

Ein maßgeschneidertes chimäres Thiamindiphosphat-abhängiges Enzym zur direkten asymmetrischen Synthese von (S)-Benzoinen**

Robert Westphal, Constantin Vogel, Carlo Schmitz, Jürgen Pleiss, Michael Müller, Martina Pohl* und Dörte Rother

In memoriam Ayhan S. Demir

Abstract: Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme sind bekannt für die Katalyse der asymmetrischen Synthese von chiralen α -Hydroxyketonen ausgehend von einfachen prochiralen Substraten. Dabei wird das Produktspektrum von den sterischen und chemischen Eigenschaften des aktiven Zentrums des Enzyms festgelegt. Enzyme, die die Carboligation von aromatischen Aldehyden zu (S)-Benzoinen katalysieren, waren bisher nicht identifiziert worden. Diese Lücke konnten wir durch die Konstruktion eines chimären Enzyms schließen, das die Synthese von verschiedenen (S)-Benzoinen mit exzellenten Enantiomerenüberschüssen (> 99 %) und guten Umsätzen katalysiert.

Thiamindiphosphat(ThDP)-abhängige Enzyme sind bewährte Katalysatoren für die stereo- und regioselektive Synthese von chiralen α -Hydroxyketonen mithilfe asymmetrischer C-C-Bindungsknüpfung ausgehend von Aldehyden, α -Ketosäuren und Ketonen.^[1] Während Enzyme für die enantiokomplementäre Synthese einer breiten Palette von symmetrischen und gemischten aliphatischen, araliphatischen und aromatischen Produkten vorliegen,^[2] ist bislang kein Biokatalysator für den selektiven Zugang zu (S)-Benzoinen ausgehend von Benzaldehyden verfügbar. Stattdessen stehen andere enzymatische Synthesewege zur Verfügung, darunter die kinetische Racematspaltung sowie Deracemisierung von *rac*-Benzoinen^[3] oder die asymmetrische Reduktion von 1,2-Diarylethan-1,2-dionen (Benzile).^[4] Zwar sind diese Ansätze meist durch hohe Stereoselektivitäten charakterisiert, sie haben jedoch alle denselben Nachteil: Das racemische oder prochirale Ausgangsmaterial muss zunächst chemisch syn-

thesiert werden. Diese zusätzlichen Schritte vermindern die Ökoeffizienz und Nachhaltigkeit des Prozesses gegenüber der direkten enzymatischen Synthese von (S)-Benzoinen ausgehend von kommerziell zugänglichen Benzaldehyden. Diese direkte Synthese ist noch immer ein Alleinstellungsmerkmal der nichtenzymatischen organischen Syntheseschemie.^[5]

Während die *R*-selektive enzymatische Synthese von Benzoinen bereits gelang,^[6] ist die *S*-selektive Synthese durch die spezifische Architektur des aktiven Zentrums der ThDP-abhängigen Enzyme limitiert (Abbildung 1). Die Einführung des *S*-Taschen-Konzeptes ermöglichte das Design einer *S*-selektiven Variante der Pyruvat-Decarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus* (*ApPDC*) zur Bildung von (S)-Phenylacetylcarbinol (PAC).^[7] Der Austausch eines Glutamatrestes (E469) gegen ein Glycin erlaubte es dem Benzaldehyd, als Akzeptor vorwiegend in der antiparallelen Anordnung relativ zum ThDP-gebundenen Donor zu binden, was die Grundvoraussetzung für *S*-Selektivität ist. Allerdings stellt *ApPDC*-E469G lediglich eine kleine Donorbindestelle bereit,

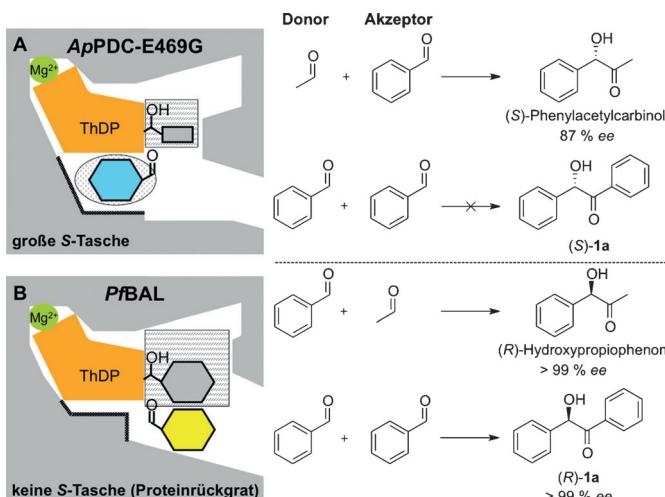


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Umfangs und der Limitierungen der von *ApPDC*-E469G und *PfBAL* katalysierten Carboligationen. Die Bildung von (S)-Benzoin (**1a**) wird entweder durch eine kleine Donorbindestelle (A) oder eine nicht zugängliche *S*-Tasche für die antiparallele Orientierung des Akzeptor-Benzaldehyds relativ zum ThDP-gebundenen Donor-Benzaldehyd (als Hydroxybenzyl) (B) verhindert. Gestricheltes Rechteck: Donorbindestelle; gepunkteter Kreis: *S*-Taschen-Region; Rechteck: Acetaldehyd; Sechseck: Benzaldehyd; grau: Donor; türkis: antiparallel orientierter Akzeptor, der zum entsprechenden *S*-Produkt führt; gelb: parallel orientierter Akzeptor, der zum entsprechenden *R*-Produkt führt.

[*] Dr. R. Westphal,^[1] C. Schmitz, Prof. Dr. M. Pohl, Dr. D. Rother
IBG-1: Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH
Wilhelm-Johnen-Straße, 52425 Jülich (Deutschland)

E-Mail: ma.pohl@fz-juelich.de

Dipl.-Biol. C. Vogel,^[1] Prof. Dr. J. Pleiss
Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart (Deutschland)

Prof. Dr. M. Müller
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG im Rahmen der Forschergruppe „Diversity of asymmetric thiamine catalysis“ (FOR 1296) finanziert. Wir danken Doris Hahn, Ursula Mackfeld und Heike Offermann für die technische Unterstützung im Labor.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405069> zu finden.

die bevorzugt kleine aliphatische Donorsubstrate stabilisiert und somit die Bildung von (S)-Benzoin verhindert [(S)-**1a**] (Abbildung 1 A). Die Benzaldehyd-Lyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*) ist ein leistungsstarker, aber strikt *R*-selektiver Katalysator für die Synthese von **1a**.^[6b] Im Unterschied zu *ApPDC* bietet *PfBAL* eine große Donorbindestelle, die ideal für die Stabilisierung des Benzaldehyds in dieser Position ist. *PfBAL* ermöglicht wegen einer fehlenden *S*-Tasche jedoch nur die parallele Ausrichtung des Donor- und Akzeptor-Benzaldehyds vor der Carboligation. Des Weiteren ist das *S*-Taschen-Engineering in *PfBAL* durch die Position des Proteinrückgrats der entsprechenden α -Helix in der *S*-Taschen-Region limitiert (Abbildung 1 B).

Um das Problem der enzymatischen (S)-Benzoinsynthese zu lösen, wurde durch die Kombination der Charakteristika der aktiven Zentren der Variante *ApPDC-E469G*^[7] und *PfBAL* ein rationaler Hybridisierungsansatz verfolgt. Zwei Ansätze sind hierbei denkbar: 1) die Einführung einer großen *S*-Tasche in *PfBAL* oder 2) die Erweiterung der Donorbindestelle von *ApPDC-E469G*. Hier zeigen wir, dass der zweite Ansatz tatsächlich zur ersten maßgeschneiderten *S*-selektiven ThDP-abhängigen Enzymvariante zur Bildung verschiedener Benzoine führte.

Durch die Kombination von Modellierungsstudien mit einer umfassenden Sequenzanalyse der Aminosäureverteilung in 186 homologen PDC-Sequenzen und 43 BAL-Sequenzen konnte Threonin (T384) als entscheidender Faktor für die Beeinflussung der Größe der Donorbindestelle in *ApPDC-E469G* identifiziert werden. T384 begrenzt den Platz für den Benzaldehyd in der Donorbindestelle und ist in 92 % der zu *ApPDC* homologen Sequenzen konserviert (Abbildung 2 A), wohingegen Glycin in äquivalenter Position in allen Sequenzen homolog zur *PfBAL* gefunden wurde. Durch

ortsspezifische Mutagenese wurde T384 in *ApPDC-E469G* durch Glycin ersetzt, um die Donorbindestelle von *PfBAL* nachzuahmen. Infolgedessen wurde eine Donorbindestelle mit vermeintlich genügend Platz für den Benzaldehyd erhalten (Abbildung 2 B). Zusätzlich zeigte eine kurze Moleküldynamik-Simulation geringe Konformationsänderungen des benachbarten Tryptophanrestes (W388), wahrscheinlich infolge von Wechselwirkungen mit dem ThDP-gebundenen Donor-Benzaldehyd (Hydroxybenzyl), wodurch die Donorbindestelle zusätzlich geöffnet wurde.

Die biochemische Charakterisierung der neuen Variante belegte, dass die einzelne Mutation von T384 zu Glycin tatsächlich die Chemoselektivität von *ApPDC-E469G*, die nun Benzaldehyd als Donor bevorzugt, veränderte. Während keine signifikante Entstehung von **1a** bei der Homokupplung von Benzaldehyd mit *ApPDC-E469G* beobachtet werden konnte (Tabelle 1, Nr. 1), katalysierte die Zweifachvariante

Tabelle 1: Enzymatische Synthese von (S)-**1a** katalysiert durch *ApPDC*-Varianten.^[a]

Nr.	<i>ApPDC</i> -Variante	ee [%] ^[b]	Umsatz [%] ^[c]
1	E469G	n.b. ^[d]	< 1
2	E469G/T384G	59	52
3	E469G/T384G/I468G	66	23
4	E469G/T384G/I468A	87	95
5	E469G/T384G/I468V	76	40
6	E469G/T384G/I468V/W543F	95	36

[a] Reaktionsbedingungen: 50 mM Triethanolamin-Puffer, pH 8.0, 2 mM MgSO₄ und 0.1 mM ThDP; 1 mg mL⁻¹ Enzym; 18 mM Benzaldehyd; 20°C, 6 h. [b] Bestimmt durch HPLC mittels chiraler Phase. [c] Bestimmt durch HPLC mittels chiraler Phase basierend auf dem Verbrauch von Benzaldehyd. [d] Nicht bestimmt.

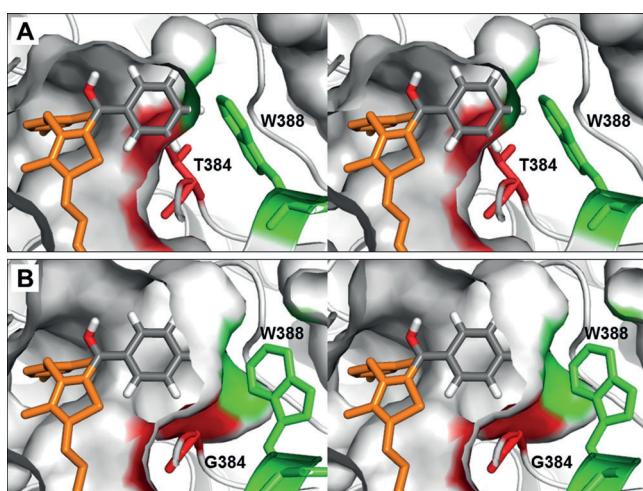


Abbildung 2. Die Donorbindestelle von *ApPDC-E469G* (A) und *ApPDC-E469G/T384G* (B) mit Benzaldehyd gebunden als Hydroxybenzyl (grau) an C2 von ThDP (orange). A) *ApPDC-E469G* ist unfähig, den Benzaldehyd in der kleinen Donorbindestelle zu binden, deren Größe hauptsächlich durch T384 (rot) beschränkt wird. B) Die Donorbindestelle konnte durch den Austausch von T384 gegen Glycin für Benzaldehyd geöffnet werden. Des Weiteren zeigte die äquilibrierte Struktur Konformationsänderungen von W388 (grün), wodurch die Donorbindestelle zusätzlich geöffnet wurde.

ApPDC-E469G/T384G die Bildung von Benzoin mit einem Umsatz von 52 % unter den getesteten Bedingungen (Tabelle 1, Nr. 2). Die Präferenz für Benzaldehyd als Donor konnte ebenfalls in der gemischten Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd mit der Variante *ApPDC-E469G/T384G* gezeigt werden. Diese Reaktion führte zur Bildung eines Produktgemisches aus **1a** und 2-Hydroxypropiophenon (2-HPP), wohingegen PAC, das Hauptprodukt der von Wildtyp-*ApPDC* oder von *ApPDC-E469G* katalysierten Reaktion,^[7] nur in Spuren gefunden werden konnte. Darüber hinaus katalysierte die Variante *ApPDC-E469G/T384G* sowohl die Synthese von (S)-**1a** ausgehend von Benzaldehyd mit moderater Stereoselektivität (59 % ee; Tabelle 1, Nr. 2) als auch die gemischte Carboligation zu 2-HPP mit guter *S*-Selektivität (91 % ee).

Um die moderate Stereoselektivität der *ApPDC-E469G/T384G* zu verbessern, gab es zwei mögliche Strategien: die Stabilisierung der antiparallelen („*S*-Weg“) oder die Destabilisierung der parallelen Orientierung des Akzeptors („*R*-Weg“) vor der eigentlichen Carboligation.^[8] Um den *R*-Weg in *ApPDC-E469G/T384G* zu unterdrücken, wurde das aktive Zentrum auf Reste hin untersucht, die potenziell den Akzeptor-Benzaldehyd in der parallelen Ausrichtung stabilisieren können. Mithilfe von Modellierungsstudien konnten I468 und W543 identifiziert werden (Abbildung 3 A), die den

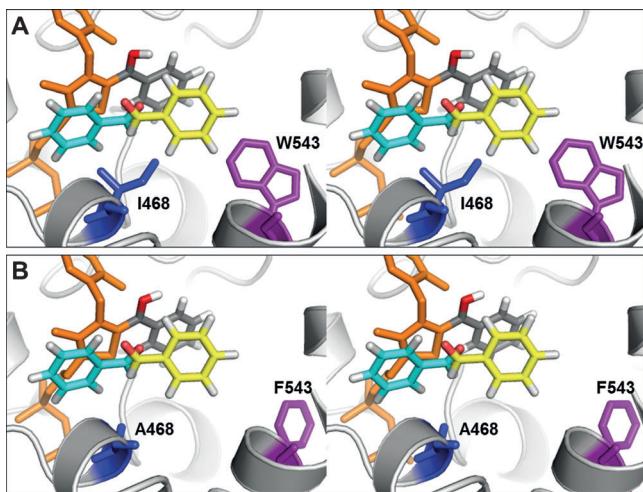


Abbildung 3. Mögliche Stabilisierung des parallel orientierten Akzeptor-Benzaldehyds (gelb) im aktiven Zentrum von ApPDC-E469G/T384G (A) und ApPDC-E469G/T384G/I468A/W543F (B). A) In E469G/T384G wird der parallel orientierte Benzaldehyd potenziell durch I468 (blau) und W543 (lila) stabilisiert, die beide seine antiparallele Orientierung (türkis) nicht direkt beeinflussen. B) In der Variante E469G/T384G/I468A/W543F ist die Stabilisierung des parallel orientierten Benzaldehyds durch A468 (blau) und F543 (lila) nicht länger möglich.

parallel ausgerichteten Benzaldehyd durch unpolare sowie π - π -Wechselwirkungen stabilisieren könnten.

I468 wurde durch Valin, Alanin und Glycin substituiert, um die Entfernung der entsprechenden Seitenkette der Aminosäure zum parallel orientierten Benzaldehyd zu vergrößern und somit die Stabilisierung des *R*-Wegs zu verringern (Abbildung 3B). In allen drei Fällen zeigten die neuen Varianten eine verbesserte *S*-Selektivität für die Bildung von (*S*)-**1a** (Tabelle 1, Nr. 3–5). Unter ihnen erzielte die Drei-fachvariante E469G/T384G/I468A die besten Ergebnisse hinsichtlich *ee*-Wert (87%, *S*) und Umsatz (95%) unter Standardreaktionsbedingungen. Der hohe Umsatz ist besonders überraschend, da Mehrfachmutationen im aktiven Zentrum oftmals zu einer drastischen Abnahme der enzymatischen Aktivität führen, was bereits für andere ThDP-abhängige Enzyme gezeigt werden konnte.^[8]

Um die Stereoselektivität der Variante E469G/T384G/I468A weiter zu verbessern, wurde eine vierte Mutation in der Position des Tryptophans 543 eingeführt. W543 ist Teil der C-terminalen α -Helix, die den Eingang zum aktiven Zentrum von ApPDC bedeckt (Abbildung 3A), sowie eines aromatischen Clusters (für zusätzliche Details siehe Kapitel 2 der Hintergrundinformationen), das relevant für die Stabilität der Struktur des Enzyms sein könnte. Diese Position wurde einer ortsspezifischen Sättigungsmutagenese unter Verwendung der NDT-Codon-Degenerati-

on unterzogen. Nur wenige Varianten zeigten im Screening eine signifikante Aktivität für die Carboliogationsreaktion, jedoch waren alle aktiven Varianten *S*-selektiv für die Bildung von **1a**. Unter diesen Varianten offenbarte E469G/T384G/I468A/W543F eine verbesserte *S*-Selektivität für die Synthese von **1a** mit 95% *ee* und einem Umsatz von 36% (Tabelle 1, Nr. 6). Es wird angenommen, dass im Vergleich zu W543 der vergrößerte Abstand zwischen dem Phenylring des parallel orientierten Benzaldehyds und F543 (6.8 gegenüber anfänglich 3.7 Å) stabilisierende Wechselwirkungen verhindert (Abbildung 3B). Darüber hinaus wurden die physikochemischen Eigenschaften in Position 543 durch die Substitution des Tryptophans durch Phenylalanin beibehalten, was für die Erhaltung der Stabilität der Struktur der ApPDC-Variante, vermittelt durch das aromatische Cluster, förderlich sein könnte. Zusätzlich zur verbesserten *S*-Selektivität in der Homokupplungsreaktion von Benzaldehyd zeigte ApPDC-E469G/T384G/I468A/W543F ebenfalls eine verbesserte Stereoselektivität für die Synthese von (*S*)-2-HPP (>99% *ee*) ausgehend von Benzaldehyd als Donor und Acetaldehyd als Akzeptorsubstrat.

Um das Synthesepotenzial der neuen Varianten zu evaluieren, wurde ein Substrat-Screening mit ApPDC-E469G/T384G/I468A und ApPDC-E469G/T384G/I468A/W543F mit substituierten Benzaldehydderivaten unter optimierten Reaktionsbedingungen für die Synthese von (*S*)-**1a** (reduzierte Temperatur von 15 °C) durchgeführt (Tabelle 2). Bei diesem Screening stellte sich heraus, dass *meta*-substituierte Benzaldehydderivate für die Homokupplung die besten Ergebnisse hinsichtlich *S*-Selektivität und Umsatz vorwiesen. Mit Ausnahme von 3-Fluorbenzaldehyd (**1e**) wurden alle *meta*-substituierten Benzaldehyde (Tabelle 2, Nr. 5–9) mit höherer *S*-Selektivität als Benzaldehyd selbst (Tabelle 2, Nr. 1) umgesetzt. Dabei ergaben die Reaktionen mit der Variante E469G/T384G/I468A/W543F abermals die höheren *S*-Selektivitäten und geringen Umsätze als die mit der Variante E469G/T384G/I468A. Bemerkenswerterweise katalysiert E469G/T384G/I468A/W543F die enantiomerenreine Synthese von **1f–i** (>99% *ee* (*S*); Tabelle 2, Nr. 6–9). Diese Synthesere-

Tabelle 2: Synthese von Benzozinen (**1a–l**) katalysiert durch ApPDC-Varianten.^[a]

Nr.	Ar	Produkt	E469G/T384G/I468A		E469G/T384G/I468A/W543F	
			<i>ee</i> [%] ^[b]	Umsatz [%] ^[c] (Ausb. [%]) ^[d]	<i>ee</i> [%] ^[b]	Umsatz [%] ^[c] (Ausb. [%]) ^[d]
1	C ₆ H ₅	1a	89 (<i>S</i>)	92 (85)	98 (<i>S</i>)	26 (66)
2	2-FC ₆ H ₄	1b	58 (<i>R</i>)	36	21 (<i>R</i>)	<5
3	2-ClC ₆ H ₄	1c	75 (<i>R</i>)	<5	n.b.	k.U.
4	2-MeOC ₆ H ₄	1d	n.b. ^[e]	k.U. ^[f]	n.b.	k.U.
5	3-FC ₆ H ₄	1e	87 (<i>S</i>)	80 (82)	93 (<i>S</i>)	36
6	3-ClC ₆ H ₄	1f	91 (<i>S</i>)	97	>99 (<i>S</i>)	48 (72)
7	3-BrOC ₆ H ₄	1g	95 (<i>S</i>)	85 (84)	>99 (<i>S</i>)	30
8	3-IC ₆ H ₄	1h	96 (<i>S</i>)	30 (70)	>99 (<i>S</i>)	11
9	3-MeOC ₆ H ₄	1i	98 (<i>S</i>)	93	>99 (<i>S</i>)	58 (61)
10	4-FC ₆ H ₄	1j	64 (<i>S</i>)	53	85 (<i>S</i>)	<5
11	4-ClC ₆ H ₄	1k	>99 (<i>R</i>)	10	n.b.	k.U.
12	4-MeOC ₆ H ₄	1l	n.b.	<5	n.b.	k.U.

[a] Reaktionsbedingungen: siehe Tabelle 1, Reaktionstemperatur: 15 °C. [b,c] Siehe Tabelle 1. [d] Ausbeuten an isoliertem Produkt nach präparativer Synthese und Umsätzen >90% nach 24 bzw. 48 h (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 4 der Hintergrundinformationen). [e] Nicht bestimmt. [f] Kein Umsatz.

aktionen konnten vom analytischen Maßstab (300 μ L) in den präparativen Maßstab mit finalen Produktkonzentrationen von bis zu 4 g L⁻¹ (Ausbeuten an isoliertem Produkt von 61–85%; Tabelle 2) übertragen werden. Im Unterschied zu den *meta*-substituierten Benzaldehydderivaten wurden die *ortho*- und *para*-substituierten Benzaldehyde mit geringeren Umsätzen und, mit Ausnahme von 4-Fluorbenzaldehyd (**1j**; Tabelle 2, Nr. 10), mit einem Überschuss des *R*-Enantiomers umgesetzt.

Diese Befunde bestätigen unsere Beobachtungen aus jüngsten Studien der 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat-Synthase (MenD), dass *meta*-substituierte Benzaldehyde mit höherer *S*-Selektivität und höheren Umsätzen als *ortho*- und *para*-substituierte Benzaldehyde sowie unsubstituiertes Benzaldehyd transformiert wurden.^[8,9] Allerdings sind die Gründe für die Bevorzugung von *meta*-substituierten Benzaldehyden in der *S*-selektiven Carboligation und der Wechsel in der Stereoselektivität im Fall von *ortho*- und *para*-substituierten Benzaldehyden noch nicht bekannt. An dieser Stelle könnte die Kombination von sterischen und elektronischen Wechselwirkungen der Substrate mit der *S*-Tasche die Stereoselektivität beeinflussen. Die Aufklärung dieses Phänomens ist aktuell Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ermöglichte das rationale Design einer Hybridsubstratbindestelle, die die Charakteristika der aktiven Zentren der *S*-selektiven *ApPDC*-E469G-Variante und von *PfBAL* kombinierte, den Zugang zu einem neuen Biokatalysator für die Synthese verschiedener (*S*)-Benzozine mit exzellenten *ee*-Werten und guten Umsätzen ausgehend von kommerziell zugänglichen Benzaldehyden. Diese Befunde unterstreichen die Robustheit von ThDP-abhängigen Enzymen hinsichtlich von Mutationen im aktiven Zentrum sowie ihr enormes Potenzial für die asymmetrische Carboligation. Des Weiteren könnte der Hybridisierungsansatz das Feld der kombinatorischen Zusammenstellung Selektivitäts-bestimmender Module von unterschiedlichen ThDP-abhängigen Enzymen eröffnen und damit neue Perspektiven für die Thiaminkatalyse bezüglich des Designs von Varianten mit neuartigen katalytischen Eigenschaften bieten.

Experimentelles

Alle Chemikalien wurden von Sigma Aldrich bezogen. Die Benzaldehyde wurden vor Gebrauch frisch destilliert. Die Herstellung, Expression und Reinigung der *ApPDC*-Varianten ist in den Hintergrundinformationen beschrieben. Beschreibungen der Sequenz- und Strukturanalysen, Details zu den Reaktionen und Produktanalysen sind dort ebenfalls zu finden.

Eingegangen am 7. Mai 2014
Online veröffentlicht am 15. Juli 2014

Stichwörter: Asymmetrische Katalyse · Biokatalyse · C-C-Kupplungen · Enantioselektivität · Protein-Engineering

- [1] a) P. Hoyos, J. V. Sinisterra, F. Molinari, A. R. Alcantara, P. Domínguez de María, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 288–299; b) M. Brovetto, D. Gamenara, P. Saenz Méndez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [2] a) M. Müller, D. Gocke, M. Pohl, *FEBS J.* **2009**, *276*, 2894–2904; b) M. Müller, G. A. Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261–270; c) H. C. Hailes, D. Rother, M. Müller, R. Westphal, J. M. Ward, J. Pleiss, C. Vogel, M. Pohl, *FEBS J.* **2013**, *280*, 6374–6394.
- [3] a) A. S. Demir, M. Pohl, E. Janzen, M. Müller, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 633–635; b) M. C. Fragnelli, P. Hoyos, D. Romano, R. Gandolfi, A. R. Alcantara, F. Molinari, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 523–528.
- [4] A. S. Demir, A. Peruze, D. Umut, E. Umut, *J. Mol. Catal. B* **2008**, *55*, 164–168.
- [5] D. Enders, U. Kallfass, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1822–1824; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1743–1745.
- [6] a) A. S. Demir, T. Dünnwald, H. Iding, M. Pohl, M. Müller, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4769–4774; b) A. S. Demir, Ö. Sesenoglu, E. Eren, B. Hosrik, M. Pohl, E. Janzen, D. Kolter, R. Feldmann, P. Dünkelmann, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 96–103; c) P. Dünkelmann, D. Kolter-Jung, A. Nitsche, A. S. Demir, P. Siegert, B. Lingen, M. Baumann, M. Pohl, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12084–12085.
- [7] D. Rother (néé Gocke), G. Kolter, T. Gerhards, C. L. Berthold, E. Gauchenova, M. Knoll, J. Pleiss, M. Müller, M. Pohl, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1587–1596.
- [8] R. Westphal, D. Hahn, U. Mackfeld, S. Waltzer, M. Beigi, M. Widmann, C. Vogel, J. Pleiss, M. Müller, D. Rother, M. Pohl, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3587–3594.
- [9] R. Westphal, S. Jansen, C. Vogel, J. Pleiss, M. Müller, D. Rother, M. Pohl, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1082–1088.