

Der stereochemische Verlauf und Mechanismus der IspH-Reaktion**

Christian A. Citron, Nelson L. Brock, Patrick Rabe und Jeroen S. Dickschat*

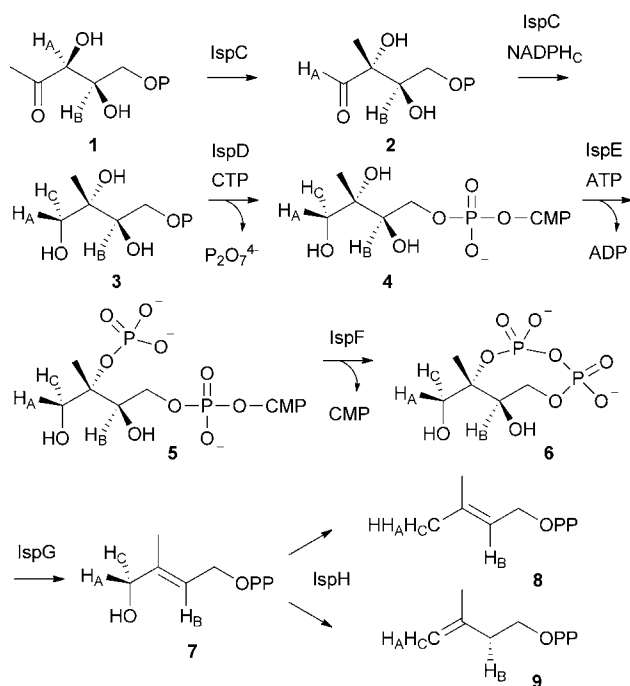
Für die Biosynthese der Terpen-Monomere Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und Isopentenylidiphosphat (IPP) existieren zwei Stoffwechselwege: der Mevalonatweg^[1] und der Deoxyxylulosephosphatweg (DOX-Weg).^[2,3] Viele pathogene Bakterien sowie der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* nutzen ausschließlich den DOX-Weg, der in diesen Organismen essentiell ist.^[4,5] Da dieser Stoffwechselweg im Menschen fehlt, sind dessen Enzyme attraktive Targets für neue Antibiotika.^[6] Ein vertieftes Verständnis der Enzymmechanismen ist folglich von hohem Interesse.

Die Intermediate und Enzyme des DOX-Weges sind alle bekannt (Schema 1).^[7] Insbesondere der ungewöhnliche

Mechanismus des Enzyms IspH, das die Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP, **7**) in eine ca. 1:5-Mischung von DMAPP (**8**) und IPP (**9**) katalysiert, hat großes Interesse erfahren und wird zurzeit immer noch diskutiert. Die Kristallstruktur von IspH zeigt einen zentralen Fe₃S₄-Cluster,^[8] wohingegen andere Beobachtungen einen Fe₄S₄-Cluster favorisieren.^[9] Jüngst wurde die Kristallstruktur von IspH zusammen mit dessen Substrat **7** erhalten, die einen zentralen Fe₄S₄-Cluster beinhaltet.^[10] Das vierte labile Eisenzentrum bindet das Substrat **7**^[9d,10] und auch potente Inhibitoren wie Pyridindiphosphate und Alkine.^[11] Die Mößbauer-Parameter des substratfreien Enzyms sprechen für eine Koordination dieses Fe durch drei S- und zwei oder drei andere Liganden (O oder N), die während der Substratbindung dissoziieren.^[9b,d]

Für die IspH-Reaktion wurden drei Mechanismen vorgeschlagen (Schema 2). Mechanismus A von Rohdich et al. (Schema 2A) beinhaltet eine Birch-Reduktion des Komplexes **10** durch einen Einelektronentransfer, Protonierung und Eliminierung von Wasser zum Allylradikal **11** und einen zweiten Elektronentransfer zum Allylanion **12**. Dessen Protonierung an C-2 oder C-4 liefert IPP bzw. DMAPP.^[12] Dieser Mechanismus wird durch Isotopenmarkierungsexperimente mit Substratanaloga gestützt.^[13] Mechanismus B wurde von Wang et al. vorgeschlagen (Schema 2B) und basiert auf der Detektion eines paramagnetischen Intermediates per ENDOR-Spektroskopie, das in einer inaktiven E126A-Mutante gefangen und als Metallacyclopropan-Spezies interpretiert wurde.^[14] Alternativ kann dieses Intermediat als η^2 -Alkenyl- π -Komplex beschrieben werden. Der abgeleitete Mechanismus ausgehend von **10** führt über Einelektronenreduktion zum η^2 -Alkenyl/Metallacyclus **13** und anschließende Protonierung/Dehydratisierung zum η^1 -Allylkomplex **14**. Ein zweiter Elektronentransfer ergibt **12** als Vorläufer für IPP und DMAPP. Mechanismus C wurde von Altincicek et al. vorgeschlagen und umfasst die anfängliche Protonierung/Dehydratisierung von **10** zum Allylkation **15**, die durch die Lewis-Acidität des Metallzentrums unterstützt wird, gefolgt von zwei Reduktionsschritten über **11** zu **12** und Protonierung zu IPP und DMAPP.^[15] Dieser Mechanismus ist im Widerspruch zu der Beobachtung, dass elektronenziehende Substituenten in Substratanaloga nur einen geringen Effekt haben.^[16]

Gemeinsame Intermediate aller drei Mechanismen sind der anfängliche Komplex **10** und das Allylanion **12**. Das Produktverhältnis von IPP und DMAPP wird vermutlich durch einen Protonentransfer von der terminalen Phosphatgruppe in HMBPP kontrolliert, deren Sauerstoffatome einen Abstand von 3.4–3.5 Å zu C-1 bzw. C-3 aufweisen (Schema 2A).^[10,12b] Diese Hypothese ist in völligem Einklang mit der beobachteten stereospezifischen Protonierung an C-3 von HMBPP von der *Si*-Seite.^[17] Der stereochemische Verlauf

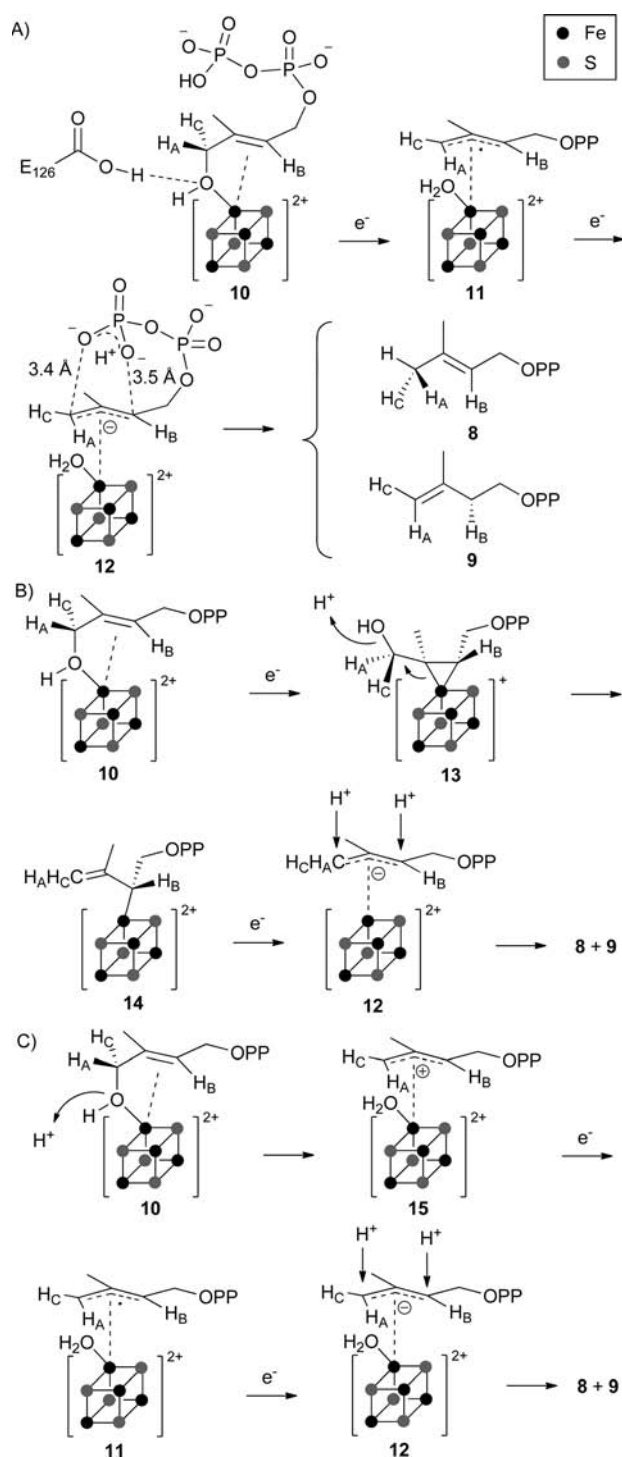


Schema 1. Stereochemie des DOX-Weges. CTP = Cydintriphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, CMP = Cytidinmonophosphat.

[*] C. A. Citron, N. L. Brock, P. Rabe, Dr. J. S. Dickschat
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: j.dickschat@tu-bs.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) mit einem Emmy-Noether-Stipendium (an J.S.D.) und den Fonds der Chemischen Industrie mit einem Promotionsstipendium (an N.L.B.) gefördert. Wir danken Prof. Dr. Stefan Schulz für exzellente Förderung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201110> zu finden.



Scheme 2. Vorgeschlagene Mechanismen für die IspH-Reaktion.

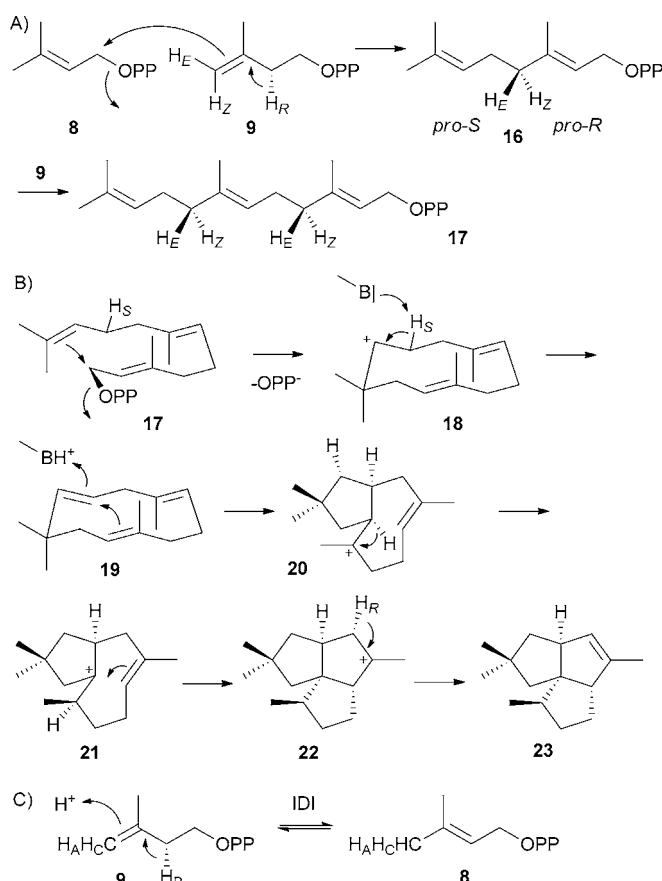
nahezu aller Schritte des DOX-Weges wurde untersucht.^[18] Auf diesem Weg wird das an C-3 gebundene Wasserstoffatom in **1** (H_A , Schema 1) zum Aldehyd-Wasserstoff in **2** und letztlich zum *pro-S*-Wasserstoff an C-1 in **3** umgewandelt, wohingegen das *pro-R*-Wasserstoffatom (H_C) aus NADPH eingeführt wird.^[19] Alle folgenden Transformationen von **3** nach **6** verlaufen mit unverändertem Kohlenstoffgerüst. Verschiedene Mechanismen wurden für die Transformation von **6**

in HMBPP vorgeschlagen,^[20] es ist aber unstrittig, dass C-2 und C-3 ohne Verlust von H_B deoxygeniert werden.^[21] Lediglich für die IspH-Reaktion konnte bis heute kein stereochemischer Verlauf etabliert werden: Es ist unbekannt, ob H_A oder H_C in HMBPP als terminal olefinisches (*E*)- oder (*Z*)-Wasserstoffatom in IPP enden; ihr Schicksal ist jedoch in der Struktur des Intermediates **12** vorbestimmt (Schema 2). Eine Vorhersage des stereochemischen Verlaufs ist daher für die Mechanismen A und C möglich: Die OH-Gruppe von HMBPP bleibt am Fe bis zu dem Schritt gebunden, in dem der stereochemische Verlauf der Reaktion festgelegt wird. Dies sollte in der Ausrichtung von H_A in die (*Z*)- und von H_C in die (*E*)-Position resultieren. In Mechanismus B dissoziiert diese OH-Gruppe wie in **13** gezeigt, wodurch freie Rotation der CH_2OH -Gruppe möglich wird. In der Konsequenz kann der weitere stereochemische Verlauf in Bezug auf H_A und H_C nicht vorhergesagt werden. Protonierung an C-1 ergibt eine potentiell chirale Methylgruppe in DMAPP mit unbekannter Konfiguration, allerdings kann nach den Mechanismen A und C die in Schema 2 A gezeigte absolute Konfiguration angenommen werden. Wir berichten hier über den stereochemischen Verlauf der IspH-Reaktion und dessen Implikationen für den Enzymmechanismus.

Um den stereochemischen Verlauf der IspH-Reaktion zu untersuchen, wurden deuterierte Isotopologen von 1-Deoxy-D-xylulose in Fütterungsexperimenten verwendet, die intrazellulär zu **1** phosphoryliert werden können. Insbesondere kann eine Deuteriummarkierung der Position H_A wichtige Einblicke liefern. Die Pentalenen-Biosynthese in Streptomyces stellt ein geeignetes System dar, die Deuteriummarkierung zu verfolgen, da der detaillierte stereochemische Verlauf sämtlicher Transformationen zu diesem Sesquiterpen bekannt ist.

Die Reaktion von DMAPP oder einem fortgeschrittenen Polyisoprenoiddiphosphat wie Geranyldiphosphat (GPP, **16**) verläuft durch Angriff von IPP von dessen *Si*-Seite an C-4^[22] und Abstraktion des *pro-R*-Wasserstoffs (Schema 3A).^[23] Daher konvertiert das terminale olefinische H_E in IPP in die 4-*pro-S*-Position und H_Z in die 4-*pro-R*-Position. Die Reaktion von Farnesylidiphosphat (FPP, **17**) zu Pentalenen (**23**, Schema 3B) wird durch Cyclisierung zum Humulylkation (**18**) initiiert. Die spezifische Entfernung des 9-*pro-S*-Wasserstoffs liefert α -Humulen (**19**). Das abstrahierte Proton wird an C-10 ohne signifikanten Austausch mit dem Medium wieder eingeführt.^[24] Die gleichzeitige Cyclisierung zu **20**, eine 1,2- H^- -Wanderung zu **21**, Cyclisierung zu **22** und Deprotonierung ergibt **23**. Der finale Deprotonierungsschritt verläuft mit spezifischem Verlust des *pro-R*-Wasserstoffs,^[25] dessen Ursprung in H_E in IPP liegt. Daher kann die Überführung von H_A in **1** in entweder H_E oder H_Z in IPP während der IspH-Reaktion anhand dessen Schicksal in der Deprotonierung zu **23** verfolgt werden.

Für die Fütterungsexperimente wurde eine Serie deuterierter Isotopologen von 1-Deoxy-D-xylulose (**30**) synthetisiert (Schema 4). Alle diese Verbindungen wurden an *Streptomyces avermitilis* verfüttert, und der Einbau von Deuterium in **23** wurde per GC-MS analysiert. Ein Vorteil dieser analytischen Methode besteht darin, dass es möglich ist, deuterierte und undeuterierte Isotopologen gaschromatographisch

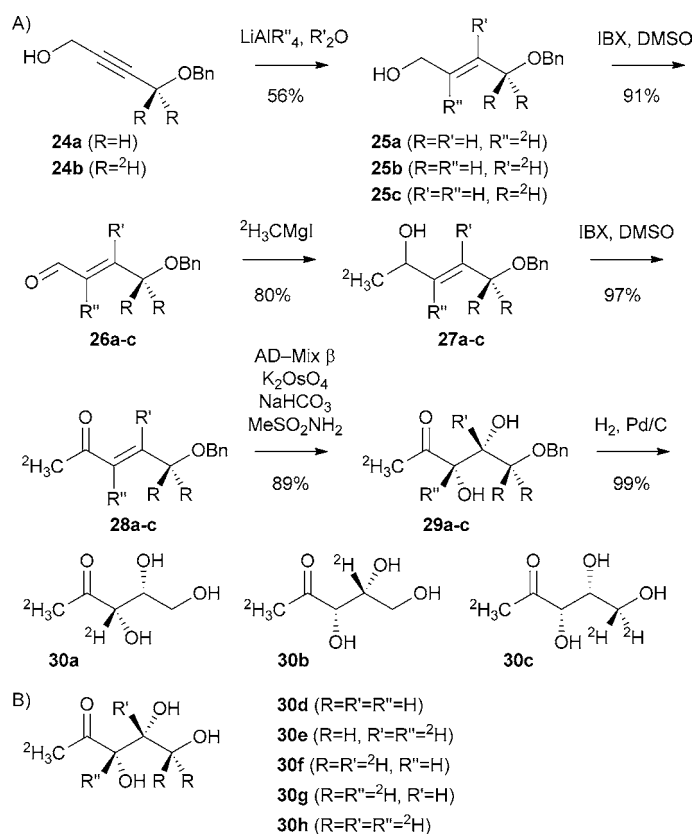


Scheme 3. Stereochemischer Verlauf A) der Polyisoprenoid-Biosynthese, B) der Pentalenen-Biosynthese und C) der IDI-Reaktion.

zu trennen (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).^[26] Da dieser Effekt umso größer ist, je höher der Deuterierungsgrad des Analyten ist, wurde die Methylgruppe in allen synthetisierten Isotopologen von **30** deuteriert.

Für die Einführung von Deuterium in **30** wurde basierend auf einer Methode von Giner^[27] eine flexible Synthesemethode entwickelt (Schema 4A). Der Monobenzylether von But-2-in-1,4-diol (**24a**) wurde mit LiAlH_4 behandelt, gefolgt von wässriger Aufarbeitung, wodurch **25a** erhalten wurde. Die Oxidation mit IBX gab **26a** ohne detektierbaren Deuteriumverlust. Die Reaktion mit $^2\text{H}_3\text{CMgI}$ lieferte **27a**, das durch IBX-Oxidation zu **28a** umgesetzt wurde. Sharpless-Dihydroxylierung mit AD-Mix β und katalytische Hydrierung ergaben **30a**. Für die Synthese von **30b** wurde das Alkin **24a** mit LiAlH_4 reduziert, gefolgt von der Hydrolyse mit $^2\text{H}_2\text{O}$, und **30c** wurde ausgehend von **24b** erhalten, das aus *tert*-Butyldimethylsilyl(TBS)-geschütztem Propargylalkohol zugänglich ist (siehe Hintergrundinformationen). Alle anderen Isotopologen **30d–h** (Schema 4B) wurden auf derselben Route unter Verwendung der geeigneten Kombination von unmarkierten und deuterierten Reagentien erhalten.

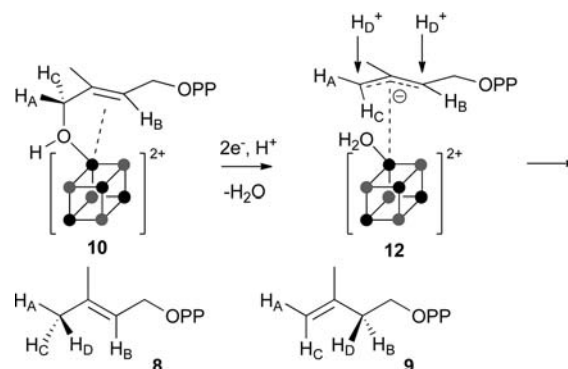
Die Fütterung von **30a** ergab $[\text{H}_{11}]$ -**23** (Abbildungen S2A,B). Ausgehend von **30a** ($\text{H}_A = ^2\text{H}$) kann die Bildung von $[\text{4,5,5,5-}^2\text{H}_4]\text{DMAPP}$ und $[\text{4,5,5,5-}^2\text{H}_4]\text{IPP}$ erwartet werden. Da nur elf der zwölf Deuteriumatome aus den drei Isopreneinheiten in **23** wiedergefunden werden und eines



Scheme 4. Synthese von deuterierter 1-Deoxy-D-xylulose. IBX = 1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-on-1-oxid, DMSO = Dimethylsulfoxid.

verloren geht, zeigt dieses Experiment eindeutig, dass der stereochemische Verlauf der IspH-Reaktion die Umwandlung von H_A in **10** in die (*E*)- und H_C in die (*Z*)-Position von IPP beinhaltet (Schema 5). Obwohl durch dieses Experiment kein direkter Nachweis möglich ist, kann für die potentiell chirale Methylgruppe $-\text{CH}_A\text{H}_B\text{H}_D$ in DMAPP die gezeigte absolute Konfiguration angenommen werden.

Die Fütterung von **30b** resultierte in $[\text{H}_{10}]$ -**23** (Abbildung S2C). Dieses Ergebnis ist in vollem Einklang mit der Umwandlung von **30b** zu $[\text{2,5,5,5-}^2\text{H}_4]\text{DMAPP}$ und (*2R*)- $[\text{2,5,5,5-}^2\text{H}_4]\text{IPP}$ ($\text{H}_B = ^2\text{H}$) sowie der Bildung von $[\text{H}_{10}]\text{FPP}$ unter Verlust von zwei Deuteriumatomen (H_B) aus den IPP-Verlängerungseinheiten während der Polyisoprenoid-Bio-



Scheme 5. Stereochemischer Verlauf der IspH-Reaktion.

synthese. Dieses Ergebnis untermauert die bereits zuvor beschriebene stereospezifische Protonierung an C-3 in HMBPP von der *Si*-Seite. Der Grund für den leichten zusätzlichen Verlust eines Deuteriumatoms, der durch das Ion m/z 213 angezeigt wird, liegt in der partiellen Isomerisierung von (2*R*)-[2,5,5,5- $^2\text{H}_4$]IPP zu [5,5,5- $^2\text{H}_4$]DMAPP durch die Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IDI, Schema 3C), eine Reaktion, in der spezifisch das *pro-R*-Wasserstoffatom (H_B) abstrahiert wird, und zwar sowohl im Falle einer Typ-I- als auch einer Typ-II-IDI,^[17,23a,28] und dessen anschließendem Einbau in **23**. Im Genom von *S. avermitilis* ist eine Typ-I-IDI, aber kein Enzym des Typs II, codiert.

Die Fütterung von **30c** resultiert in [$^2\text{H}_{15}$]-**23** (Abbildung S2D) unter Einbau aller fünfzehn Deuteriumatome. Dieses Ergebnis stützt die frühere Beobachtung, dass die Umwandlung des Kations **18** über **19** in **20** (Schema 3B) ohne Protonenaustausch mit dem Medium abläuft und ist daher in völliger Übereinstimmung mit dem bekannten Cyclisierungsmechanismus der Pentalenen-Synthese.^[24,25] Die Fütterungsexperimente mit den Isotopologen **30d–h** bestätigten die mit **30a–c** erhaltenen Ergebnisse (siehe Hintergrundinformationen).

Der abgeleitete stereochemische Verlauf der IspH-Reaktion (Schema 5) hat wichtige Konsequenzen für den Enzymmechanismus (Schema 2). Wie oben ausgeführt, ist der gefundene stereochemische Verlauf $\text{H}_A \rightarrow \text{H}_E$ und $\text{H}_C \rightarrow \text{H}_Z$ im Falle der Mechanismen A und C schwierig zu verstehen, wohingegen nach Mechanismus B die OH-Gruppe in HMBPP in **13** vom Fe-Zentrum dissoziiert vorliegt. Dies lässt eine Rotation der CH_2OH -Gruppe in eine Konformation zu, die den beobachteten stereochemischen Verlauf einfach erklärt. Interessanterweise wurde eine entsprechende Konformation kürzlich durch quantenchemische Glide-Docking-Rechnungen und molekularmechanische Optimierung gefunden (Abbildung 1).^[14] Außerdem wurde diese Konformation jüngst in Kristallstrukturen mehrerer IspH-Mutanten beobachtet.^[29] Zusammenfassend spricht der beobachtete stereochemische Verlauf der IspH-Reaktion für Mechanismus B.

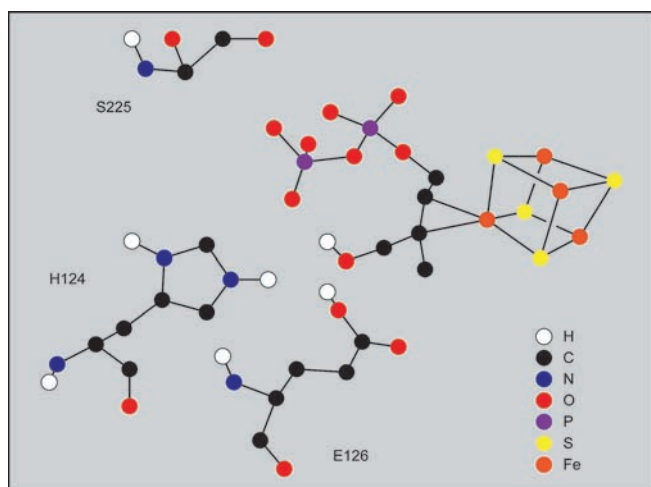


Abbildung 1. Quantenchemische Rechnungen zur Bindung von HMBPP im aktiven Zentrum von IspH.^[14]

Wir haben den stereochemischen Verlauf der IspH-Reaktion sowie wichtige Schlussfolgerungen für dessen Enzymmechanismus präsentiert. Diese Ergebnisse ermöglichen in zukünftigen Fütterungsexperimenten die präzise Lokalisierung von Deuterium in der Biosynthese von Terpenen über den DOX-Weg. Die gefundenen Konsequenzen für den Mechanismus der IspH-Reaktion könnten für das rationale Design von neuen IspH-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe hilfreich sein.

Eingegangen am 9. Februar 2012

Online veröffentlicht am 12. März 2012

Stichwörter: Biosynthese · DOX-Weg · IspH-Enzym · Stereochemie · Terpene

- [1] K. Bloch, *Steroids* **1992**, 57, 378–383.
- [2] M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565–574.
- [3] W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, *Trends Plant Sci.* **2001**, 6, 78–84.
- [4] M. Eberl, M. Hintz, A. Reichenberg, A.-K. Kollas, J. Wiesner, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2003**, 544, 4–10.
- [5] R. C. Röhrich, N. Englert, K. Troschke, A. Reichenberg, M. Hintz, F. Seeber, E. Balconi, A. Aliverti, G. Zanetti, U. Köhler, M. Pfeiffer, E. Beck, H. Jomaa, J. Wiesner, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6433–6438.
- [6] E. Oldfield, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1216–1226.
- [7] a) G. A. Sprenger, U. Schörken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, H. Sahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12857–12862; b) L. M. Lois, N. Campos, S. R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2105–2110; c) T. Kuzuyama, S. Takahashi, H. Watanabe, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4509–4512; d) T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 703–706; e) T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2925–2928; f) M. Takagi, T. Kuzuyama, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Daiiri, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 3395–3398; g) S. Hecht, W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14837–14842; h) F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1158–1163.
- [8] a) I. Reikittke, J. Wiesner, R. Röhrich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E. Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17206–17207; b) T. Gräwert, F. Rohdich, I. Span, A. Bacher, W. Eisenreich, J. Eppinger, M. Groll, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5867–5870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5756–5759.
- [9] a) M. Wolff, M. Seemann, B. Tse Sum Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. Garcia Estrabot, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, 541, 115–120; b) M. Seemann, K. Janthawornpong, J. Schweizer, L. H. Böttger, A. Janoschka, A. Ahrens-Botzong, E. Ngouamegne Tambou, O. Rotthaus, A. X. Trautwein, M. Rohmer, V. Schünemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13184–13185; c) Y. Xiao, L. Chu, Y. Sankis, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9931–9933; d) A. Ahrens-Botzong, K. Janthawornpong, J. A. Wolny, E. Ngouamegne Tambou, M. Rohmer, S. Krasutsky, C. D. Poulter, V. Schünemann, M. Seemann, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12182–12185; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11976–11979.

- [10] T. Gräwert, I. Span, W. Eisenreich, F. Rohdich, J. Eppinger, A. Bacher, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1077–1081.
- [11] a) W. Wang, J. Li, K. Wang, T. I. Smirnova, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6525–6528; b) K. Wang, W. Wang, J.-H. No, Y. Zhang, Y. Zhang, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6719–6727.
- [12] a) F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupiz, T. Gräwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1586–1591; b) Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2164–2165; c) Y. Xiao, P. Liu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9868–9871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9722–9725.
- [13] W. C. Chang, Y. Xiao, H. W. Liu, P. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12512–12515; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12304–12307.
- [14] W. Wang, K. Wang, Y.-L. Liu, J.-H. No, J. Li, M. J. Nilges, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4522–4527.
- [15] B. Altincicek, E. C. Duin, A. Reichenberg, R. Hedderich, A.-K. Kollas, M. Hintz, S. Wagner, J. Wiesner, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 437–440.
- [16] Y. Xiao, W. C. Chang, H. W. Liu, P. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5912–5915.
- [17] R. Laupitz, T. Gräwert, C. Rieder, F. Zepeck, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, W. Eisenreich, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1367–1376.
- [18] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1917–1936.
- [19] a) P. J. Proteau, Y.-H. Woo, R. T. Williamson, C. Phaosiri, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 921–923; b) T. Radykewicz, F. Rohdich, J. Wung-sintaweekul, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, D. Arigoni, *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157–160.
- [20] a) W. Wang, J. Li, K. Wang, C. Huang, Y. Zhang, E. Oldfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11189–11193; b) W. Wang, K. Wang, J. Li, S. Nellutla, T. I. Smirnova, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8400–8403; c) W. Xu, N. S. Lees, D. Adediji, J. Wiesner, H. Jomaa, B. M. Hoffman, E. C. Duin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14509–14520; d) Y. Xiao, D. Rooker, Q. You, C. L. Freel Meyers, P. Liu, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 527–530.
- [21] a) J.-L. Giner, B. Jaun, D. Arigoni, *Chem. Commun.* **1998**, 1857–1858; b) L. Charon, J.-F. Hoeffler, C. Pale-Grosdemange, L.-M. Lois, N. Campos, A. Boronat, M. Rohmer, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 737–742; c) C. Rieder, B. Jaun, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2504–2513; d) I. Neundorff, C. Köhler, L. Hennig, M. Findeisen, D. Arigoni, P. Welzel, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1201–1205; e) J.-F. Hoeffler, A. Hemmerlin, C. Grosdemange-Billiard, T. J. Bach, M. Rohmer, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 573–583.
- [22] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják, L. Yengoyan, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 3970–3987.
- [23] a) J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popják, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1966**, *163*, 492–514; b) T. W. Goodwin, R. J. H. Williams, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1966**, *163*, 515–518.
- [24] D. E. Cane, C. Abell, R. Lattman, C. T. Kane, B. R. Hubbard, P. H. M. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4081–4082.
- [25] D. E. Cane, C. Abell, P. H. M. Harrison, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, J. S. Oliver, S. W. Weiner, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1991**, *332*, 123–129.
- [26] J. S. Dickschat, C. A. Citron, N. L. Brock, R. Riclea, H. Kuhz, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3339–3346.
- [27] J.-L. Giner, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2479–2482.
- [28] a) K. Clifford, J. W. Cornforth, R. Mallaby, G. T. Phillips, *Chem. Commun.* **1971**, 1599–1600; b) C. Kao, W. Kittleman, H. Zhang, H. Seto, H.-W. Liu, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5677–5680.
- [29] I. Span, T. Gräwert, A. Bacher, W. Eisenreich, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 1–9.