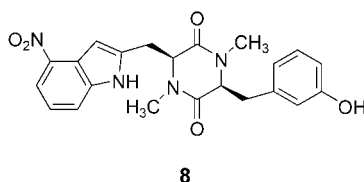
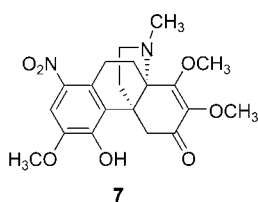
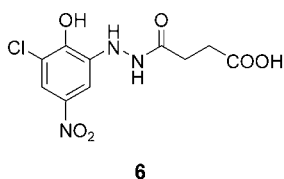
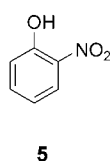
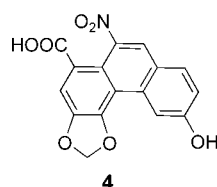
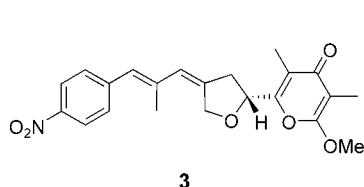
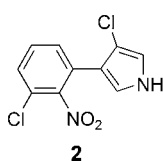
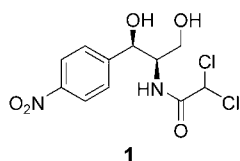


Sequenzielle enzymatische Oxidation von Aminoarenen zu Nitroarenen über Hydroxylamine**

Robert Winkler und Christian Hertweck*

Nitroaryleinheiten sind zwar relativ seltene Strukturelemente in Naturstoffen, finden sich aber in unterschiedlichsten Naturstofftypen mit zumeist wichtigen biologischen Eigenschaften. Bekannte Vertreter bakterieller Nitroaryl-Metabolite sind das Antibiotikum Chloramphenicol (**1**),^[1] das anti-



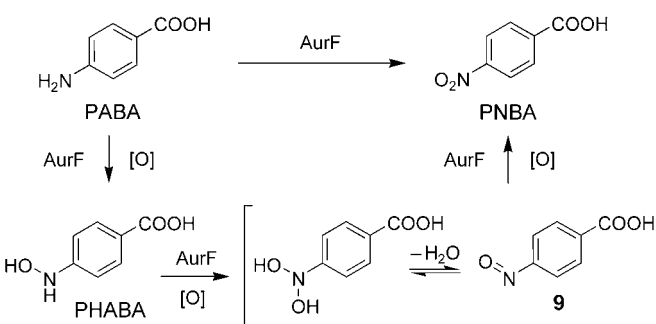
fungale Pyrrolnitrin (**2**)^[2] und das cytostatische, von *p*-Nitrobenzoat (PNBA) abgeleitete Polyketid Aureothin (**3**).^[3,4] Das Nitrophenanthrenderivat Aristolochiasäure C (**4**) ist der Auslöser der „Chinesischen Kräuter-Nephropathie“,^[5] und 2-

Nitrophenol (**5**) ist eine gut untersuchte Komponente des Aggregationspheromons von Zecken. Eine Nitroarylverbindung aus Pilzen ist Stephanosporin (**6**), die Vorstufe von 2-Chlor-4-nitrophenol.^[6] Wichtige Beispiele für natürliche nichtaromatische Nitroverbindungen sind Nitropropionsäure^[7] und das bakterielle Signalmolekül Hormaomycin.^[8,9]

Überraschenderweise wird die Biogenese von Nitroaryleinheiten bislang nur wenig verstanden. Ein möglicher Reaktionsweg verläuft über eine aromatische Substitution durch die Nitrogruppe, wie bei dem ungewöhnlichen Nitroalkaloid 1-Nitroaknadinin (**7**) von *Stephania sutchuenensis*, das zusammen mit dem nichtnitrierten Alkaloid vorkommt. Die vorgeschlagene biosynthetische Nitrierung wurde in vitro mit HNO₃ nachgeahmt.^[10] Vor kurzem wurde berichtet, dass eine NO-Synthase (NOS) an der Nitrierung zum Diketopiperazin Thaxtomin (**8**), einem vom Pflanzenpathogen *Streptomyces turgidiscabies* gebildeten Phytotoxin, beteiligt ist.^[11] Weitere Studien ergaben, dass die Tryptophaneinheit regioselektiv von einem Komplex aus *Deinococcus-radiodurans*-NOS und Try-tRNA-Synthetase nitriert wird.^[12]

Die Biosynthese der meisten aromatischen Nitroverbindungen scheint allerdings über einen anderen Weg – die Oxidation primärer Amine – zu verlaufen.^[1,13–15] So ergaben ¹⁸O-Markierungsexperimente und ¹⁵N-NMR-spektroskopische Studien von Baxter und Mitarbeitern, dass beide Sauerstoffatome des Pilzmetaboliten Nitropropionat von molekularem Sauerstoff stammen.^[7,16]

Denkbar wäre eine dreistufige *N*-Oxygenierungsreaktion über Hydroxylamin- und Nitroso-Intermediate (Schema 1) oder alternativ eine simultane Einführung beider Sauerstoff-



Scheme 1. Vorgeschlagener Biosyntheseweg von PABA zu PNBA über *p*-Hydroxylaminobenzoat (PHABA).

atome über eine Dioxygenase – bislang gibt es allerdings weder für die eine noch für die andere Hypothese einen Beleg. Die einzigen vorliegenden Studien über enzymatische Nitrogruppenbildung wurden mit Haloperoxidasen durchgeführt. Diese Enzyme sind keine authentischen *N*-Oxygenasen und oxidieren Aminogruppen ausschließlich unter sehr spezifischen, nichtnatürlichen Bedingungen, d. h. nur in vitro, mit einem Überschuss von H₂O₂ und/oder in der Abwesenheit von Halogenidionen, über die Bildung von reaktiven Peroxospezies.^[17–19] Darüber hinaus sind Haloperoxidasen wie CPO-P in natürlicher Umgebung nicht an der Biosynthese von Nitroverbindungen beteiligt, wie die Analyse der Pyrrolnitrin-Biosynthese-Gene ergab.^[13,20]

[*] R. Winkler, Dr. C. Hertweck
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie HKI
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-656-705
E-mail: christian.hertweck@hki-jena.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung im Schwerpunktprogramm SPP1152 „Evolution metabolischer Diversität“ (HE 3469/2) und Frau A. Perner für MS-Messungen.

Vor kurzem haben wir das N-Oxygenase-Gen, *aurF*, aus einem Gencluster kloniert, der für die Aureothinbiosynthese in *Streptomyces thioluteus* codiert.^[21] Inaktivierungs- und Komplementierungsversuche zeigten, dass AurF eine wichtige Rolle bei der Bildung der neuartigen Polyketidsynthase-Startereinheit *p*-Nitrobenzoat (PNBA) aus *p*-Aminobenzoat (PABA) spielt^[14] und dass eine Beteiligung der Cytochrom-P450-Monooxygenase AurH an der N-Oxygenierung ausgeschlossen werden kann.^[22] Zudem ermöglichte eine *aurF*-defiziente Nullmutante die Mutasynthese des Aureothinderivates Aureonitril.^[23] AurF ist nach PrnD aus dem Pyrrolnitrin-Biosyntheseweg in *Pseudomonas pyrocinia*^[13] erst die zweite bekannte N-Oxygenase, die an der Biosynthese eines Metaboliten mit einer Nitrogruppe beteiligt ist. Während PrnD ein deutliches Rieske-Motiv aufweist, scheint AurF einen neuen Typus von Oxygenasen zu repräsentieren, da hier die Aminosäuresequenz keine konservierten Motive von bekannten Oxidoreduktasen enthält (z. B. Cofaktor-Bindestellen).

Ein PABA-zu-PNBA-Oxidationsassay mit AurF schien ein ideales Modellsystem zu sein, um einen tieferen Einblick in die Bildung von Nitrogruppen zu erhalten. Zwar konnten wir *aurF* erfolgreich überexprimieren, allerdings schlugen bislang sämtliche Versuche fehl, eine In-vitro-Oxygenierung durchzuführen, was möglicherweise an einem fehlenden und noch unbekannten Cofaktor liegt. Schon früher war berichtet worden, dass zellfreie Extrakte von *S. thioluteus* die Fähigkeit zur N-Oxygenierung verlieren.^[24] Aus diesem Grund wurde *aurF* im heterologen Wirt *Streptomyces lividans* exprimiert und die Oxygenierung als Ganzzell-Assay durchgeführt. Ein Vergleich der Ganzzell-Aktivitäten von rekombinantem Stamm und Wildtyp^[24] zeigt, dass die Umsatzrate von heterolog produziertem AurF zwar etwas niedriger als die von Wildtyp-AurF ist, aber noch in der gleichen Größenordnung liegt. Da es bislang nicht gelungen ist, den Wildtyp *S. thioluteus* genetisch zu manipulieren, kann dieses Vektor/Wirt-System darüber hinaus als wertvolles und flexibles Modellsystem fungieren. Als Negativkontrollen wurden in allen Experimenten ein *S. lividans*-Stamm mit leerem Vektor sowie Phosphatpuffer verwendet.

Die angenommenen, von PABA abgeleiteten Hydroxylamin- und Nitroso-Intermediate sind als hochreaktive und instabile Verbindungen bekannt, weshalb die schnelle und unverfälschende Isolation und Analyse der entsprechenden Benzoate aus einer wässrigen Lösung eine schwierige Aufgabe ist. Um eine Extraktion der labilen Intermediate zu umgehen, wurde eine At-Line-Detektionsmethode analog zu einer Vorschrift für den Nachweis von acylierten Anilinderivaten aus menschlichem Blut entwickelt.^[25] Der Überstand von zentrifugierten 1-mL-Proben wurde direkt auf eine RESOURCE-RPC-18-Säule geladen und mit einem wässrigen, Na₂HPO₄-gepufferten Acetonitril/Methanol-Gradienten eluiert. Die Methode wurde validiert, und mit UV-Detektion bei 280 nm konnte eine sehr niedrige Detektionsgrenze (Signal-Rausch-Verhältnis 3:1) für PABA (0.4 µg mL⁻¹) und PNBA (0.6 µg mL⁻¹) erreicht werden. Mit dieser Messanordnung wurde der Verlauf der Oxygenierungsreaktion, d. h. die Bildung von PNBA unter Verbrauch von PABA, beobachtet. Dabei fiel zunächst auf, dass die N-Oxygenierung relativ langsam verlief (> 12 h bis zur vollständigen Reaktion).

Weiterhin zeigten LC-Analysen die Bildung eines Intermediats an, das zeitgleich mit der PNBA-Produktion auftrat. Die gegenüber jener von PABA verkürzte Retentionszeit und das UV-Spektrum ließen vermuten, dass es sich hierbei um *p*-Hydroxylaminobenzoessäure (PHABA) handelte (Abbildung 1).

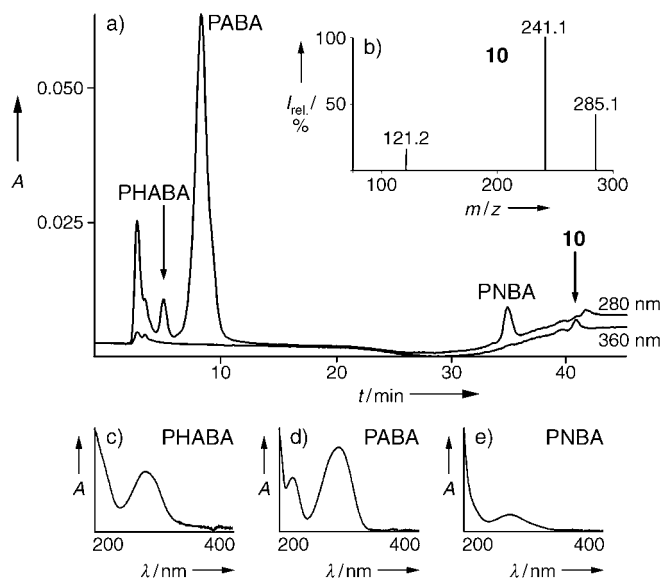


Abbildung 1. a) Chromatogramm des PABA-Oxidationsassays nach 5 h; Einschub: b) MS/MS-Spektrum von **10**; UV-Spektren von c) PHABA, d) PABA und e) PNBA.

Der Vergleich mit einer authentischen PHABA-Referenz, die aus PNBA mit Zink und Ammoniumchlorid in wässriger NaOH-Lösung hergestellt wurde,^[26] bestätigte diesen Befund eindeutig. Zudem wurde synthetisches PHABA vom AurF-Produzenten rasch zu PNBA umgesetzt, während der Kontrollstamm nicht zur Durchführung dieser Transformation in der Lage war. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nicht nur der erste, sondern auch der zweite Sauerstofftransfer von AurF katalysiert wird. Tatsächlich verläuft die Bildung von PNBA ausgehend von exogenem PHABA ungefähr fünfmal schneller als ausgehend von PABA (Abbildung 2). Dieses Resultat liefert ein starkes Indiz, dass PHABA tatsächlich als Intermediat bei der Bildung von Nitrogruppen auftritt und dass die von AurF katalysierte N-Oxygenierung schrittweise abläuft. Außerdem scheint die

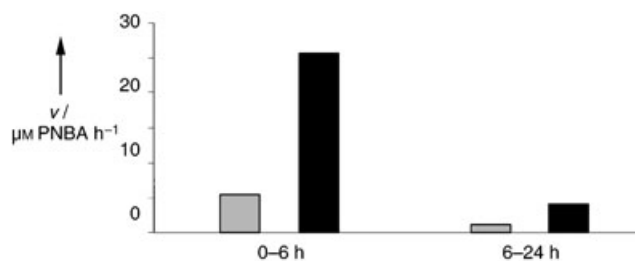


Abbildung 2. PNBA-Bildungsgeschwindigkeiten v unter Verwendung der Substrate PABA oder PHABA; ■ PNBA aus PABA, ■ PNBA aus PHABA.

erste Oxygenierungsreaktion zum Hydroxylamin ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Gesamtreaktion in vivo zu sein.

Um einen tieferen Einblick in den Verlauf und die Stöchiometrie der *N*-Oxygenierung zu erhalten, wurde der Konzentrationsverlauf von PABA, PHABA und PNBA über LC verfolgt (siehe Abbildung 3). Unter Nährstoffmangelbedingungen (A) dominiert klar die Biotransformation von

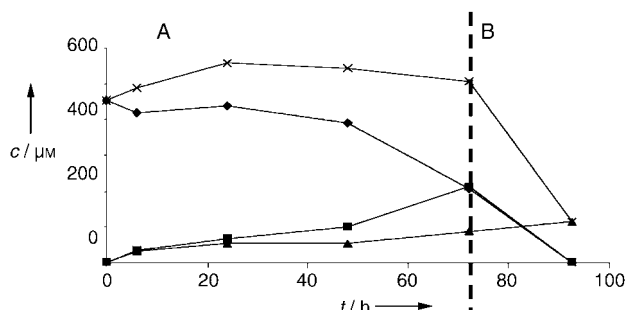
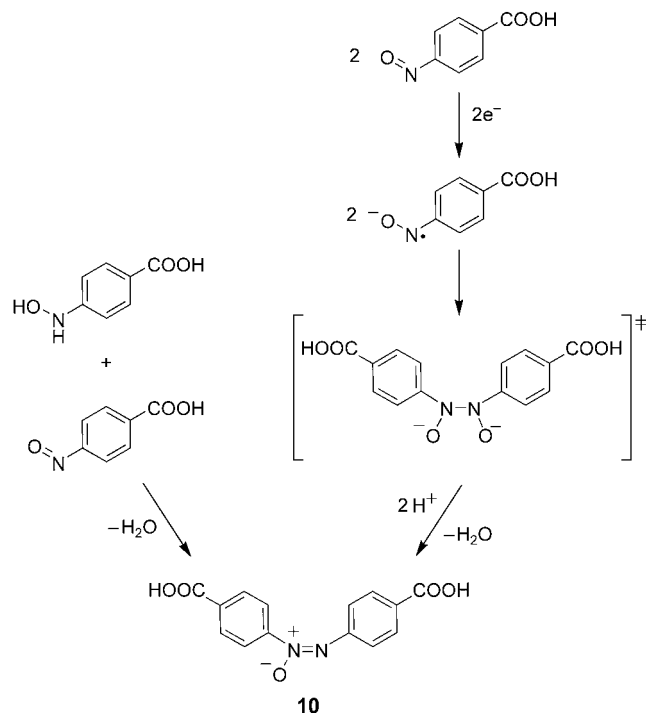


Abbildung 3. Stöchiometrie der *N*-Oxygenierungsreaktion. Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von PABA, PHABA und PNBA unter A) Nährstoffmangel (vorwiegend Sekundärmetabolismus) und B) Wachstum (vorwiegend Primärmetabolismus); \blacklozenge PABA, \blacksquare PHABA, \blacktriangle PNBA, \times Summe.

PABA zu PNBA. Die Konzentrationen von Hydroxylamin und PNBA steigen, während die Konzentration von PABA abnimmt, wobei die Summe aus allen drei Konzentrationen konstant bleibt. Nach drei Tagen allerdings, noch bevor sämtliches exogen zugeführte PABA in PNBA überführt wird, löst die Zell-Lyse, die mit der Freisetzung von neuen Substraten/Nährstoffen einhergeht, den Fortgang von Zellteilung und Wachstum aus. An diesem Punkt (B) setzt der Primärmetabolismus wieder ein, bei dem PABA hauptsächlich zur Folsäure-Biosynthese verbraucht wird. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit unserer früheren Beobachtung, dass die Fütterung von PABA zu einer wachsenden Kultur (log-Phase) eine signifikant reduzierte Transformation von PABA zu PNBA zur Folge hat.^[27] Darüber hinaus wurde das gleiche Phänomen des nach drei Tagen einsetzenden und anschließend fast vollständigen Verbrauchs von PABA auch in einem Kontrollversuch mit einem Wirtstamm ohne das Gen *aurF* beobachtet. Im Unterschied dazu ist die Bildung von PNBA in *aurF*-exprimierenden Zellen auch ohne Zugabe von PABA nachweisbar, was impliziert, dass PABA vom Primärmetabolismus abgezweigt wird. Wegen der dualen Rolle von PABA sowohl als Vorstufe für die Polyketidsynthase-Startereinheit PNBA als auch bei der Bildung von Folsäure findet ein Dialog zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus statt. Zudem bekräftigen Verlauf und exakte Stöchiometrie der Reaktion unter Mangelbedingungen die Schlüsselrolle von PHABA bei der Nitrogruppenbildung.

Trotz der hohen Empfindlichkeit der Analyseverfahren konnte das angenommene Nitroso-Intermediat **9** (siehe Schema 1), das aus dem Sauerstofftransfer auf PHABA resultieren würde, im Medium nicht nachgewiesen werden. Dies kann durch eine schnelle, möglicherweise spontane Umsetzung zur Nitroverbindung erklärt werden. Bei 360 nm

konnten wir allerdings geringe Mengen eines weiteren Metaboliten nachweisen, der aus zugesetztem PABA oder PHABA entsteht und das intermediäre Auftreten einer Nitrosoverbindung impliziert. MSⁿ-Analysen und Vergleiche mit einer synthetischen Probe bewiesen, dass dieser Metabolit identisch mit Azoxybenzol-4,4'-dicarbonsäure (**10**) ist. In Übereinstimmung mit zahlreichen mechanistischen Untersuchungen werden Azoxybenzolderivate über die Kondensation von Hydroxylaminen mit Nitrosoverbindungen oder über eine Dimerisierung von Nitrosobenzolderivaten gebildet (Schema 2).^[17,28,29] In beiden Fällen sind Nitrosobenzoat-Intermediate involviert. Wir konnten allerdings auch eine



Schema 2. Bildung der Azoxyverbindung **10** aus PHABA.

nichtenzymatische Bildung von **10** aus synthetischem PHABA in Phosphatpuffer beobachten, was die Folge einer spontanen Oxidation von PHABA unter aeroben Bedingungen zu sein scheint. Dennoch zeigen die kinetischen Daten deutlich, dass AurF auch die Oxidation von PHABA zu PNBA unterstützt. Interessanterweise wurde **10** bereits als ein Metabolit des insektenparasitären Zygomyceten *Entomophthora virulenta* beschrieben.^[30,31] Die Detektion von **10** als Nebenprodukt der PABA-Oxidation stützt daher nicht nur das Auftreten von PHABA, sondern ist auch Grundlage für das erste Modell einer Biosynthese dieses ungewöhnlichen pilzlichen Azoxymetaboliten.

Über die Biosynthese von Nitroverbindungen aus Aminen wurde schon oft spekuliert,^[15] stichhaltige Beweise für die vorgeschlagenen Synthesewege fehlten jedoch bislang. Mithilfe der extraktionsfreien At-Line-Detektion von PHABA und der erfolgreichen Transformation von synthetischem PHABA zu PNBA liefern wir hier nun den ersten Nachweis für eine schrittweise Oxidation von Aminoarenen zu Nitroarenen über ein *p*-Hydroxylaminoarene als Schlüssel-

Intermediat. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass AurF eine Monooxygenase ist, die nicht nur die Bildung eines Hydroxylamins, sondern auch die sich anschließende Oxidation zum Nitroaren katalysiert, vermutlich jeweils über den gleichen Katalysemechanismus (Schema 1). Bezüglich der Intermediate entspricht daher die sequenzielle *N*-Oxygenierung durch AurF einer Umkehrung der schrittweisen enzymatischen Reduktion von Nitroarenen, wie beim biologischen Abbau von TNT.^[32]

Experimentelles

Stämme und Kultivierung: Zur heterologen Expression wurde *aurF* über PCR aus Cosmid pHJ48 amplifiziert und strangabwärts des konstitutiven *ermE**-Promotors in den Expressionsvektor pWHM4* kloniert. Das erhaltene Plasmid, pRW01, wurde in *Streptomyces lividans* ZX1 eingeführt. Ein Stamm, der nur das Plasmid enthält, aber nicht das für AurF codierende Insert, *S. lividans* ZX1/pWHM4*, wurde als Kontrolle verwendet. Beide Stämme wurden als Glycerol-Zellbank bei -80°C gelagert. 1 mL von -80°C -Zellbank wurde eingesetzt, um einen 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 100 mL Soja-2G-Medium (Sojamehl 15 g L^{-1} , Glucose 15 g L^{-1} , NaCl 5 g L^{-1} , CaCO_3 1 g L^{-1} , KH_2PO_4 0.3 g L^{-1} , pH-Wert eingestellt auf 6.9 vor Sterilisation) mit $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Thiostrepton zu inokulieren. Die Startkultur wurde 3 d bei 28°C in einem Orbitalschüttler bei 180 rpm inkubiert. 10 mL der Startkultur wurden in 1-L-Erlenmeyer-Kolben mit 250 mL B6 (Glucose 20 g L^{-1} , Hafermehl 20 g L^{-1} , Hefeextrakt 3 g L^{-1} , NaCl 3 g L^{-1} , CaCO_3 3 g L^{-1} , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.57 g L^{-1} , $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g L^{-1}) mit $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Thiostrepton überführt und weitere 4 d bei 28°C in einem Orbitalschüttler bei 180 rpm inkubiert.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von AurF ist unter der Zugangsnummer CAE 02601 bei EMBL/GenBank zu erhalten.

N-Oxygenierungsassay: Die Kulturbrühe von *S. lividans* ZX1/pRW01 wurde durch einen MN640-Papierfilter filtriert, und 20-g-Portionen von feuchter Zellmasse wurden in 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 100 mL PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.44 g L^{-1} , KH_2PO_4 0.24 g L^{-1} , NaCl 8.00 g L^{-1} , KCl 0.20 g L^{-1} , pH 7) resuspendiert. Nach 15 min Schütteln bei 28°C und 180 rpm wurden die Startproben entnommen und Substrate als ca. 20 mg mL^{-1} Stocklösungen in Methanol zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 0.07 mg mL^{-1} erreicht wurde. Die enzymatische Reaktion wurde at-line über den chromatographischen Nachweis von PABA, PHABA und PNBA aus 1-mL-Proben gemessen. Zusätzliche Proben wurden bei -20°C für spätere Untersuchungen eingefroren.

LC-Messung von PABA, PHABA, PNBA: LC-Analysen wurden an einem ÄKTAexplorer-System mit einer RESOURCE-RPC-18-Säule (3 mL, Amersham Biosciences) durchgeführt. 1-mL-Proben wurden 1 min bei 12500 rcf zentrifugiert, und der Überstand wurde anschließend durch einen PES-Spritzenfilter ($0.22\text{ }\mu\text{m}$) auf eine Probenschleife (100 μL) gegeben. Die chromatographische Aufarbeitung startet mit 5 CV aus Eluent A (CV = Säulenvolumen), gefolgt von 5 CV Gradient aus 0–100% Eluent B und schließlich von 5 CV aus Eluent B, jeweils bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL min^{-1} . Eluent A besteht aus 12% (v/v) Acetonitril in $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 3, und Eluent B ist Methanol. Der Methanolgradient ist für die Elution von PNBA essenziell und ermöglicht außerdem die Detektion von hydrophoberen Verbindungen. Die UV-Absorption wurde bei 280, 325 und 360 nm verfolgt. Diese Wellenlängen resultieren aus Ergebnissen vorhergehender UV-spektroskopischer Messungen möglicher Substrate und Produkte. Die Peaks wurden über Vergleiche mit externen Referenzen identifiziert und quantifiziert. Über Fraktionierung konnte 4,4-Diazoxybenzoat für MS/MS-Analysen erhalten werden.

Eingegangen am 31. Januar 2005,
veränderte Fassung am 23. März 2005
Online veröffentlicht am 1. Juni 2005

Stichwörter: Azoxide · Enzymkatalyse · Naturstoffe · Nitroverbindungen · Oxygenasen

- [1] J. He, N. Magarvey, M. Pirae, L. C. Vining, *Microbiology* **2001**, 147, 2817.
- [2] K. Arima, H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1964**, 28, 575.
- [3] Y. Hirata, H. Nakata, K. Yamada, K. Okuhara, T. Naito, *Tetrahedron* **1961**, 252.
- [4] R. Cardillo, C. Fuganti, D. Ghiringhelli, D. Giangrosso, P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4875.
- [5] J. P. Cosyns, *Drug Saf.* **2003**, 26, 33.
- [6] M. Lang, P. Spiteller, V. Hellwig, W. Steglich, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1749; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1704.
- [7] R. L. Baxter, A. B. Hanley, H. W. S. Chan, S. L. Greenwood, E. M. Abbot, I. J. McFarlane, K. Milne, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2495.
- [8] E. Rössner, A. Zeeck, W. A. König, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 84; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 64.
- [9] M. Brandl, S. I. Kozhushkov, B. D. Zlatopolskiy, P. Alvermann, B. Geers, A. Zeeck, A. de Meijere, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 123.
- [10] X. K. Wang, Y. R. Zhao, T. F. Zhao, S. Lai, C. T. Che, *Phytochemistry* **1994**, 35, 263.
- [11] J. A. Kers, M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, R. Loria, *Nature* **2004**, 429, 79.
- [12] M. R. Buddha, T. Tao, R. J. Parry, B. R. Crane, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 49567.
- [13] S. Kirner, P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pee, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 1939.
- [14] J. He, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3694.
- [15] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, *Römpf Encyclopedia of Natural Products*, Thieme, Stuttgart, **2002**.
- [16] R. L. Baxter, S. L. Greenwood, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 175.
- [17] N. Itoh, N. Morinaga, T. Kouzai, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1993**, 29, 785.
- [18] M. D. Corbett, B. R. Chipko, A. O. Batchelor, *Biochem. J.* **1980**, 187, 893.
- [19] S. Kirner, K.-H. van Pee, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 346; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 352.
- [20] S. Kirner, S. Krauss, G. Sury, T. Lam, J. M. Ligon, K.-H. van Pee, *Microbiology* **1996**, 142, 2129.
- [21] J. He, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1225.
- [22] J. He, M. Müller, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16742.
- [23] M. Ziehl, J. He, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1202.
- [24] S. Kawai, K. Kobayashi, T. Oshima, F. Egami, *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, 112, 537.
- [25] R. M. Lindsay, A. M. McLaren, J. D. Baty, *J. Chromatogr.* **1988**, 433, 292.
- [26] H. Bauer, S. M. Rosenthal, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 611.
- [27] R. Winkler, C. Hertweck, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [28] G. A. Russel, E. J. Geels, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 122.
- [29] I. K. Kim, J. Whang, *J. Korean Chem. Soc.* **1976**, 20, 56.
- [30] N. Claydon, J. F. Grove, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1978**, 171.
- [31] N. Claydon, *J. Invertebr. Pathol.* **1978**, 32, 319.
- [32] N. G. McGormick, F. E. Feeherry, H. S. Levinson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, 31, 949.