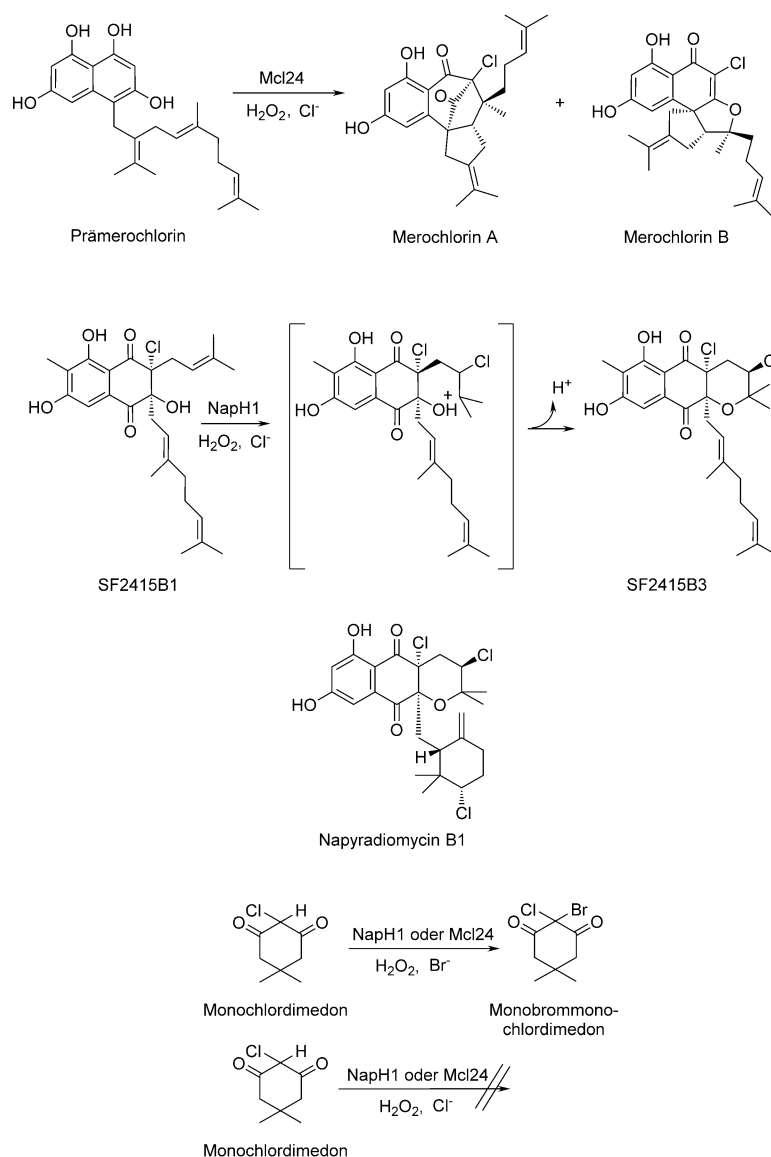
Kaysser et al. klonierten 2012 das Gencluster für die Merochlorinbiosynthese aus dem marinen Bakterium *Streptomyces* sp. CNH-189, in dem sie zwei Gene für Vanadium-abhängige Haloperoxidasen entdeckten. Sie exprimierten zwei verschiedene Fosmid-Klone, die sich im Vorhandensein

und Fehlen des Gens *mcl40*, das für eine der beiden Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen kodiert, unterschieden. Der Klon, dem *mcl40* fehlte, konnte kein Merochlorin C mehr produzieren, was darauf hinwies, dass Mcl40 am abschließenden Chlorierungs- und Cyclisierungsschritt beteiligt ist.^[68] Später wurde jedoch festgestellt, dass es in Wirklichkeit Mcl24 und nicht Mcl40 ist, das die regioselektive Chlorierung des Naphtholrests von Prämerochlorin katalysiert. Mcl24 initiiert zusätzlich auch noch eine Reihe von Cyclisierungsreaktionen, die zu den Desaromatisierungen und Terpencyclisierungen führen, die für den Aufbau des komplexen Kohlenstoffgerüsts von Merochlorin A und B benötigt werden. Mcl24 kann Monochlordimeton, das Standardsubstrat für Haloperoxidasen, nicht chlorieren, sondern nur bromieren (Schema 12).^[69,70]

Die Analyse des Biosynthese-Genclusters für Napyradiomycin (Schema 12) aus *Streptomyces* sp. CNQ-525 ergab das Vorhandensein eines Gens für eine Vanadium-abhängige Chlorperoxidase, *napH1*. Gereinigte NapH1 katalysiert die stereospezifische Chlorierung und Bromierung eines Zwischenprodukts (SF2415B1) zu SF2415B3 in der Biosynthese des trichlorierten Meroterpenoids A80915 (Schema 12). Die NapH1-katalysierte Halogenierung führt, zusätzlich zum Einbau eines Chloratoms, noch zu einer Cyclisierung. Allerdings katalysiert NapH1 in Gegenwart von Bromid die unspezifische Bromierung des Substrats, was zur Bildung von zwei neuen bromierten Produkten führt. Es wird angenommen, dass NapH1 stark mit dem Substrat wechselwirkt und in Gegenwart von Chlorid hoch substratspezifisch ist. Wenn das nichtnatürliche Substrat Monochlordimeton verwendet wird, katalysiert NapH1 nur die Bromierung, nicht aber die Chlorierung von Monochlordimeton (Schema 12), wie es auch bereits für Mcl24 aus der Merochlorinbiosynthese beobachtet wurde.^[69,70] Offensichtlich verhalten sich NapH1 und Mcl24 in Gegenwart von Bromid wie unspezifische Bromperoxidasen und bilden hypobromige Säure, die vom aktiven Zentrum freigesetzt wird und anschließend zur unspezifischen Bromierung des nichtnatürlichen Substrats Monochlordimeton führt.

2.1.5. Halogenasen mit bekannter dreidimensionaler Struktur, aber keinem bekannten Substrat

Für einige Halogenasen sind die dreidimensionalen Strukturen bekannt, aber der Nachweis der In-vitro-Aktivität fehlt. Eine dieser Halogenasen ist CndH, eine Flavin-abhängige Halogenase, für die eine Beteiligung an der Biosynthese von Chondrocloren A (Abbildung 2) nachgewiesen werden konnte.^[71] Es wird angenommen, dass CndH die regioselek-



Schema 12. Oben: Chlorierung von Prämerochlorin durch die Vanadium-abhängige Chlorperoxidase Mcl24 und des Zwischenprodukts SF2415B1 der Biosynthese des Meroterpenoids A80915C durch die Vanadium-abhängige Chlorperoxidase NapH1. Mitte: Die chemische Struktur von Napyradiomycin B1. Unten: Beide Chlorperoxidasen, Mcl24 und NapH1, katalysieren die Bromierung von Monochlordimeton, aber nicht seine Chlorierung.^[69,70]

tive Monochlorierung eines PCP-gebundenen Tyrosins in der 3-Position katalysiert. Es konnte zwar noch keine In-vitro-Aktivität nachgewiesen werden, Buedenbender et al. gelang allerdings die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms, dessen aktives Zentrum strukturell sehr ähnlich zu jenem von PrnA ist.^[72] Der katalytisch aktive Lysinrest war vorhanden,^[72] allerdings fehlte der Glutamatrest, der für die Aktivität von PrnA benötigt wird.^[73] Der Glutamatrest scheint nur in Halogenasen benötigt zu werden, die die Halogenierung von weniger reaktiven Substraten wie Tryptophan katalysieren. Im Fall reaktiverer Substrate, z. B. Phenol- oder Pyrrol-Derivate, scheint der Glutamatrest nicht benötigt zu werden.^[48,72] Buedenbender et al. verglichen die Aminosäuresequenzen Flavin-abhängiger Halogenasen, die ein

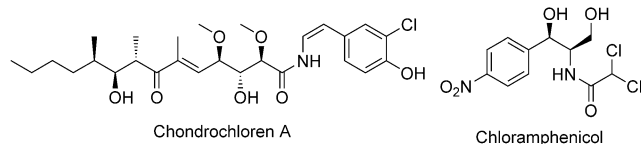


Abbildung 2. Halogenierte Metaboliten, für deren Biosynthese potentielle Halogenasen identifiziert und die dreidimensionalen Strukturen der Enzyme aufgeklärt wurden, aber noch keine In-vitro-Aktivität nachgewiesen werden konnte.^[71, 74]

freies Substrat verwenden, mit denen, die Carrier-gebundene Substrate halogenieren. Sie fanden dabei, dass diese in zwei Aminosäuresequenz-Varianten unterteilt werden können. Allerdings verwendeten Buedenbender et al. für ihre Vergleiche nur vier Halogenasen: die beiden Tryptophan-7-Halogenasen PrnA und RebH sowie die beiden Tyrosin-Halogenasen CndH und SgcC3.^[72] Dieses Vorgehen ist recht problematisch, da Tryptophan-Halogenasen eine relativ hohe Sequenzhomologie zueinander haben und daher immer eine Clusterung aufweisen, aber andererseits eine sehr geringe Sequenzhomologie zu anderen Halogenasen haben (Abbildung 1). Andererseits ist es richtig, dass sich einige Halogenasen, die ein Carrier-Protein-gebundenes Substrat akzeptieren, von den Halogenasen unterscheiden lassen, die ein freies Substrat verwenden. Die Pyrrolyl-S-Carrier-Protein-halogenierenden Enzyme sind um etwa 70 Aminosäuren kürzer als Halogenasen, die andere PCP-gebundene oder freie Substrate umsetzen. Im phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 1 ist gut zu erkennen, dass die Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase PrnC gut von den Pyrrol-Halogenasen, die gebundene Substrate halogenieren, getrennt ist; PrnC verwendet freies Monodechloraminopyrrolnitrin, das sie regioselektiv an der 3-Position des Pyrrolrings halogeniert (Schema 2).^[10]

Ein zweites Beispiel für eine Halogenase mit bekannter dreidimensionaler Struktur, aber bisher noch fehlender In-vitro-Aktivität ist die Flavin-abhängige Halogenase CmlS aus der Biosynthese von Chloramphenicol (Abbildung 2).^[74] Für CmlS konnte bisher keine In-vitro-Aktivität gezeigt werden, da das natürliche Substrat nicht bekannt ist. Dies passt zu den Befunden aus Fütterungsversuchen, mit deren Hilfe es ebenfalls nicht gelungen ist, das Rätsel um den Chlorierungsschritt in der Chloramphenicolbiosynthese zu lösen.^[75] Es wurde vorgeschlagen, dass das Halogenasesubstrat ein CoA-Derivat sein könnte. CmlS ist besonders ungewöhnlich, da die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur ergab, dass es FAD enthält, das über einen Aspartatrest kovalent an das Protein gebunden ist.^[76] Interessanterweise wird die Struktur von CmlS recht häufig für die Modellierung von Halogenase-Strukturen verwendet.^[64]

2.2. Die Anwendung von Halogenasen

2.2.1. In-vivo-Anwendungen

Da die Verwendung Flavin-abhängiger Halogenasen bei In-vitro-Reaktionen durch die fehlende Kenntnis und/oder die fehlende Verfügbarkeit der Substrate sehr stark behindert

wurde, wurden Versuche zur Anwendung der Enzyme in vivo unternommen. In diesen Untersuchungen wurden die Gene von Tryptophan-Halogenasen mit unterschiedlichen Regio-selektivitäten in Bakterien eingeschleust, die ursprünglich bereits halogenierte Metaboliten produzierten. Dadurch konnten Varianten der ursprünglich gebildeten halogenierten Metaboliten erhalten werden. In einigen Fällen brach die Biosynthese ab oder wurde umgelenkt, da ein nachfolgendes Enzym das an einer anderen Stelle halogenierte Zwischenprodukt nicht als Substrat akzeptierte.^[52, 77]

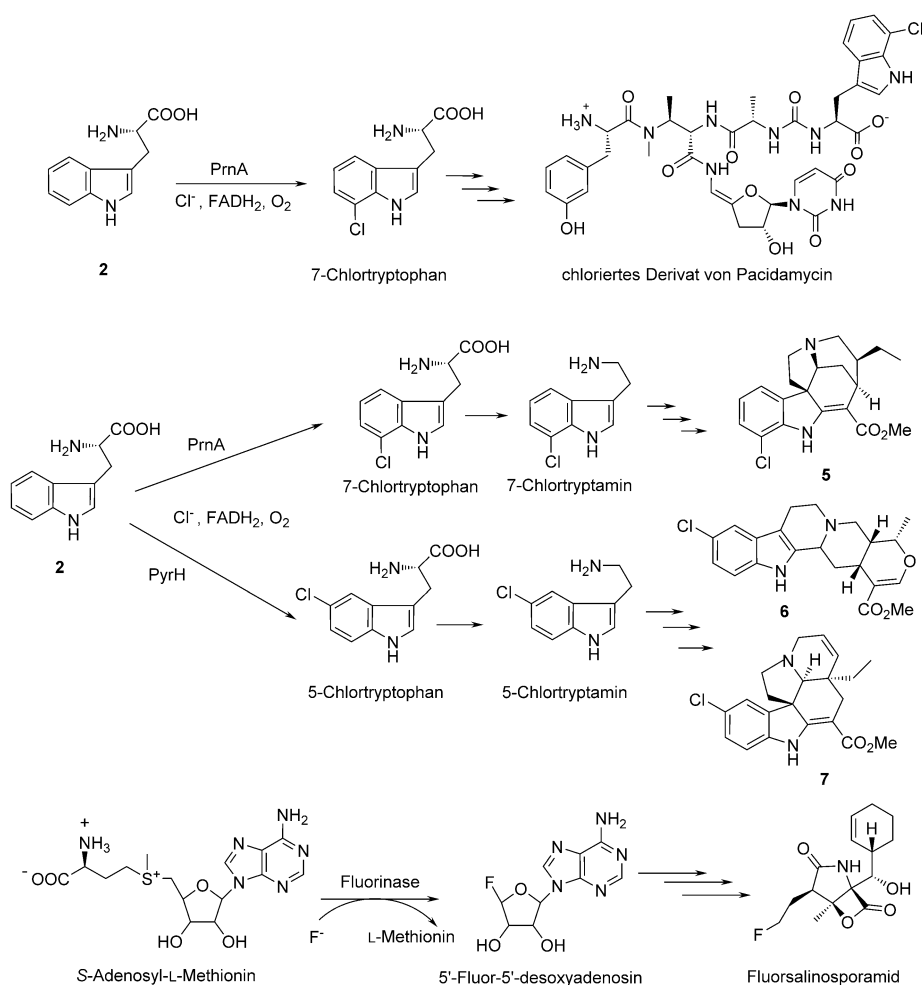
Roy et al. brachten das Tryptophan-7-Halogenasegen *prnA* aus der Biosynthese von **1** in *Streptomyces coeruleorubidus*, den Produzenten von Pacidamycin, ein und erhielten Pacidamycin mit einem an der 7-Position chlorierten Tryptophanrest (Schema 13). Dieses Chloratom konnte nachfolgend chemisch gegen andere Substituenten ausgetauscht werden, wodurch die Einführung anderer funktioneller Gruppen ermöglicht wurde.^[78]

Runguphan et al. brachten das Tryptophan-7-Halogenasegen *rebH* aus der Rebeccamycinbiosynthese^[78] sowie das Tryptophan-5-Halogenasegen *pyrH* aus der Pyrroindomycinbiosynthese^[18] zusammen mit dem Flavinreduktasegen *rebF* aus dem Rebeccamycin-Produzenten *Lechevalieria aerocolonigenes*^[16] in die medizinisch angewendete Pflanze *Catharanthus roseus* ein.^[77] Die Expression der Halogenasegene und des Flavinreduktasegens führte zur Bildung chlorierter und, in Gegenwart von Bromidionen, zur Bildung bromierter Tryptophan-abgeleiteter Alkaloide. Bei einigen davon handelte es sich um die halogenierten Analoga der normalerweise von *C. roseus* gebildeten Alkaloide, aber aufgrund der Substratspezifitäten der Enzyme in der Pflanze wurden auch neue Tryptophan-abgeleitete halogenierte Alkaloide gebildet (**5–7**; Schema 13).^[77] Einige der halogenierten Produkte konnten auch chemisch über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung derivatisiert werden.^[79]

Eustáquio et al. schleusten das Fluorinasegen *fIA* aus *S. cattleya* in den Salinosporamid-Produzenten *Salinispora tropica* ein.^[80] Da *S. tropica* ein Chlorinasegen (*salL*) enthält, wurde dieses Gen zerstört und *fIA* in das Genom von *S. tropica* integriert. Allerdings war die Produktion von Fluorsalinosporamid nicht einfach. Um das Problem der Giftigkeit von Fluorid zu umgehen, wurde Fluorid erst nach Erreichen der frühen oder mittleren exponentiellen Wachstumsphase zugegeben. Dadurch war der *S. tropica*-Klon, der das Fluorinasegen enthielt, in der Lage, Fluorsalinosporamid zu produzieren (Schema 13). Zusätzlich wurden noch weitere fluorierte Verbindungen unbekannter Struktur gebildet. Hiermit konnte gezeigt werden, dass auch die Fluorinase in vivo für die Produktion neuer Fluormetaboliten genutzt werden kann.

2.2.2. Produktion halogenierter Verbindungen in vitro

Halogenasen sind sehr interessant für die Anwendung in der „grünen Chemie“. Sie katalysieren hochselektive und spezifische Halogenierungen ohne die Bildung von Nebenprodukten außer Wasser und im Fall der Flavin-abhängigen Halogenasen Wasserstoffperoxid, das durch die Reaktion von FADH₂ mit Sauerstoff gebildet wird. Wasserstoffperoxid



Schema 13. Manipulation von Biosynthesewegen zur Bildung von neuen halogenierten Metaboliten über die Einschleusung von Halogenasegenen. Oben: In-vivo-Bildung von chloriertem Pacidamycin über die Chlorierung von Tryptophan (2) zu 7-Chlortryptophan durch die Flavin-abhängige Tryptophan-Halogenase PrnA vor dem Einbau in die Pacidamycinbiosynthese. Mitte: Die Transformation der medizinisch genutzten Pflanze *Catharanthus roseus* mit den Genen für Tryptophan-Halogenasen führt zur Bildung halogener Alkaloide wie 5–7. Unten: Das Einbringen des Fluorinasegens aus *Streptomyces cattleya* in den Salinosporamid-Produzenten *Salinispora tropica* führt zur Bildung von Fluorsalinosporamid.^[77, 78, 80]

kann aber problemlos in situ durch Katalase in Sauerstoff und Wasser gespalten werden. Die Fluorinase hat eine äußerst hohe Substratspezifität: Bisher ist S-Adenosyl-L-methionin das einzig bekannte Substrat für dieses Enzym und für die verwandte Chlorinase. Fluorinase kann allerdings zur Produktion von ^{18}F -markierten Molekülen für den Einsatz in der Diagnostik verwendet werden.^[81, 82] Die Nicht-Häm-Eisen-Halogenasen müssen unter anaeroben Bedingungen gereinigt werden und sind sehr sauerstoffempfindlich. Flavin-abhängige Halogenasen sind prinzipiell sehr stabil und können in Gegenwart von Sauerstoff für Monate gelagert werden. Leider zeigen Flavin-abhängige Halogenasen nur eine sehr geringe Aktivität ($k_{\text{cat}} = 1\text{--}7\text{ min}^{-1}$). Bezüglich der Stabilität unter Reaktionsbedingungen gab es einige Verwirrung, aber inzwischen ist man sich einig, dass sie bereits nach etwa zwei Stunden Inkubation unter Reaktionsbedingungen inaktiv sind.^[73, 83–86]

Lang et al. zeigten 2011, dass die Regioselektivität von Halogenasen durch ortsspezifische Mutagenese modifiziert werden kann. Durch Austausch eines großen Phenylalaninrests in Nachbarschaft zum Substrat Tryptophan in der Tryptophan-7-Halogenase PrnA gegen einen kleinen Alaninrest wurde die Regioselektivität von PrnA beeinflusst, und die PrnA-Variante zeigte zusätzlich Tryptophan-5-Halogenase-Aktivität.^[87] Runguphan et al. hatten beobachtet, dass die Bildung von Indolalkaloiden ausgehend von 7-Chlortryptophan durch die Aktivität der Tryptamin-bildenden Decarboxylase der Pflanze *C. roseus* limitiert wurde.^[77] Sie entschlossen sich daher, die Akzeptanz der Tryptophan-7-Halogenase RebH für Tryptamin als Substrat zu erhöhen. Aufbauend auf rationalem Design wurde ein Tyrosinrest in dem Bereich, in dem die Säuregruppe des Substrats Tryptophan mit dem Enzym wechselwirkt, gegen einen größeren Tryptophanrest ausgetauscht. Diese Mutation führte zu einer bevorzugten Halogenierung von Tryptamin gegenüber 2. Dies zeigt, dass auch die Änderung der Substratspezifität Flavin-abhängiger Halogenasen durch ortsspezifische Mutagenese möglich ist.^[88]

Nach der ersten Publikation über die Substratspezifität der Flavin-abhängigen Tryptophan-7-Halogenase PrnA im Jahr 2001^[89] wurden in den folgenden

12 Jahren keine weiteren Untersuchungsergebnisse zur Substratspezifität Flavin-abhängiger Halogenasen veröffentlicht. Payne et al. gelang mit der Tryptophan-7-Halogenase RebH die Chlorierung und Bromierung von Indol, einiger substituierter Tryptophan-Derivate, Tryptolin und 2-Aminonaphthalin (Abbildung 3).^[83] Frese et al. zeigten, dass RebH auch substituierte Tryptophan-Derivate wie 5-Fluor-, 5-Hydroxy-, 5-Methyl-, 5-Amino- und 6-Fluortryptophan akzeptiert (Abbildung 3).^[85] Shepherd et al. erweiterten den biokatalytischen Bereich von PrnA und PyrH noch weiter, indem sie nicht nur substituierte Tryptophane, sondern auch Anilin-Derivate wie Anthranilsäure und Kynurenin einsetzten (Abbildung 3). Dies zeigt, dass die Substratspezifität der Tryptophan-Halogenasen offensichtlich nicht so hoch ist, wie ursprünglich angenommen, und dass ihr Substratbereich nicht auf Indol-Derivate beschränkt ist.^[90]

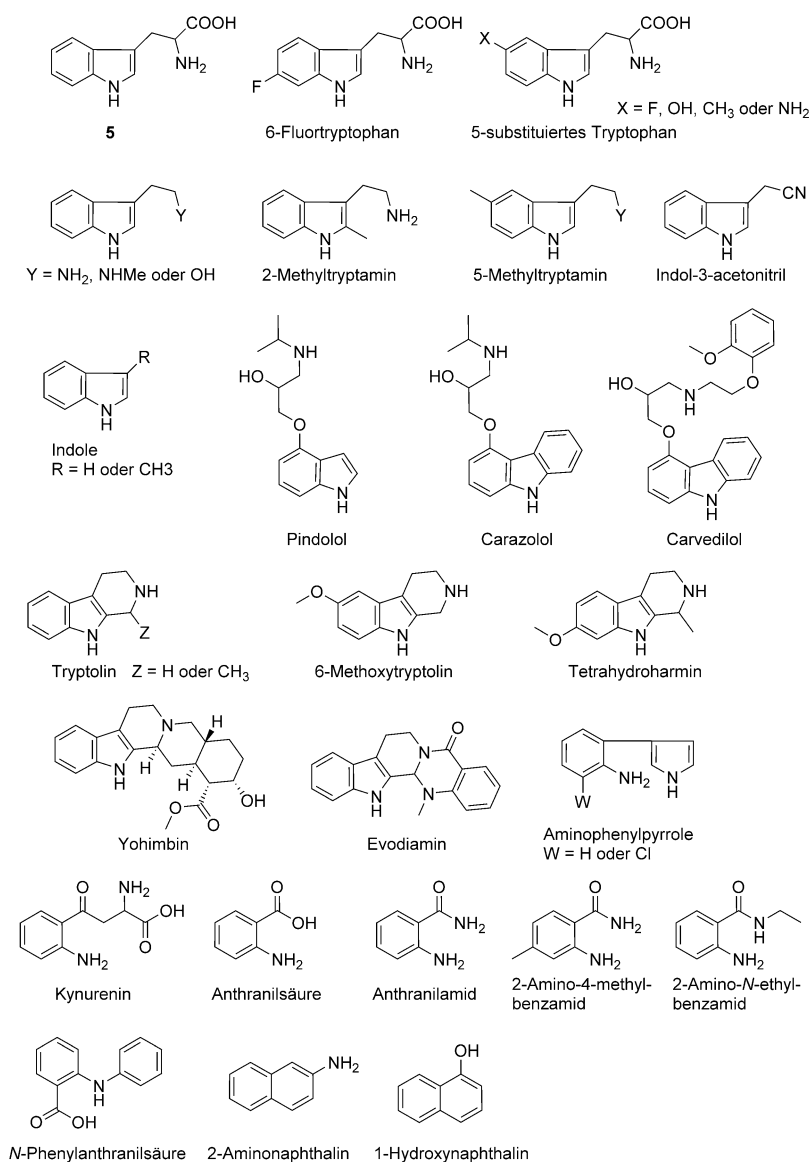


Abbildung 3. Von den Tryptophan-Halogenasen akzeptierte Substrate.^[83, 85, 89, 90]

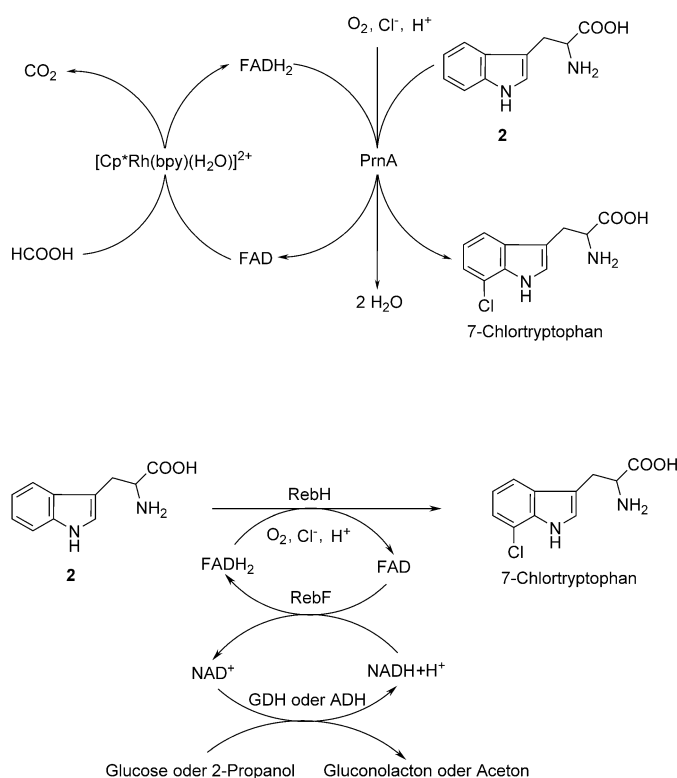
Flavin-abhängige Halogenasen benötigen keine spezifische Flavinreduktase, sondern freies FADH_2 .^[13] Daher kann in vitro eine Reihe verschiedener Flavinreduktasen verwendet oder FADH_2 kann in situ mithilfe eines Metallkatalysators gebildet werden. Allerdings ist in einem solchen System die Halogenaseaktivität stark verringert.^[13] Wenn FADH_2 enzymatisch gebildet werden soll, muss eine Regenerierung von NADH erfolgen. Zur Lösung des Problems der NADH-Regenerierung setzten Payne et al. und Shepherd et al. Glucosedehydrogenase ein (Schema 14).^[83, 90] RebH und RebF wurden nach Reinigung aus *E.-coli*-Extrakten mittels Affinitätschromatographie verwendet. Frese et al. nutzten ein ähnliches System, ersetzten aber die Glucosedehydrogenase durch eine Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. Die Alkoholdehydrogenase war in *E. coli* produziert worden und wurde mit 2-Propanol als Substrat eingesetzt. RebH und die Flavinreduktase PrnF^[93] wurden als gereinigte Enzyme verwendet, während die Alkoholdehydrogenase nach einem

Hitzegefällungsschritt eingesetzt wurde. Die Einführung eines NADH-Regenerierungssystems in die Reaktion der Tryptophan-Halogenasen ist ein wichtiger Schritt hin zur Produktion halogenierter Verbindungen in großem Maßstab. Frese und Sewald^[86] gelang die enzymatische Halogenierung von **2** im Gramm-Maßstab durch die Herstellung von „cross-linked enzyme aggregates“ (CLEAs) aus *E.-coli*-Rohextrakten. Die Flavinreduktase PrnF und die Alkoholdehydrogenase wurden zum *E.-coli*-Rohextrakt gegeben, und die kovalente Verknüpfung der Proteine erfolgte mit Glutaraldehyd nach einer Ammoniumsulfatfällung. Dabei wurde festgestellt, dass die Bildung von CLEAs die Lebensdauer von RebH unter Reaktionsbedingungen deutlich verlängerte und dass die CLEAs mindestens zehnmals wiederverwendet werden können.^[86] Allerdings wurden *E.-coli*-Rohextrakte verwendet, und die Substrate der Halogenase – Tryptophan und Tryptophan-Derivate – sind ebenfalls Substrate für die Tryptophanase, die in diesen *E.-coli*-Extrakten vorhanden ist. Dadurch wird eine Mischung aus Produkten erhalten, wodurch die Effektivität der Reaktion verringert wird und ebenfalls zusätzliche Reinigungsschritte notwendig werden. Dies könnte vermieden werden, wenn Tryptophanase-freie Wirte wie Pseudomonaden verwendet würden, die sehr gut für die Expression von Halogenasen aus verschiedenen Quellen geeignet sind.^[11, 17, 18]

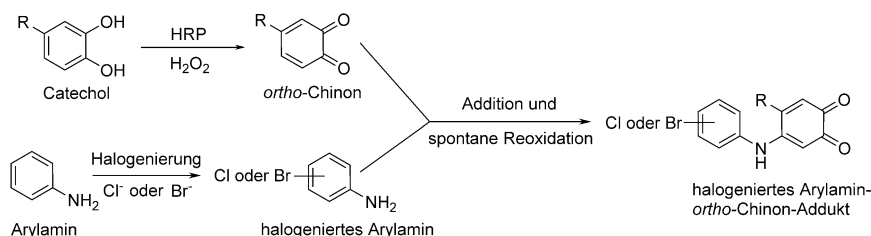
Die thermische Stabilität und die katalytische Lebensdauer von RebH konnten durch gerichtete Evolution verbessert werden. Poor et al. erhielten eine RebH-Mutante mit acht Aminosäureaustauschen, die bei erhöhter Temperatur eine verlängerte Lebensdauer unter Reaktionsbedingungen

gegenüber jener des Wildtypenzym, aber auch eine deutlich verringerte Wechselzahl aufweist.^[84]

Die Konstruktion von verbesserten Halogenasen mit höheren Aktivitäten, verringerter Substratspezifität und längerer katalytischer Lebensdauer wird durch ein schwieriges Screening stark behindert. Bisher mussten Klonbanken in sehr aufwendigen Prozeduren mit der Anzucht der Klone, Zelllyse, gefolgt von der Inkubation mit Substraten und HPLC-Analyse, durchmustert werden. Daher wäre ein Test, der auf einer einfachen Nachweismethode beruht, sehr willkommen und hilfreich bei der Konstruktion verbesserter Halogenase-Varianten. Hosford et al. entwickelten einen Hochdurchsatz-Test für die Halogenierung von Arylaminen. Dieser Test basiert auf der Meerrettichperoxidase (HRP)-vermittelten Chinon-Amin-Kupplung (Schema 15), die für die spektrophotometrische Analyse enzymatischer Halogenierungen geeignet ist, da die Absorptionsmaxima der halogenierten Kupplungsprodukte gegenüber denen der unhalo-



Schema 14. Regenerierungssysteme für Flavin-abhängige Halogenasen. Oben: Eine direkte Regenerierung von FADH_2 kann durch einen Organometallkomplex erreicht werden; bpy = 2,2'-Bipyridyl, Cp^* = Pentamethylcyclopentadienyl. Unten: Für die enzymatische Bildung von FADH_2 wird NADH benötigt, das entweder mittels Glucose und Glucosedehydrogenase oder mithilfe von 2-Propanol und Alkoholdehydrogenase regeneriert werden kann.^[13, 84, 91]



Schema 15. Hochdurchsatz-Test für den Nachweis halogener Arylamine.^[91]

genierten Produkte verschoben sind.^[91] Allerdings ist der Test wegen der Notwendigkeit einer Arylamin-Funktion auf eine relativ kleine Gruppe von Halogenasesubstraten beschränkt.

3. Ausblick

In den letzten Jahren wurden vielversprechende Fortschritte auf dem Gebiet der biologischen Halogenierung erzielt. Nach der Entdeckung der Flavin-abhängigen Halogenasen und der Nicht-Häm-Eisen-Halogenasen sowie der Aufklärung der grundlegenden Reaktionsmechanismen hat sich der Schwerpunkt der Untersuchungen hin zu In-vivo-

und In-vitro-Anwendungen der Halogenasen für die Nebenprodukt-freie Produktion halogener Verbindungen verschoben. Erste Erfolge bei der Verbesserung der Enzymstabilität, Erhöhung der Lebensdauer der Enzyme unter Reaktionsbedingungen, Modifikation der Substratspezifität und der Regioselektivität durch fehleranfällige oder ortsspezifische Mutagenese wurden beschrieben. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Substratspezifität – zumindest im Fall der Tryptophan-Halogenasen – nicht so hoch ist, wie ursprünglich angenommen. An der Entwicklung von Hochdurchsatz-Tests wird gearbeitet. Dies wird es ermöglichen, Mutanten-Bibliotheken einfacher zu durchmustern. Ein großes Problem ist aber die geringe Aktivität der Halogenasen, die bisher noch nicht in dem für industrielle In-vitro-Anwendungen notwendigen Maß verbessert werden konnte. Mit der Entwicklung von neuen, einfacheren und schneller durchführbaren Aktivitätstests besteht die Hoffnung, dass dies in der nahen Zukunft erreicht werden kann. Dies würde den Weg für einen intensiven Einsatz von halogenierenden Enzymen in der industriellen Produktion ebnen. Die Verwendung von In-vivo-Systemen ermöglicht bereits eine verbesserte Produktion von wichtigen halogenierten Verbindungen, wie Vancomycin und 7-Chlortetracyclin, indem man den Halogenasegehalt in den produzierenden Organismen erhöht.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6374–6389
Angew. Chem. **2016**, 128, 6482–6498

- [1] P. D. Shaw, L. P. Hager, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 1011–1012.
- [2] H. Vilter, *Phytochemistry* **1984**, 23, 1387–1390.
- [3] M. Sundaramoorthy, J. Taylor, T. L. Poulos, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 461–473.
- [4] A. Messerschmidt, L. Prade, R. Wever, *Chem. Biol.* **1997**, 378, 309–315.
- [5] K. Kühnel, W. Blankenfeld, J. Turner, I. Schlichting, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 23990–23998.
- [6] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1763–1768.
- [7] B. Hofmann, S. Tölzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K.-H. van Pée, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 889–900.
- [8] T. Dai, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, M. Hasegawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, 59, 1099–1106.
- [9] P. S. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 2147–2154.
- [10] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2012–2013; *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2102–2104.
- [11] S. Keller, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2300–2302; *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2380–2382.
- [12] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, 309, 2216–2219.
- [13] S. Unversucht, F. Hollmann, A. Schmid, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 7–8, 1163–1167.
- [14] X. Zhu, W. De Laurentis, K. Leang, J. Herrmann, K. Ihlefeld, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2009**, 391, 74–85.

- [15] S. Kirner, P. E. Hammer, S. D. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1939–1943.
- [16] C. Sánchez, I. A. Butovich, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 519–531.
- [17] C. Seibold, H. Schnerr, J. Rumpf, A. Kunzendorf, C. Hatscher, T. Wage, A. J. Ernyei, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 401–408.
- [18] S. Zehner, A. Kotzsch, B. Bister, R. D. Süßmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445–452.
- [19] N. Sitachitta, J. Rossi, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, M. D. Fletcher, C. L. Willis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7131–7132.
- [20] N. Sitachitta, B. L. Marquez, R. T. Williamson, J. Rossi, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, V. A. Nguyen, C. L. Willis, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9103–9113.
- [21] Z. Chang, P. Flat, W. H. Gerwick, V. A. Nguyen, C. L. Willis, D. H. Sherman, *Gene* **2002**, *296*, 235–247.
- [22] J. H. Zhang, N. B. Quigley, D. C. Gross, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4009–4020.
- [23] M. Ullrich, C. L. Bender, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 7574–7586.
- [24] F. H. Vaillancourt, J. Yin, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10111–10116.
- [25] E. L. Hegg, L. Que, Jr., *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 625–629.
- [26] K. D. Koehntop, J. P. Emerson, L. Que, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 87–93.
- [27] F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. E. O'Connor, C. T. Walsh, *Nature* **2005**, *436*, 1191–1194.
- [28] D. P. Galonic, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3900–3901.
- [29] L. C. Blasiak, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, C. L. Drennan, *Nature* **2006**, *440*, 368–371.
- [30] D. O'Hagan, C. Schaffrath, S. Cobb, J. T. G. Hamilton, C. D. Murphy, *Nature* **2002**, *416*, 279.
- [31] M. Sanada, T. Miyano, S. Iwadare, J. M. Williamson, B. H. Arison, J. L. Smith, A. W. Douglas, J. M. Liesch, W. Inamine, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 259–265.
- [32] X. Zhu, D. A. Robinson, A. R. McEwan, D. O'Hagan, J. H. Naismith, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14597–14604.
- [33] H. Deng, S. L. Cobb, A. R. McEwan, R. P. McGlinchey, J. H. Naismith, D. O'Hagan, D. A. Robinson, J. B. Spencer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 759–762; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 773–776.
- [34] A. S. Eustáquio, F. Pojer, J. P. Noel, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 69–74.
- [35] K.-H. van Pée, E. P. Patallo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 631–641.
- [36] S. Wang, Y. Xu, E. A. Maine, E. M. K. Wijeratne, P. Espinosa-Artiles, A. A. L. Gunatilaka, I. Molnár, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1326–1338.
- [37] J. Zeng, J. Zhan, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2119–2123.
- [38] C. S. Neumann, C. T. Walsh, R. R. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5798–5803.
- [39] K. Mohri, T. Hata, H. Kikuchi, Y. Oshima, H. Urushihara, *Biol. Open* **2014**, *3*, 553–560.
- [40] D. Milbredt, E. P. Patallo, K.-H. van Pée, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1011–1020.
- [41] D. G. Fujimori, S. Hrvatin, C. S. Neumann, M. Strieker, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16498–16503.
- [42] J. R. Heemstra, Jr., C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14024–14025.
- [43] W. Jiang, J. R. Heemstra, Jr., R. R. Forseth, C. S. Neumann, S. Manaviazar, F. C. Schroeder, K. J. Hale, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6063–6072.
- [44] B. Nowak-Thompson, N. Chaney, J. S. Wing, S. J. Gould, J. Loper, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2166–2174.
- [45] P. C. Dorrestein, E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13843–13848.
- [46] M. G. Thomas, M. D. Burkart, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 171–184.
- [47] V. Agarwal, A. A. El Gamal, K. Yamanaka, D. Poth, R. D. Kersten, M. Schorn, E. E. Allen, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 640–647.
- [48] A. H. Pang, S. Garneau-Tsodikova, O. V. Tsodikov, *J. Struct. Biol.* **2015**, *192*, 349–357.
- [49] K.-H. van Pée, *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 375–399.
- [50] J. D. Peschke, U. Hanefeld, H. Laatsch, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 628–630.
- [51] U. Hanefeld, H. G. Floss, H. Laatsch, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3604–3608.
- [52] K.-H. van Pée, *Alkaloids* **2012**, *71*, 167–210.
- [53] S. Lin, S. G. Van Lanen, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12432–12438.
- [54] O. Puk, P. Huber, D. Bishoff, J. Recktenwald, G. Jung, R. D. Süßmuth, K.-H. van Pée, W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 225–235.
- [55] S. Pelzer, R. Süßmuth, D. Heckmann, J. Recktenwald, P. Huber, G. Jung, W. Wohlleben, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565–1573.
- [56] S. Mulyani, E. Egel, C. Kittel, S. Turkanovic, W. Wohlleben, R. D. Süßmuth, K.-H. van Pée, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 266–271.
- [57] P. C. Schmartz, K. Zerbe, K. Abou-Hadeed, J. A. Robinson, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5574–5577.
- [58] J. R. D. McCormick, „Tetracyclines“, in *Antibiotics II* (Hrsg.: D. Gottlieb, P. D. Shaw), Springer-Verlag, Berlin und New York, **1967**.
- [59] T. Zhu, X. Cheng, Y. Liu, Z. Deng, D. You, *Metab. Eng.* **2013**, *19*, 69–78.
- [60] J. R. D. McCormick, N. O. Sjolander, P. A. Miller, U. Hirsch, N. H. Arnold, A. P. Doerschuk, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6460–6461.
- [61] D. Perlman, L. J. Heuser, J. B. Semar, W. R. Frazier, J. A. Boska, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4481.
- [62] Z. Host'álek, Z. Vanek, *Biosynth. Tetracyclines in Tetracyclines* **1985**, S. 137–178.
- [63] C. D. Reeves, Z. Hu, R. Reid, J. T. Kealey, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5121–5129.
- [64] J. Zeng, A. K. Lytle, D. Gage, S. J. Johnson, J. Zhan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1001–1003.
- [65] M. L. Hillwig, H. A. Fuhrmann, K. Ittiarnornkul, T. S. Sevco, D. H. Kwak, X. Liu, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 665–669.
- [66] M. L. Hillwig, X. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 921–923.
- [67] J. N. Carter-Franklin, A. Buttler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15060–15066.
- [68] L. Kaysser, P. Bernhardt, S.-J. Nam, S. Loesgen, G. Ruby, P. Skewes-Cox, P. R. Jensen, W. Fenical, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11988–11991.
- [69] S. Diethelm, R. Teufel, L. P. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023–11026; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11203–11206.
- [70] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyanaga, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268–4270.
- [71] S. Rachid, M. Scharfe, H. Blöcker, K. J. Weissman, R. Müller, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 70–81.
- [72] S. Buedenbender, S. Rachid, R. Müller, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 520–530.
- [73] S. Flecks, E. P. Patallo, X. Zhu, A. J. Ernyei, G. Seifert, A. Schneider, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9533–9536; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9676–9679.
- [74] M. Pirae, R. L. White, L. C. Vining, *Microbiology* **2004**, *150*, 85–94.

- [75] J. Doull, Z. Ahmed, C. Stuttard, L. C. Vining, *Microbiology* **1985**, *131*, 97–104.
- [76] K. Podzelinska, R. Latimer, A. Bhattacharya, L. C. Vining, D. L. Zechel, Z. Jia, *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 316–331.
- [77] W. Runguphan, X. Qu, S. E. O'Connor, *Nature* **2010**, *468*, 461–464.
- [78] A. D. Roy, S. Grischow, N. Cairns, R. J. M. Goss, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12243–12245.
- [79] W. Runguphan, S. E. O'Connor, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2850–2853.
- [80] A. S. Eustáquio, D. O'Hagan, B. S. Moore, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 378–382.
- [81] S. Dall'Angelo, N. Bandaranayaka, A. D. Windhorst, D. J. Vugts, D. van der Born, M. Onega, L. F. Schweiger, M. Zanada, D. O'Hagan, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 464–470.
- [82] S. Thompson, Q. Zhang, M. Onega, S. McMahon, I. Fleming, S. Ashworth, J. H. Naismith, J. Passchier, D. O'Hagan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8913–8918; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9059–9064.
- [83] J. T. Payne, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5271–5274; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5379–5382.
- [84] C. B. Poor, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1286–1289.
- [85] M. Frese, P. H. Guzowska, H. Voß, N. Sewald, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1270–1276.
- [86] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 298–301; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 302–305.
- [87] A. Lang, S. Polnick, T. Nicke, P. William, E. P. Patallo, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2951–2953; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3007–3010.
- [88] W. S. Glenn, E. Nims, S. E. O'Connor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19346–19349.
- [89] M. Hölzer, W. Burd, H.-U. Reißig, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 591–595.
- [90] A. A. Shepherd, C. Karthikeyan, J. Latham, A.-W. Struck, M. L. Thompson, B. R. K. Meno, M. Q. Styles, C. Levy, J. Micklefield, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3454–3460.
- [91] J. Hosford, S. Shepherd, J. Micklefield, L. S. Wong, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16759–16763.
- [92] K. H. van Pée, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [93] K. H. van Pée, unveröffentlichte Ergebnisse.
- Eingegangen am 13. Oktober 2015,
veränderte Fassung am 1. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 5. April 2016