

Biosynthesewege

DOI: 10.1002/ange.200600511

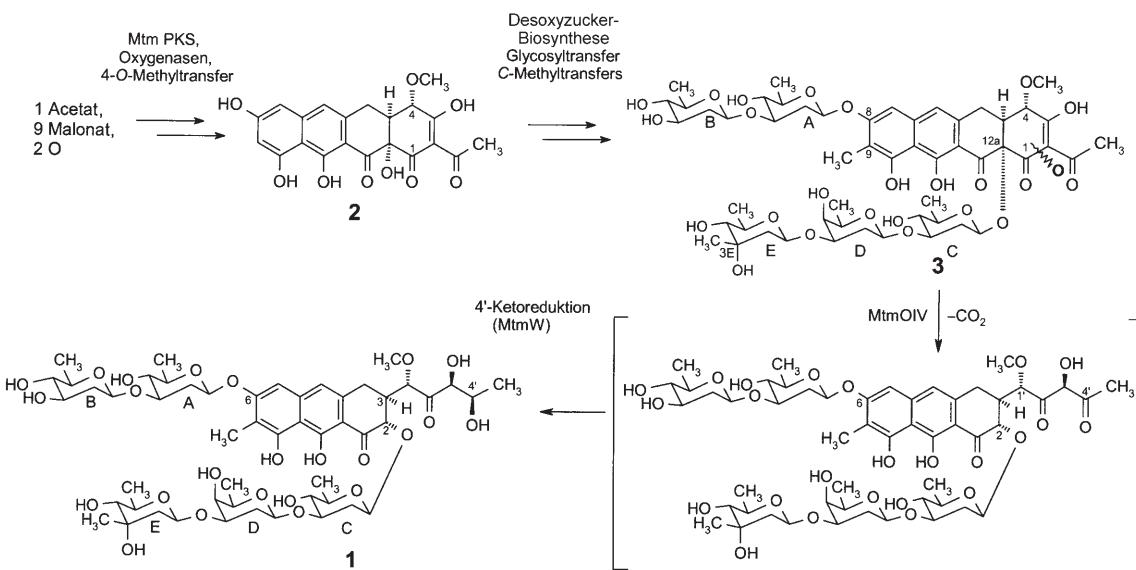
Premithramycinon G, ein frühes Shuntprodukt des Mithramycin-Biosyntheseweges, akkumuliert nach Inaktivierung der Oxygenase MtmOII

Mohamed S. Abdelfattah und Jürgen Rohr*

Mithramycin (**1**, MTM, Schema 1, auch bekannt unter den Bezeichnungen Mithramycin A, Mithracin oder Plicamycin) ist ein Aureolsäure-Tumortherapeutikum, das von mehreren Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces* produziert wird, darunter *Streptomyces argillaceus* (ATCC12956). Es inhibiert das Krebswachstum durch Vernetzung von GC-reicher DNA, was zum Unterbrechen von Sp1- oder Sp3-abhängigen Wegen (Sp = Spezifitätsprotein) zu Protooncogenen wie *c-myc*,^[1] *APC*^[2] oder *c-src*^[3] führt. Der letztere Effekt wurde auch mit der einmaligen calciumsenkenden Aktivität des Mithramycins in Verbindung gebracht.^[3] MTM hat sich zu einem wichtigen biochemischen Reagens zur Untersuchung von Sp-abhängigen Transduktionswegen entwickelt, wird wegen seiner toxischen Nebenwirkungen aber nur noch selten als Tumortherapeutikum eingesetzt. Einzige Ausnahme ist die Behandlung von tumorassozierter Hypercalcämie, die sich anderen Chemotherapeutika widersetzt.^[4-8] Allerdings wurde MTM kürzlich als mögliche Leitsubstanz zur Behandlung von neurologischen Krankheiten,^[9,10] Arthritis^[11] und hämatologischen Störungen identifiziert.^[12] Diese neuen Anwendungen erfordern nur sehr geringe, weit weniger toxische Dosierungen des Medikaments, allerdings konnte der Wirkmechanismus in diesem Zusammenhang noch nicht aufgeklärt werden.

Die Biosynthese von MTM ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden,^[13-18] wobei auch etliche MTM-Analoga durch kombinatorische Biosynthese hergestellt wurden, einige davon mit offenbar günstigem biologischem Aktivitätsprofil.^[19-21] Die Biosynthese von MTM beginnt mit einer durch Typ-II-Polyketidsynthase (PKS) katalysierten Kondensation mehrerer Acyl-CoA-Einheiten. Die ersten isolierbaren tetracyclischen Zwischenprodukte sind Demethylpremithramycinon und Premithramycinon (**2**), das zu Premithramycin B (**3**) glykosyliert und C-methyliert wird. Abgeschlossen wird die Biosynthese durch eine oxidative Bindungsspaltung innerhalb des vierten Ringes von **3**, an die sich eine Decarboxylierung und Reduktion der resultierenden 4'-Ketofunktion durch die Oxygenase MtmOIV bzw. die Ketoreduktase MtmW anschließt (Schema 1).^[20,22,23] Bislang allerdings sind die Schritte zwischen der PKS-Katalyse und

[*] Dr. M. S. Abdelfattah, Prof. Dr. J. Rohr
 University of Kentucky
 Department of Pharmaceutical Sciences
 College of Pharmacy
 725 Rose Street, Lexington, KY 40536-0082 (USA)
 Fax: (+1) 859-257-7564
 E-Mail: jrohr2@email.uky.edu



Schema 1. Biosyntheseweg zu Mithramycin (MTM, **1**). Gezeigt sind die Schlüsselzwischenprodukte Premithramycinon (**2**) und Premithramycin B (**3**) sowie die spät erfolgende oxidative Umlagerung, die durch die Oxygenase MtmOIV katalysiert wird.

der Bildung von **2** weitgehend unbekannt, und insbesondere die Rolle der Produkte dreier Oxygenase-codierender Gene, *mtmOI*, *mtmOII* und *mtmOIII*, ist völlig unklar.^[13] Hier beschreiben wir die Isolierung, Strukturaufklärung und mögliche biosynthetische Bedeutung eines neuartigen frühen Shunprodukte des MTM-Biosyntheseweges, Premithramycinon G (**4**, Abbildung 1 und Schema 2), das von der MtmOII⁻-Mutante *S. argillaceus* M7OII angereichert wird.^[13]

Die Inaktivierung der Gene von Post-PKS-Enzymen und die Strukturaufklärung der resultierenden Intermediate oder Shunprodukte ist nicht nur eine wertvolle Methode, um Biosynthesewege aufzuklären, sondern birgt zudem das Potenzial, neue „nichtnatürliche“ Naturstoffe mit besserem oder verändertem Bioaktivitätsprofil zu erzeugen.^[24] Bezuglich der Oxygenasen des MTM-Biosyntheseweges konnte allerdings nur ein brauchbares Resultat mit dieser Methode erzielt werden. Vier Oxygenase-Gene (*mtmOI*, *mtmOII*, *mtmOIII*, *mtmOIV*) wurden im MTM-Gencluster gefunden und durch Einbringen von Antibiotika-Resistenzkassetten inaktiviert. Während die Inaktivierung von *mtmOIV* klare Resultate bezüglich der Rolle des zugehörigen Enzyms MtmOIV erbrachte,^[22,23] schien weder die Inaktivierung von *mtmOI* noch von *mtmOIII* einen Einfluss auf die MTM-Biosynthese auszuüben,^[13] und die Inaktivierung von *mtmOII* ergab eine „nicht-produzierende“ Blockmutante, in der sich nur ein instabiles Produkt anzureichern schien.^[13,14]

Nachdem etliche Versuche zur Isolierung dieses scheinbar instabilen Zwischenprodukts gescheitert waren, entwarfen wir ein Genkomplementierungsexperiment, in dem TcmH, eine früh agierende Oxygenase aus dem Tetracenomycin-Gencluster, das Intermediat abfing und in Premithramycinon H (**5**) umwandelte. Diese Experimente erlaubten vage, indirekte Rückschlüsse bezüglich der Rolle von MtmOII in der MTM-Biosynthese.^[25] Nun aber gelang es uns, ein neuartiges Shunprodukt direkt von der M7OII-Blockmutante zu

isolieren, was zu neuen Hypothesen zur Rolle von MtmOII in der Biosynthese von Mithramycin führt.

Die Analyse des Rohextraktes der M7OII-Mutante aus *S. argillaceus* durch HPLC/MS (Abbildung 1) zeigte die Anreicherung eines Hauptproduktes (das wir später als Pre-

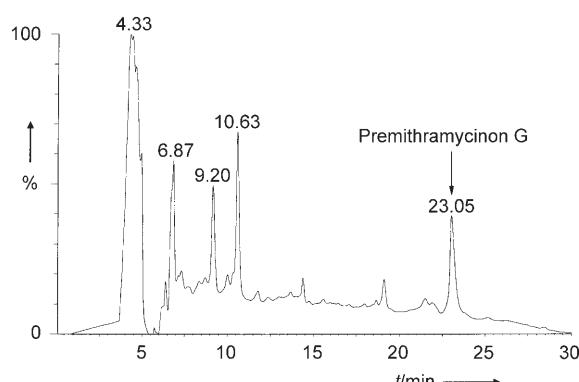


Abbildung 1. HPLC/MS-Analyse des Rohextraktes der M7OII-Mutante.

mithramycinon G bezeichneten), das mit seinem UV-Spektrum deutlich von allen bekannten Intermediaten der MTM-Biosynthese abweicht. Es wird in Mengen von 2.5 mg L^{-1} produziert und hat ein Molekulargewicht von $M = 452 \text{ g mol}^{-1}$, basierend auf dem Molekülionenpeak m/z 451 (deprotoniert) im negativen APCI-Massenspektrum. Das Molekulargewicht wurde durch ein ESI-Massenspektrum im Positivmodus (m/z 475 [$M+\text{Na}^+$] und 453 [$M+\text{H}^+$]) und durch ein hochauflösendes EI-Massenspektrum (m/z 452.3667, 8 %, ber. 452.3671) bestätigt, wodurch die Summenformel $C_{23}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$ eindeutig abgesichert wurde.

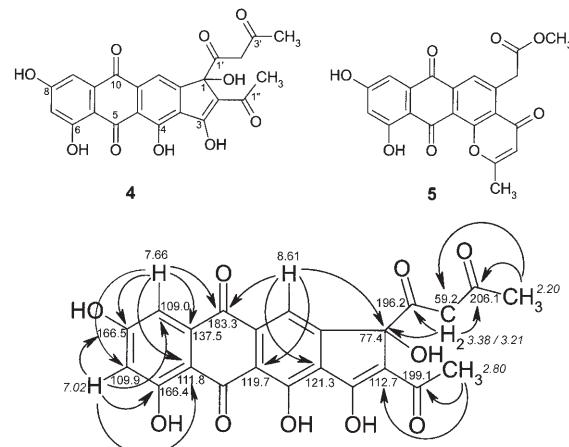
Das ^1H -NMR-Spektrum von Premithramycinon G (Tabelle 1) zeigt zwei *meta*-koppelnde Arenprotonen bei $\delta = 7.66$ und 7.02 ppm sowie ein Singulett bei $\delta = 8.61$ ppm. Im aliphatischen Bereich fallen zwei Gruppen von Signalen auf, die

Tabelle 1: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sowie Einbauraten der Fütterung mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ (* = angereicherte C-Atome) für **4**.^[a]

Position	Premithramycinon G (4)	
	δ_{H}	δ_{C}
1*	–	77.4 (27.5)
2*	–	112.7 (30.1)
3*	–	186.4 (30.1)
3a*	–	121.3 (36.0)
4*	–	166.3 (36.0)
4a*	–	119.7 (28.0)
5*	–	188.2 (28.0)
5a*	–	111.8 (33.4)
6*	–	166.4 (33.4)
7*	7.02 (d, 1.80 Hz, 1 H)	109.9 (32.6)
8*	–	166.5 (32.6)
9*	7.66 (d, 1.80 Hz, 1 H)	109.0 (30.1)
9a*	–	137.5 (30.1)
10*	–	183.3 (35.2)
10a*	–	124.7 (35.2)
11*	8.61 (s, 1 H)	114.9 (31.4)
11a*	–	152.1 (31.4)
1’*	–	196.2 (27.5)
2’	3.38, 3.21 (dd, 12.1 Hz, 2 H)	59.2
3’	–	206.1
4’	2.20 (s, 3 H)	31.2
1”*	–	199.1 (29.3)
2”*	2.80 (s, 3 H)	32.9 (29.3)

[a] 9.4 T, $[\text{D}_5]\text{Pyridin}$; chemische Verschiebungen in ppm (Multiplizität, J in Hz; J_{CC} aus dem Einbauexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$).

bei $\delta = 3.38$ und 3.21 ppm von einer Methylengruppe und die bei $\delta = 2.80$ und 2.20 ppm von zwei Methylgruppen. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt alle 23 Signale, von denen 17 durch quartäre C-Atome einschließlich der fünf Carbonyl-Kohlenstoffatome ($\delta = 206.1, 199.1, 196.2, 188.2$ und 183.3 ppm) verursacht werden. Im aliphatischen Bereich werden die Signale dreier Methin-, einer Methylen- und zweier Methylgruppen beobachtet. Datenbankrecherchen ergaben keinen Treffer, der mit diesen NMR-Daten und der abgeleiteten Summenformel in Einklang gebracht werden konnte. 2D-NMR-Studien (HSQC und CIGAR-HMBC,^[26,27] Schema 2) führten schließlich zu der Struktur **4** für Premithramycinon G, das ein zuvor nicht beobachtetes 1,3,4,6,8-Pentahydroxy-1*H*-cyclopenta[*b*]anthracen-5,10-dion-Gerüst aufweist. Im HMBC-Spektrum können $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen zwischen dem Aren-Singulett bei $\delta = 8.61$ ppm und den Kohlenstoffatomen bei $\delta = 183.3, 121.3, 119.7$ und 77.4 ppm beobachtet werden. Die anderen beiden Aren-Protonen in *meta*-Position bei $\delta = 7.66$ und 7.02 ppm zeigen $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen mit Kohlenstoffsignalen bei $\delta = 183.3, 111.8$ und 109.9 ppm bzw. $\delta = 111.8$ und 109.0 ppm. Die Position der Acylgruppe an C2 wurde durch eine $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplung zwischen den Methylprotonen bei $\delta = 2.80$ ppm und dem quartären Kohlenstoff bei $\delta = 112.7$ ppm gesichert. Die im HMBC-Spektrum beobachteten Fern-

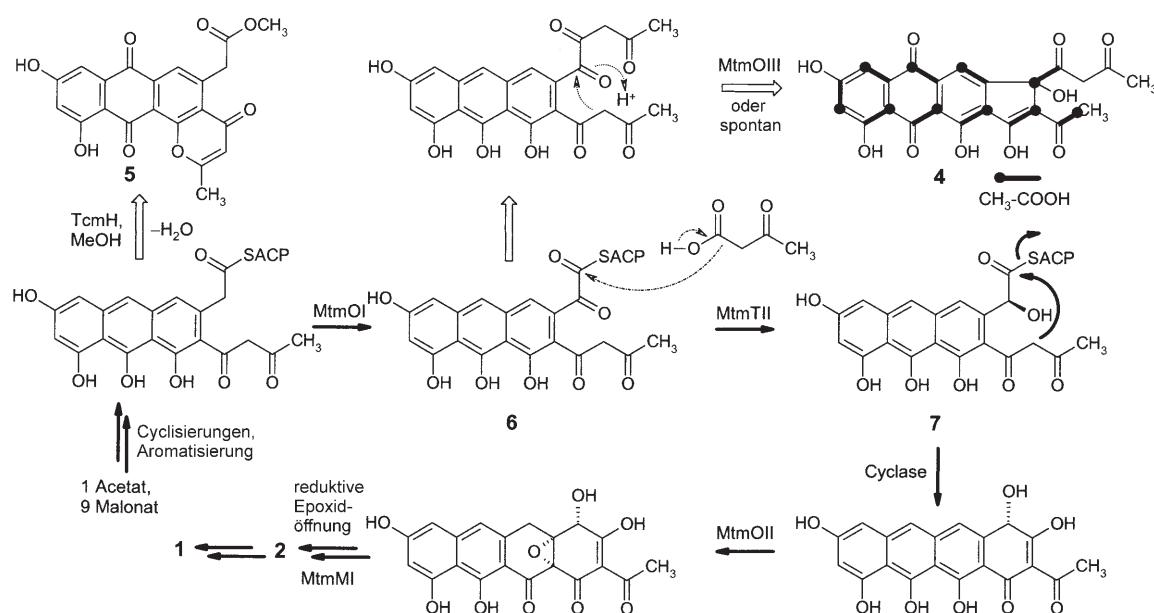


längenkontrolle der MTM-Biosynthese beiträgt, und zwar als essenzielle Komponente des PKS-Komplexes. In Abwesenheit von MtmOII scheint auch die korrekte Regiospezifität des Cyclisierungsschrittes bei der Bildung des vierten Ringes gestört zu sein, der normalerweise wahrscheinlich nach α -Oxidation (durch MtmOI?) und der darauf folgenden Reduktion durch die 2-Oxoacyl-ACP-Reduktase MtmTII entsteht. Eine ähnliche Rolle einer 2-Oxoacyl-ACP-Reduktase wurde von Piel et al. auch für GrhO2 vorgeschlagen, ein Enzym des Griseorhodin-A-Biosyntheseweges, das 50 % Aminosäureidentität und 61 % Sequenzähnlichkeit zu MtmTII aufweist.^[37] Das Fehlen von MtmOII könnte auch bewirkt haben, dass die ACP-gebundene Estercarbonyl-Gruppe mit 3-Oxobutyryat reagiert (in 6, Schema 3), das der „unteren“ Oxobutyryl-Seitenkette des normalen Biosynthesezwischenproduktes 7 ähnelt, d.h. dem normalen Reaktionspartner (Schema 3). Es ist auch möglich, dass die Ketoreduktase MtmTII durch einen polaren Effekt im Zuge der MtmOII-Inaktivierung mit inaktiviert wurde, da ihr codierendes Gen im Gencluster unmittelbar strangabwärts von *mtmOII* gelegen ist. Als Konsequenz kann die neu eingeführte α -Ketogruppe in eine Shunt-Aldol-Kondensation verwickelt werden, die schließlich zu dem fünfgliedrigen vierten Ring in 4 führt. Diese vermutlich spontane Cyclisierung erfolgt wahrscheinlich nach der Kettenverlängerung.

In der normalen MTM-Biosynthese ist es wahrscheinlich, dass MtmOII eine Epoxidierung entweder simultan mit oder kurz nach der korrekten vierten Cyclisierung zum tetracyclischen Premithramyicingerüst katalysiert, wodurch das Sauerstoffatom eingeführt wird, das in 2-Position von 1 (=12a-Position von 2) endet; denn dieses Sauerstoffatom fehlt in jedem Shuntpunkt, das durch Inaktivierung von MtmOII hervorgerufen wurde. Ein möglicher Mechanismus umfasst eine Epoxidierung mit anschließender reduktiver Öffnung

des Oxirans. Eine ähnliche Sequenz wurde im Zusammenhang mit der durch die Oxygenase TcmG hervorgerufenen Reaktionskaskade in der Tetracenomycin-C-Biosynthese diskutiert^[38] und kann auch für die Einführung der tertiären Alkoholgruppe während der Tetracyclin-Biosynthese postuliert werden, wobei letztere Reaktion durch die Oxygenase OxyL katalysiert würde,^[39] die 48 % Aminosäureidentität und 63 % Sequenzähnlichkeit zu MtmOII aufweist. Bezuglich der Rolle von MtmOII ist es auch möglich, dass dieses Protein als Komponente eines Multienzymkomplexes spontane Cyclisierungen verhindert oder eine spontane oder durch MtmOIII hervorgerufene Anthron-Oxidation zu den Anthrachinon-Shuntpunkten 4 und 5 blockiert; denn diese Reaktionen finden nur in Abwesenheit von MtmOII statt.

Wie erwähnt lassen das Oxidationsmuster von 4 zusammen mit den hier vorgeschlagenen Rollen für MtmOII im MTM-Biosyntheseweg auch erste Schlussfolgerungen bezüglich der Oxygenasen MtmOI und MtmOIII zu, deren Beteiligung an der MTM-Biosynthese bislang völlig unklar war. Wie in Schema 3 gezeigt, ist es notwendig, dass eines dieser beiden Enzyme – vermutlich MtmOI – das Kohlenstoffatom in α -Position zur Acyl-ACP-Estercarbonylgruppe oxidiert, woraus schließlich das O-Atom in 1'-Position von 1 resultiert (=4-Position in 2 oder 3, =1-Position in 4), während MtmOIII normalerweise nicht in die MTM-Biosynthese eingreift. MtmOIII könnte aber die Anthron-Oxidationen verursachen, die in den Shuntwegen zu 4 und 5 beobachtet wurden, denn die Aminosäuresequenz von MtmOIII zeigt hohe Ähnlichkeiten zu typischen Anthron-Oxygenasen wie AknX (40 % Aminosäureidentität, 55 % Sequenzähnlichkeit), das in der Aklavinon-Biosynthese eine Rolle spielt,^[40] oder zu HedQ (36 % Aminosäureidentität, 51 % Sequenzähnlichkeit), der Anthron-Oxygenase des Hedamycin-Biosyntheseweges.^[41]



Schema 3. Hypothetischer früher Biosyntheseweg (fette schwarze Pfeile) zu MTM (1) und Shuntpfade (offene oder unterbrochene Pfeile) zu 4 und 5 mit den vorgeschlagenen neuen Rollen der Oxygenasen MtmOI, MtmOII und MtmOIII sowie der Ketoreduktase MtmTII. In der Struktur 4 ist das Einbaumuster für die Kohlenstoffanreicherung nach Fütterung der MtmOII-Mutante *S. argillaceus* M7OII mit [1,2-¹³C]Acetat hervorgehoben.

Zusammenfassend führt die Inaktivierung des *mtmOII*-Gens zu dem unerwarteten Metaboliten Premithramycinon G (**4**), einem vermutlichen Shuntpunkt des Mithramycin-Biosynthesewegs. Die Struktur dieses vom Mutantenstamm akkumulierten Produkts **4** lässt den Schluss zu, dass es aus zehn Acetateinheiten mit drei zusätzlichen C-Atomen aufgebaut ist, die entweder als zwei Malonyl-CoA-Extender-einheiten zu einem späteren Zeitpunkt der Biosynthese eingeführt werden (zu dem die Fütterung mit ^{13}C -angereichertem Acetat nichts mehr beiträgt) oder von einer anderen Biosynthesequelle stammen, z.B. aus 3-Oxobutyrat aus unvollständigem Fettsäureabbau. Die Shunt-Reaktionen, die zur Bildung von **4** beitragen, sind nur möglich, weil in Abwesenheit einer funktionellen Oxygenase MtmOII die Kontrolle sowohl der Polyketidkettenlänge als auch der Regiochemie der vierten Cyclisierung verlorengeht; hinzu kommt eine mögliche Störung der 2-Oxoacyl-ACP-Reduktase MtmTII. Für die Biosynthese von MTM kann gefolgert werden, dass das Sauerstoffatom in 1'-Position von **1** (=4-Position von **2** und **3**) höchstwahrscheinlich durch die Oxygenase MtmOI eingeführt wird, während MtmOII, wenn es in einem Multienzymkomplex vorliegt, zu verschiedenen Prozessen beiträgt, einschließlich: 1) der Kontrolle der Polyketidkettenlänge, 2) des Schutzes von tricyclischen aromatischen Intermediaten wie **6** (Schema 3) vor unerwünschten Anthron-Oxidationen und 3) der Kontrolle der regiochemisch korrekten vierten Cyclisierung. Die Hauptfunktion von MtmOII ist jedoch die Einführung des Sauerstoffs, der letztlich in die 2-Position von MTM (=12a-Position von **2** und **3**) gelangt.

Experimentelles

Zur Inaktivierung von *mtmOII* wurde eine Frameshift-Mutation vorgenommen;^[13] Instrumente und NMR-Methoden, siehe Lit. [42]. Das isotopenmarkierte [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Natriumacetat für das Einbauexperiment stammt von Isotec (Miamisburg USA).

Produktion und Isolierung von **4**: Für eine Vorkultur wurde Tryptic Soja Medium mit Sporen von *S. argillaceus* M7OII angeimpft und in einem Orbitalschüttler inkubiert (24 h, 30°C, 250 U min $^{-1}$). Mit dieser Vorkultur wurden 50 Erlenmeyer-Kolben angeimpft, die je 100 mL R5A-Medium enthielten, und 6 Tage kultiviert. Die Kulturbüre wurde zentrifugiert (4200 U min $^{-1}$, 30 min), mit Essigsäure auf pH 5.0 eingestellt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Das Mycel wurde mit Aceton extrahiert (4 × 0.5 L) und unter Vakuum eingeengt; die resultierende wässrige Lösung wurde mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte von Mycel und Kulturfiltrat wurden durch HPLC-MS untersucht und unter verminderter Druck eingeengt. Der erhaltene Rohextrakt wurde an Sephadex LH-20 (MeOH) in drei Fraktionen getrennt. Alle Versuche, **4** durch Kieselgelchromatographie zu reinigen, schlugen fehl wegen Zersetzung. Aus der mittleren Fraktion der Sephadex-Chromatographie wurde **4** durch präparative HPLC isoliert (Säule: μBondapak C₁₈ radial compression cartridge, PrepPak Cartridge, 19 × 150 mm, Waters; Eluentien: Acetonitril (ACN) und Wasser (Gradient von 35 zu 100% in 43 min); Fluss 10 mL min $^{-1}$).

Fütterungsexperiment: Eine TSB-Vorkultur wurde mit Sporen von *S. argillaceus* M7OII angeimpft, 24 h bei 30°C und 250 U min $^{-1}$ geschüttelt und zum Animpfen (2.5% v/v) von 16 250-mL-Erlenmeyer-Kolben (je 100 mL modifiziertes R5-Medium) verwendet. Nach 24 h wurde mit der Pulsfütterung von [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat begonnen, die 48 h fortgesetzt wurde (insgesamt vier Fütterungen, alle 12 h,

von zusammen 1 g Natriumacetat pro Liter Kultur). Nach Beendigung der Fütterungen wurde die Kultur weitere 72 h geschüttelt, bevor mit der Extraktion begonnen wurde. Das ^{13}C -angereicherte **4** wurde unter analogen Bedingungen wie für die nichtmarkierte Verbindung isoliert.

Eingegangen am 7. Februar 2006
Online veröffentlicht am 20. Juli 2006

Stichwörter: Aureolsäuren · Enzymkomplexe · Mithramycin · Oxidoreduktasen · Polyketide

- [1] R. C. Snyder, R. Ray, S. Blume, D. M. Miller, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4290–4291.
- [2] A. S. Jaiswal, R. Balusu, S. Narayan, *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 252–261.
- [3] L. L. Remsing, H. R. Bahadori, G. M. Carbone, E. M. McGuffie, C. V. Catapano, J. Rohr, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8313–8324.
- [4] P. D. King, M. C. Perry, *Oncologist* **2001**, *6*, 162–176.
- [5] J. P. Dutcher, D. Coletti, E. Paietta, P. H. Wiernik, *Leuk. Res.* **1997**, *21*, 375–380.
- [6] N. Zojer, A. V. Keck, M. Pecherstorfer, *Drug Saf.* **1999**, *21*, 389–406.
- [7] J. Hurtado, P. Esbrit, *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 521–527.
- [8] A. G. Hadjipavlou, L. N. Gaitanis, P. G. Katonis, P. Lander, *Eur. Spine J.* **2001**, *10*, 370–384.
- [9] S. Chatterjee, K. Zaman, H. Ryu, A. Conforto, R. R. Ratan, *Ann. Neurol.* **2001**, *49*, 345.
- [10] R. J. Ferrante, H. Ryu, J. K. Kubilus, S. D'Mello, K. L. Sugars, J. Lee, P. Lu, K. Smith, S. Browne, M. F. Beal, B. S. Kristal, I. G. Stavrovskaya, S. Hewett, D. C. Rubinsztein, B. Langley, R. R. Ratan, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10335–10342.
- [11] A. Liacini, J. Sylvester, W. Li, M. Zafarullah, *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, R777–R783.
- [12] E. Fibach, N. Bianchi, M. Borgatti, E. Prus, R. Gambari, *Blood* **2003**, *102*, 1276–1281.
- [13] L. Prado, F. Lombó, A. F. Brana, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *261*, 216–225.
- [14] J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 41–54.
- [15] M. J. Fernandez-Lozano, L. L. Remsing, L. M. Quiros, A. F. Braña, E. Fernandez, C. Sanchez, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3065–3074.
- [16] J. Rohr, U. Weissbach, C. Beninga, E. Künzel, K. Siems, K. Bindseil, L. Prado, F. Lombó, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, *Chem. Commun.* **1998**, 437–438.
- [17] M. Nur-e-Alam, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *Chembiochem* **2005**, *6*, 632–636.
- [18] E. Fernandez, U. Weissbach, C. Sanchez Reillo, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4929–4937.
- [19] L. L. Remsing, J. Garcia-Bernardo, A. M. Gonzalez, E. Künzel, U. Rix, A. F. Braña, D. W. Bearden, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1606–1614.
- [20] L. L. Remsing, A. M. Gonzalez, M. Nur-e-Alam, M. J. Fernandez-Lozano, A. F. Braña, U. Rix, M. A. Oliveira, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5745–5753.
- [21] V. Albertini, A. Jain, S. Vignati, S. Napoli, A. Rinaldi, I. Kwee, M. Nur-e-Alam, J. Bergant, F. Bertoni, G. M. Carbone, J. Rohr, C. V. Catapano, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1721–1734.
- [22] L. Prado, E. Fernandez, U. Weissbach, G. Blanco, L. M. Quirós, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 19–30.
- [23] M. Gibson, M. Nur-e-alam, F. Lipata, M. A. Oliveira, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17594–17595.
- [24] U. Rix, C. Fischer, L. L. Remsing, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 542–580.

- [25] F. Lombó, E. Künzel, L. Prado, A. F. Braña, K. U. Bindseil, J. Frevert, D. Bearden, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 808–811; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 796–799.
- [26] V. V. Krishnamurthy, D. J. Russell, C. E. Hadden, G. E. Martin, *J. Magn. Reson.* **2000**, *146*, 232–239.
- [27] W. F. Reynolds, R. G. Enriquez, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 221–244.
- [28] S. Gomi, M. Sezaki, M. Hamada, S. Kondo, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1145–1150.
- [29] S. Kakinuma, K. Suzuki, M. Hatori, K. Saitoh, T. Hasegawa, T. Furumai, T. Oki, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 430–440.
- [30] T. Tsuno, H. Yamamoto, Y. Narita, K. Suzuki, T. Hasegawa, S. Kakinuma, K. Saitoh, T. Furumai, T. Oki, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 420–429.
- [31] T. Furumai, S. Kakinuma, H. Yamamoto, N. Komiyama, K. Suzuki, K. Saitoh, T. Oki, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 412–419.
- [32] T. S. Lee, C. Khosla, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12254–12262.
- [33] F. Hiramoto, N. Nomura, T. Furumai, Y. Igarashi, T. Oki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 238–241.
- [34] T. Oki, Y. Yamazaki, T. Furumai, Y. Igarashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1408–1410.
- [35] C. Hertweck, L. Xiang, J. A. Kalaitzis, Q. Cheng, M. Palzer, B. S. Moore, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 461–468.
- [36] N. Perić-Concha, B. Borovicka, P. F. Long, D. Hranueli, P. G. Waterman, I. S. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37455–37460.
- [37] A. Li, J. Piel, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1017–1026.
- [38] E. R. Rafanan, Jr., C. R. Hutchinson, B. Shen, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3225–3227.
- [39] I. S. Hunter, R. A. Hill in *Biotechnology of Antibiotics* (Hrsg.: W. R. Strohl), Marcel Decker, New York, **1997**, S. 659.
- [40] J. Y. Chung, I. Fujii, S. Harada, U. Sankawa, Y. Ebizuka, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6115–6122.
- [41] T. Bililign, C.-G. Hyun, J. S. Williams, A. M. Czisny, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 959–969.
- [42] L. Zhu, B. Ostash, U. Rix, E. A. M. Nur, A. Mayers, A. Luhetsky, C. Mendez, J. A. Salas, A. Bechthold, V. Fedorenko, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 631–638.