

## Glycosyltransferasen

### Die Glycosyltransferase UrdGT2 katalysiert sowohl C- als auch O-glycosidischen Zuckertransfer\*\*

Clemens Dürr, Dirk Hoffmeister, Sven-Eric Wohlert, Koji Ichinose, Monika Weber, Ursula von Mulert, Jon S. Thorson und Andreas Bechthold\*

Heinz G. Floss zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Bioaktivität vieler Naturstoffe, darunter wertvolle Antibiotika und Cytostatika, hängt von regio- und stereospezifisch verknüpften Zuckermolekülen ab.<sup>[1]</sup> Trotz wesentlicher Fortschritte in den letzten Jahren ist es immer noch äußerst schwierig, durch chemische Synthese die Zuckersubstitutionen von Naturstoffen zu verändern. Daher ist der Einsatz von Glycosyltransferasen (GTs) von besonderem Interesse, um auf chemoenzymatischem Weg oder durch In-vivo-Ansätze komplexe naturstoffbasierte Wirkstoffe, z.B. Glycopeptid- und Macrolidantibiotika,<sup>[2]</sup> zu erzeugen.

Naturstoff-GTs übertragen den Zucker von einem Donorsubstrat, in den meisten Fällen ein nucleotidaktivierter Zucker, auf das Sauerstoffnucleophil eines Acceptorsubstrats, typischerweise eine Hydroxygruppe eines Aglycons oder eines weiteren Zuckers. Einige wenige GTs können jedoch C-C-Verknüpfungen oder in seltenen Fällen C-N-Verknüpfungen aufbauen. Die Produkte solcher C-GTs sind von besonderem pharmazeutischem Interesse, da sie isostereische Analoga zu O-Glycosiden sind, die jedoch nicht durch Glycosidasen abgebaut werden.<sup>[3]</sup> Zwar gewährt die steigende Zahl an Kristallstrukturen von O-GTs<sup>[4]</sup> zunehmend Einblick

[\*] C. Dürr, Dr. D. Hoffmeister,\* M. Weber, Dr. U. von Mulert, Prof. Dr. A. Bechthold

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Stefan-Meier-Straße 19, 79104 Freiburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 761-203-8383  
E-mail: andreas.bechthold@pharmazie.uni-freiburg.de

Prof. Dr. J. S. Thorson  
School of Pharmacy  
University of Wisconsin  
777 Highland Avenue, Madison, WI 53705 (USA)

Dr. S.-E. Wohlert  
Combinature Biopharm AG  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

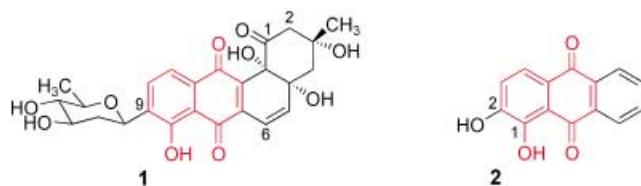
Prof. Dr. K. Ichinose  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences  
The University of Tokyo  
Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo (Japan)

[†] Derzeitige Adresse:  
School of Pharmacy  
University of Wisconsin  
777 Highland Avenue, Madison, WI 53705 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (Projektförderung für A.B., Förderkennzeichen 5-1). Wir danken Volker Brecht, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, für die Durchführung der NMR-Experimente.

in den Mechanismus des O-Glycosyltransfers, der Mechanismus des C-Glycosyltransfers ist hingegen bislang unklar. Als ersten Schritt zur Aufklärung dieses Mechanismus berichten wir hier, dass die aus der Urdamycinbiosynthese stammende C-GT UrdGT2 ungewöhnlicherweise sowohl C- als auch O-glycosidische Bindungen bilden kann. Weiter wird diskutiert, welche Folgerungen diese Untersuchung hinsichtlich des Mechanismus des enzymatischen C-Glycosyltransfers zulässt und welche Anwendungen im Bereich der Wirkstoffentwicklung aus dieser Erkenntnis heraus möglich werden.

UrdGT2 ist eine gut untersuchte C-Glycosyltransferase aus dem Bodenbakterium *Streptomyces fradiae* Tü2717. Das Enzym katalysiert den ersten Zuckertransfer in der Biosynthese des cytostatischen Urdamycins, die Übertragung einer 2,6-Didesoxy-D-glucose (D-Olivose) auf das C9 eines Polyketids mit einem Benz[a]anthrachinon-Grundgerüst. Das Produkt dieser Reaktion ist das  $\beta$ -C-Glycosid Aquayamycin (Schema 1, **1**).<sup>[5,6]</sup> UrdGT2 hat eine bemerkenswerte Flexibi-



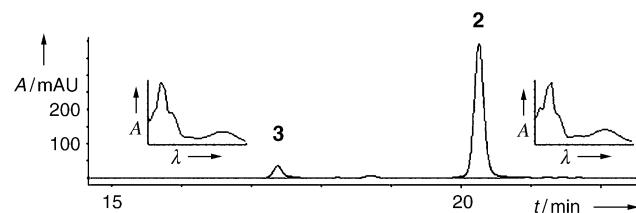
**Schema 1.** Aquayamycin (**1**), das natürliche Produkt von UrdGT2, und das Substratmimetikum 1,2-Dihydroxyanthrachinon (**2**). Das juglonartige Acceptormotiv ist rot markiert.

lität gegenüber dem Donor- und Acceptorsubstrat,<sup>[7]</sup> die Regioselektivität (der Zucker wird *ortho* zur phenolischen OH-Gruppe angefügt) und die Stereoselektivität (Inversion der anomeren Konfiguration) bleiben hingegen stets gleich. Für die Regioselektivität des C-Glycosyltransfers auf aromatische Polyketide scheint ein elektronenliefernder Substituent essenziell zu sein, da arylscher C-Glycosyltransfer ausschließlich *ortho* und/oder *para* zu diesem erfolgt.<sup>[8]</sup> Die Primärsequenz von UrdGT2 ist der von LanGT2, einer O-GT aus der Landomycinbiosynthese, auffallend ähnlich (50% identische Aminosäuren).<sup>[9]</sup> Diese bemerkenswert konserveierte Sequenz veranlasste uns, das O-GT-Potenzial von UrdGT2 zu untersuchen.

Als Substratanalogon diente 1,2-Dihydroxyanthrachinon (Schema 1, **2**), das das minimale Strukturmotiv enthält, um von UrdGT2 als Acceptorsubstrat erkannt zu werden.<sup>[5]</sup> Für die Fütterungsexperimente wurde der Stamm *S. fradiae* XKS<sup>[10]</sup> verwendet, eine Mutante, die speziell für Biokonversionsexperimente generiert wurde.<sup>[\*]</sup> Zur Kontrolle wurde

die Fütterung in der *urdGT2*-Deletionsmutante *S. fradiae* BF-1-1<sup>[5]</sup> durchgeführt.

Nach der Fütterung von *S. fradiae*-XKS-Kulturen mit **2** wurde in der HPLC-UV/Vis-Analyse des Rohextraktes eine neue Substanz mit dem charakteristischen UV/Vis-Spektrum des 1,2-dihydroxyanthrachinoiden Chromophors gefunden. Die Retentionszeit betrug 17.38 min im Vergleich zu 20.38 min für **2** (Abbildung 1). Durch ESI-MS-Analyse konnte das Molekülion mit  $m/z$  369 [ $M-H^+$ ] bestimmt werden, in Einklang mit der Übertragung einer Didesoxyhexose auf **2**. Demgegenüber wurde **2** vom Kontrollstamm *S. fradiae* BF-1-1 nicht umgesetzt, was belegt, dass es nur in Anwesenheit von UrdGT2 glycosyliert wird.

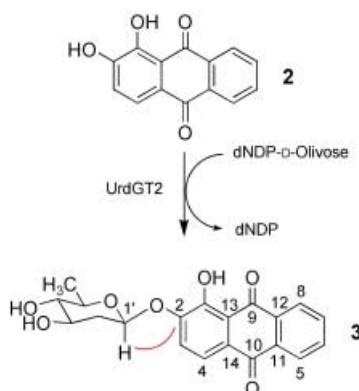


**Abbildung 1.** Fütterung von 1,2-Dihydroxyanthrachinon (**2**) zu Kulturen von *S. fradiae* XKS resultiert in einem neuen Signal mit konserviertem UV/Vis-Spektrum (**3**).

Um die Struktur der neuen Substanz aufzuklären, wurden aus einer 5.2-L-Fermentation 8.5 mg des Derivats aufgereinigt. Die Summenformel wurde massenspektrometrisch zu  $C_{20}H_{18}O_7$  bestimmt. Die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Daten bestätigten, dass die Aglykonstruktur in der neuen Substanz **2** entsprach.<sup>[11]</sup> Aus den NMR-Daten ging weiterhin hervor, dass die Zuckereinheit Olivose war. Die absolute Konfiguration des Zuckers wurde nicht bestimmt. Da jedoch die transaxiale 9.5-Hz-Kopplung zwischen dem anomeren Proton und  $2'-H_a$  eine  $\beta$ -glycosidische Verknüpfung des Zuckers belegt, ist es wegen des invertierenden Mechanismus beim Glycosyltransfer (dieser erlaubt die Zuordnung einer  $\alpha$ -Konfiguration zu L-Zuckern und einer  $\beta$ -Konfiguration zu D-Zuckern)<sup>[12]</sup> äußerst wahrscheinlich, dass eine D-Olivose vorlag.<sup>[13]</sup> Außerdem wurde in dem gut untersuchten *S. fradiae*-Stamm Tü2717 nie L-Olivose nachgewiesen. Schließlich konnte die C2-Verknüpfung des Zuckers an das Aglycon mittels HMBC-Analyse (HMBC = heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy) nachgewiesen werden (Schema 2). Bei dem neuen Produkt handelt es sich daher höchstwahrscheinlich um ein 2-O- $\beta$ -D-Olivosyl-1,2-dihydroxyanthrachinon (**3**).

Als einleitender Schritt des O-glycosidischen Zuckertransfers wird angenommen, dass eine katalytische Base das Proton der Acceptorhydroxygruppe abstrahiert. Dem folgt der nucleophile Angriff des Sauerstoffatoms auf das anomere Kohlenstoffatom des aktivierte dNDP-Zuckers.<sup>[14]</sup> Demgegenüber können für die C-Glycosylierung aromatischer Polyketide wenigstens zwei Mechanismen vorgeschlagen werden: Mechanismus I erfordert die O-Glycosylierung der phenolischen Hydroxygruppe, gefolgt von einer O-C-Umlagerung. Dieser Mechanismus wird in zweierlei Hinsicht indirekt gestützt: Zum einen haben O- und C-GTs, wie im Fall von UrdGT2 und LanGT2, oftmals signifikante Sequenzhomolo-

[\*] Dieser Stamm unterscheidet sich vom Wildtyp *S. fradiae* Tü2717 hinsichtlich einer chromosomal 0.9-kb-Deletion innerhalb des Genlocus für die Urdamycin-Polyketidsynthase (*urdA-C*). Die Gene für Synthese und Glycosyltransfer der nativen Urdamycin-NDP-Zucker bleiben von dieser Mutation unberührt. Das Ausschalten der endogener Polyketidproduktion eliminiert jegliche Substratkonzernenz durch das native Urdamycin-Aglycon. Die Analyse und Isolation neuer Derivate wird durch den fehlenden Hintergrund stark vereinfacht.



**Schema 2.** Umsatz von 1,2-Dihydroxyanthrachinon (**2**) zu 2-O- $\beta$ -D-Olivose-1,2-dihydroxyanthrachinon (**3**). Die HMBC-Kopplung zwischen der D-Olivose und dem Aglycon ist rot markiert.

gien. Zum anderen zeigen chemische Modelle, dass sich arylische O-Glycoside mit Lewis-Säuren leicht in die entsprechenden *ortho*-C-Glycoside umlagern. Hierbei werden vorwiegend  $\alpha$ -Glycoside gebildet.<sup>[15]</sup> Allerdings konnten in diesen Modellstudien keine *para*-substituierten Derivate gefunden werden.

Mechanismus II ist im regiochemischen Sinn analog zu einer direkten Friedel-Crafts-Substitution am Aromaten. Dies wird durch Modellstudien gestützt, in denen  $[\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2]/\text{AgClO}_4$  ( $\text{Cp} = \text{C}_5\text{H}_5$ ) die Kupplung von Methoxy-naphthalinderivaten mit Glycosylfluoriden begünstigt. Hierbei kommt es zur Bildung von *ortho*- und *para*-substituierten C-Glycosiden, wobei  $\beta$ -Glycoside dominieren.<sup>[16]</sup> Ein für natürlich vorkommende arylische C-Glycoside typisches 1-hydroxyanthrachinoides System ist für diesen Mechanismus geeignet, da der elektronenliefernde Effekt der 1-OH-Gruppe, und damit die Nucleophilie der *ortho*- und *para*-Position, durch Wasserstoffbrücken mit der benachbarten Carbonylfunktion verstärkt wird.

Die UrdGT2-abhängige Biotransformation von **2** zu **3** identifiziert die erste Naturstoff-GT, die C-glycosidische und O-glycosidische Bindungen knüpft. Auch stützt die UrdGT2-katalysierte Produktion von **3** indirekt Mechanismus II, denn eine 1,4-O-O-Umlagerung, die im Rahmen von Mechanismus I für die Ausbildung von **3** erforderlich wäre, ist ungünstig, sodass die Reaktion auf der Stufe einer O-Glycosylierung an C-1 stehengeblieben wäre. Für Mechanismus II ist eine passende Positionierung des aktivierte Zuckers (dTDP-Olivose) für den direkten Angriff (Schema 3a) erforderlich. Dieser Angriff könnte durch eine katalytische Base im

Enzym begünstigt werden. Die Nähe einer solchen Base könnte auch zur analogen O-Glycosylierung von **2** führen (Schema 3b).

Die sowohl als C- wie auch als O-Glycosyltransferase einsetzbare UrdGT2 hat großes Potenzial für die pharmazeutische Chemie. Eine mögliche Anwendung wäre, das Anthracenon Anthralin und sein 1,2-Dihydroxyderivat in das entsprechende 2-C- bzw. 2-O-Glycosid zu überführen und damit die inflammatorischen Nebenwirkungen dieser potenzen Antipsoriatika zu mildern.<sup>[17]</sup>

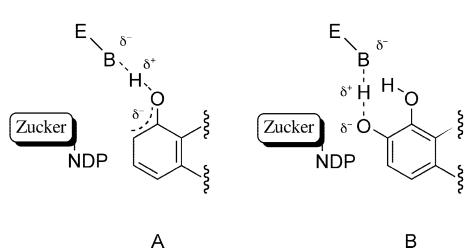
In Verbindung mit effektiven enzymatischen Methoden zur Synthese von dNDP-Zuckern<sup>[18]</sup> sollte die Flexibilität von UrdGT2 die weitere Entwicklung glycosylierter Wirkstoffe begünstigen.<sup>[19]</sup> In weiteren Arbeiten zu diesem Enzym werden die Strukturaufklärung und der gezielte Austausch von Aminosäuren beschrieben, um zu erforschen, inwieweit O- und C-GTs gegenseitig konvertierbar sind.

## Experimentelles

Für die Fütterungsexperimente wurden die Stämme *Streptomyces fradiae* XKS und BF-1-1 in NL111-V-Flüssigmedium kultiviert (2% Lab-Lemco-Fleischextrakt, 1%  $\text{CaCO}_3$ , 10% Malzextrakt, pH 7.2). Die Kulturen (je 20 mL) wurden in Erlenmeyer-Kolben mit einer Schikane bei 27°C und 180  $\text{U min}^{-1}$  auf einem Schüttelinkubator angezogen. Die Hauptkulturen (20 mL) wurden mit je 1 mL einer 24 h alten Vorkultur inkuliert. Nach 24 h wurden 40  $\mu\text{L}$  einer Lösung von **2** (25  $\text{mg mL}^{-1}$  DMSO) zugegeben. Nach 24, 48 und 96 h wurden Proben entnommen und mit LC/MS analysiert. Für den Umsatz im Großmaßstab wurden 260 mg Substanz in vier Portionen nach 24, 36, 48 und 60 h zu einer 5.2 L NL111V-Hauptkultur gegeben. Die Kultur wurde nach 84 h geerntet.

Isolation von **3**: Die Rohextrakte wurden durch Extraktion von 1 mL Kultur mit 1 mL Ethylacetat erhalten. Die organische Phase wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit LC/MS analysiert. Die 5.2-L-Fermentation wurde filtriert, um das Myzel zu entfernen. Das Filtrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde verdampft und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Der Rohextrakt wurde auf eine Varian-RP-18-Säule gegeben und mit einem Wasser/Methanol-Gradienten fraktioniert. Fraktionen, die das neue Derivat enthielten, wurden vereint und zur weiteren Aufreinigung auf eine Sephadex-LH-20-Säule (75  $\times$  1.5 cm, LM: Methanol). Die HPLC-Analytik erfolgte auf einer Waters-Anlage mit einer Waters-Xterra-C-18-Säule (3.5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 4.6  $\times$  100 mm). Der Wellenlängenbereich des UV/Vis-Detektors betrug 190–500 nm. Stufengradient: 3 min auf 30% B (0.5% Essigsäure in Acetonitril) und 70% A (0.5% Essigsäure in Wasser), innerhalb von 13 min 30–50% B, innerhalb von 3 min 50–95% B und 2 min 95% B. Die Flussrate betrug 0.7  $\text{mL min}^{-1}$ . Die LC/MS-Analyse wurde mittels Electrosprayionisation (ESI) auf einem Agilent-1100-System durchgeführt. Die Ionen wurden im Positiv- und im Negativmodus detektiert. Das LC-System war mit einer Hewlett-Packard-ZORBAX-SB-C-18-Säule (5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 4.6  $\times$  150 mm) ausgestattet und auf 24°C temperiert. Die übrigen Bedingungen entsprachen denen in der analytischen HPLC.

Strukturaufklärung von **3**: ESI- und HR-ESI-Massenspektrometrie wurden mit einem Micromass-QTOF2-Massenspektrometer durchgeführt. Die Struktur wurde über 1D-Spektroskopie und 2D-homo- und heteronukleare Korrelationsexperimente ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , H-H-COSY, HSQC, HMBC) aufgeklärt.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden bei 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bei 75 MHz mit einem Varian-Unity-300-Spektrometer aufgenommen. Die Proben waren in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  gelöst. Die chemischen Verschiebungen bei 2.94 ( $^1\text{H}$ ) und 39.5 ppm



**Schema 3.** Mögliche Mechanismen A) der C-Glycosylierung und B) der O-Glycosylierung durch UrdGT2.

(<sup>13</sup>C) wurden auf TMS bezogen. <sup>1</sup>H-NMR (299.948 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 27°C, TMS): δ = 8.23 (1H, m, H-8), 8.16 (1H, m, H-5), 7.92 (1H, m, H-6), 7.91 (1H, m, H-7), 7.69 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-4), 7.50 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 5.45 (1H, dd, J = 9.5, 1.7 Hz, H-1'), 3.51 (1H, J = 10.0, 9.0, 4.9 Hz, H-3'), 3.42 (1H, dq, J = 9.0, 6.3 Hz, H-5'), 2.85 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H-4'), 2.26 (1H, ddd, J = 11.9, 4.9, 1.7 Hz, H-2'e), 1.60 (1H, ddd, J = 11.9, 10.0, 9.5 Hz, H-2'a), 1.20 ppm (3H, d, J = 6.3 Hz, H-6'); <sup>13</sup>C-NMR (75.422 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 27°C, TMS): δ = 188.3 (C-9), 180.9 (C-10), 152.2 (C-1), 150.7 (C-2), 135.1 (C-6), 134.2 (C-7), 133.3 (C-11 oder C-12), 133.0 (C-11 oder C-12), 126.7 (C-5), 126.5 (C-8), 126.0 (C-14), 120.6 (C-3), 119.8 (C-4), 116.3 (C-13), 96.2 (C-1'), 76.5 (C-4'), 72.1 (C-5'), 69.8 (C-3'), 39 (C-2', wegen Überlappung mit dem Lösungsmittel nur indirekt zu beobachten), 27.6 ppm (C-6').

Eingegangen am 15. Januar 2004 [Z53758]

**Stichwörter:** Glycosylierungen · Glycosyltransferasen · Naturstoffe · Streptomyceten · Wirkstoff-Design

- [1] a) A. C. Weymouth-Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 99–110; b) J. S. Thorson, T. J. Hosted, J. Jiang, J. B. Biggins, J. Ahlert, *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 139–167; c) V. Kren, L. Martinkova, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1303–1328; d) R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt, N. Zitzmann, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 65–75; e) J. S. Thorson, T. Vogt in *Carbohydrate-based Drug Discovery*, Vol. 2 (Hrsg.: C. H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 685–712.
- [2] a) X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1467–1469; b) H. C. Losey, J. Jiang, J. B. Biggins, M. Oberthur, X. Y. Ye, S. D. Dong, D. Kahne, J. S. Thorson, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1305–1314; c) L. Tang, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 547–555.
- [3] M. H. Postema, J. L. Piper, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 183–194, zit. Lit.
- [4] a) A. M. Mulichak, H. C. Losey, W. Lu, Z. Wawrzak, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9238–9243; b) A. M. Mulichak, H. C. Losey, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Structure* **2001**, *9*, 547–557.
- [5] E. Künzel, B. Faust, C. Oelkers, U. Weissbach, D. W. Bearden, G. Weitnauer, G. Westrich, A. Bechthold, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11058–11062.
- [6] B. Faust, D. Hoffmeister, G. Weitnauer, L. Westrich, S. Haag, P. Schneider, H. Decker, E. Künzel, J. Rohr, A. Bechthold, *Microbiology* **2000**, *146*, 147–154.
- [7] a) A. Trefzer, G. Blanco, L. Remsing, E. Künzel, U. Rix, F. Lipata, A. F. Brana, C. Mendez, J. Rohr, A. Bechthold, J. A. Salas, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6056–6062; b) D. Hoffmeister, G. Dräger, K. Ichinose, J. Rohr, A. Bechthold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4678–4679.
- [8] a) J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103–137; b) K. Krohn, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 127–195.
- [9] A. Trefzer, C. Fischer, S. Stockert, L. Westrich, E. Künzel, U. Girreser, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1239–1252.
- [10] U. von Mulert, A. Luzhetskyy, C. Hofmann, A. Mayer, A. Bechthold, *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *230*, 91–97.
- [11] K. Danielsen, *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 823–826.
- [12] U. Rix, C. Fischer, L. L. Remsing, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 542–580.
- [13] S. E. Wohlert, E. Künzel, R. Machinek, C. Mendez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 119–121.
- [14] U. M. Ünlügil, J. M. Rini, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 510–517.
- [15] a) T. Matsumoto, Y. Ohashi, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6935–6938; b) E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1547–1550.
- [16] a) T. Matsumoto, M. Katsuki, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 833–836; b) M. Hayashi, S. Nakayama, H. Kawabata, *Chem. Commun.* **2000**, 1329–1330.
- [17] K. Müller, *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 901–918.
- [18] a) W. A. Barton, J. Lesniak, J. B. Biggins, P. D. Jeffrey, J. Jiang, K. R. Rajashankar, J. S. Thorson, D. B. Nikolov, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 545–551; b) W. A. Barton, J. B. Biggins, J. Jiang, J. S. Thorson, D. B. Nikolov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13397–13402; c) J. S. Thorson, W. A. Barton, D. Hoffmeister, C. Albermann, D. B. Nikolov, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 16–25.
- [19] a) H. G. Floss, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 183–194; b) C. T. Walsh, C. L. Freel Meyers, H. C. Losey, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3425–3436.