

Enzymatische Polyketid-Kettenverzweigung zur Bildung substituierter Lacton-, Lactam- und Glutarimidheterocyclen**

Daniel Heine, Tom Bretschneider, Srividhya Sundaram und Christian Hertweck*

Professor Heinz G. Floss zum 80. Geburtstag gewidmet

Abstract: Polyketide werden typischerweise über die Kopf-Schwanz-Kondensation von Acyl-Thioestern gebildet, wobei hoch funktionalisierte lineare Ketten gebildet werden. Bei der Biosynthese des Phytotoxins Rhizoxin dagegen führt ein spezielles Polyketidsynthase(PKS)-Modul über die Michael-Addition einer Malonyleinheit an ein α,β -ungesättigtes Intermediat eine δ -Lacton-Kettenverzweigung ein. Um die Substratspezifität des Moduls zu testen, haben wir verschiedene Polyketidmimetika synthetisiert und in einem In-vitro-Assay mit dem rekonstituierten PKS-Modul aus dem *Rhizopus-Symbionten* *Burkholderia rhizoxinica* untersucht. Wir haben den Einfluss der δ -Substituenten und ihrer Konfiguration untersucht und festgestellt, dass aus Amino-substituierten Polyketidmimetika die entsprechenden Lactame gebildet werden. Das analoge Carbonsäureamid hingegen wird in ein Glutarimid überführt, eine Struktureinheit, die in zahlreichen Naturstoffen zu finden ist.

Polyketide umfassen eine beeindruckende Vielzahl von Naturstoffen, darunter zahlreiche medizinische Wirkstoffe. Ihre strukturelle Diversität resultiert in erster Linie aus der einfachen Kondensation aktivierter Acyl- und Malonylbausteine. Die resultierenden Polyketidketten werden durch weitere enzymkatalysierte Schritte, wie Cyclisierungen, Oxidationen, Halogenierungen oder auch Glycosylierungen, modifiziert.^[1] Beim Aufbau des Kohlenstoffrückgrats wurden hingegen nur sehr wenige Abweichungen von der üblicherweise unidirektional ablaufenden 1,2-Kondensation beobachtet; dabei können gerade diese seltenen Strukturen entscheidend für die biologische Aktivität des Polyketids sein. Ein Beispiel hierfür ist das antimitotisch wirksame Rhizoxin (1; Abbildung 1 A).^[2] Dieses Phytotoxin wird in einer Sym-

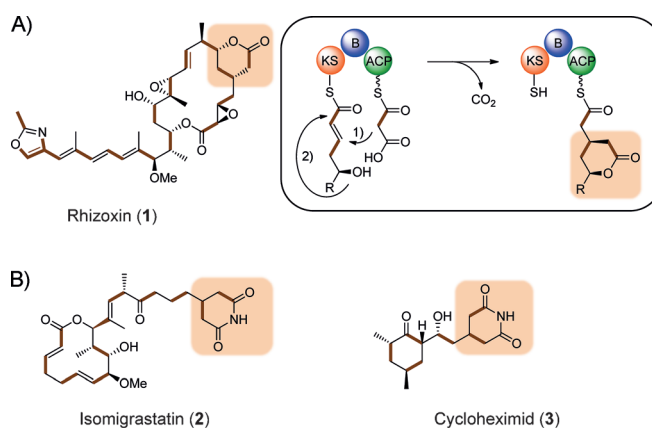


Abbildung 1. A) Struktur von Rhizoxin (1) und Mechanismus der vinylogenen Kettenverzweigung, katalysiert durch ein spezielles PKS-Modul; 1) Michael-Addition, 2) Lactonisierung. B) Strukturen von Isomigrastatin (2) und Cycloheximid (3) mit hervorgehobener Glutarimideinheit.

biose des pflanzenpathogenen Pilzes *Rhizopus microsporus* mit seinem bakteriellen Endosymbionten, *Burkholderia rhizoxinica*, gebildet.^[3] Die Struktur des Macrolids ist wegen seiner δ -Lactoneinheit, die am Polyketidrückgrat abzweigt, sehr ungewöhnlich. Doch gerade diese Kettenverzweigung ist essenziell für die Bindung des Rhizoxins an sein biologisches Target, die β -Tubulin-Untereinheit,^[4] wodurch die Zellteilung bereits im pikomolaren Konzentrationsbereich gehemmt wird.^[3b] Isotopenmarkierungsexperimente haben gezeigt, dass das δ -Lacton eine Acetyleinheit enthält, die in β -Position einer ehemaligen Carbonylgruppe in der Polyketidkette abzweigt (Abbildung 1 A).^[5]

Während Alkylsubstitutionen in α -Position durch Methylierung oder Einbau substituierter Malonyleinheiten eingeführt werden können,^[6] werden Verzweigungen in β -Position typischerweise über Enzyme eingebaut, die denen des Isoprenoidstoffwechsels ähneln.^[7] Überraschenderweise konnten wir keine entsprechenden Gene im Genom von *Burkholderia rhizoxinica* finden.^[8] Stattdessen lassen die Architektur der Rhizoxin(*rhi*)-Typ-I-Polyketidsynthase (*rhi*-PKS)^[9] und die Struktur isolierter Biosyntheseintermediate^[10] auf einen Kettenverzweigungsmechanismus unter Beteiligung einer Michael-Addition schließen. Zur Aufklärung des Enzymmechanismus haben wir das Verzweigungsmodul, bestehend aus einer Ketosynthase (KS), der Verzweigungsdomäne (B), dem Acyl-Carrier-Protein (ACP) und einer *trans*-Acyltransferase (AT), der *rhi*-PKS in vitro rekonstituiert. Mithilfe eines In-vitro-Enzymassays gelang es uns, synthetische Polyketidintermediate in die entsprechenden δ -Lactone zu überführen. Damit konnten wir zeigen, dass die pharma-

[*] D. Heine, T. Bretschneider, S. Sundaram, Prof. Dr. C. Hertweck
Abteilung Biomolekulare Chemie, Leibniz-Institut für Naturstoff-
Forschung und Infektionsbiologie (HKI)
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
E-Mail: christian.hertweck@hki-jena.de
Homepage: <http://www.hki-jena.de>
Prof. Dr. C. Hertweck
Lehrstuhl für Naturstoffchemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Studienstiftung des deutschen Volkes mit einem Stipendium für D.H. gefördert. Wir danken A. Perner für MS-Messungen und H. Heinecke für die Messung von NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407282> zu finden.

kophore Seitenkette über eine vinyloge Addition einer Malonyleinheit an einen α,β -ungesättigten Thioester eingeführt wird. Abschließend erfolgt die Lactonisierung (Abbildung 1A).^[11] Ähnliche Module sind im Biosynthese-Gencluster Glutarimid-haltiger Naturstoffe codiert, wie in Isomigrastatin (**2**),^[12] einem wichtigen Inhibitor der Zellmigration (Abbildung 1B). Wie auch im strukturell verwandten, antibiotisch aktiven Cycloheximid (**3**) spielt die Glutarimideinheit eine eminente Rolle für die biologische Aktivität dieser Verbindungen.^[13] Auch wenn eine enzymatische Michael-Addition zur Bildung der Glutarimidstruktur bereits vermutet wurde, blieben doch die verantwortlichen PKS-Module und deren genaue Wirkungsweise ungewiss, und ein experimenteller Nachweis steht noch aus. Hier zeigen wir, dass das *rhi*-PKS-Kettenverzweigungsmodul deutlich vielseitiger ist als bislang angenommen. Mithilfe eines In-vitro-Assays mit mehreren Enzymen und synthetischen Polyketidmimetika zeigen wir, dass das ungewöhnliche KS-B-ACP-Modul sogar in der Lage ist, die Bildung von Lactamen und Glutarimiden zu katalysieren.

Um einerseits die Substratspezifität des Rhizoxin-Kettenverzweigungsmoduls in einem Biotransformationsexperiment *in vitro* zu testen und andererseits den Umfang potenzieller Anwendungen ermitteln zu können, synthetisierten wir verschiedene Polyketidanaloga. Hierfür wurde eine Serie von in δ -Position funktionalisierten, α,β -ungesättigten *N*-Acetylcysteaminthioestern (SNACs) hergestellt, welche die aktivierten Intermediate imitieren sollen. Zuerst untersuchten wir den Einfluss der Konfiguration der δ -Position auf den Verlauf der Reaktion. Dazu synthetisierten wir die *R*- und *S*-Enantiomere des SNAC-Thioesters der 5-Hydroxyhexensäure aus den entsprechenden geschützten 3-Hydroxybuttersäureethylestern über eine Reduktions-Olefinierungs-Sequenz. Die stereoisomeren Verbindungen **4** und **5** wurden separat in einem In-vitro-Enzymassay getestet. Die gebildeten Produkte wurden über HPLC-HRMS analysiert und mit der authentischen Referenz, dem synthetischen δ -Lacton, verglichen (Abbildung 2). Überraschenderweise konnte bei beiden Experimenten die Bildung des verzweigten Produkts in lediglich einer diastereomeren Form nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Retentionszeiten und in Analogie zur natürlichen Biosyntheseroute schlussfolgerten wir, dass in beiden Fällen das *syn*-substituierte Produkt gebildet wurde.

Zur Untersuchung der stereochemischen Präferenz der KS in der Verzweigungsreaktion haben wir die kinetischen Parameter bestimmt. Im Falle des *R*-Enantiomers ermittelten wir einen K_M -Wert von $(2694 \pm 627) \mu\text{M}$ und einen v_{max} -Wert von $(20.9 \pm 2.4) \mu\text{M min}^{-1}$. Im Unterschied dazu ergab sich bei der Nutzung des *S*-Enantiomers ein K_M -Wert von $(1348 \pm 315) \mu\text{M}$ und ein v_{max} -Wert von $(2.1 \pm 0.3) \mu\text{M min}^{-1}$. Daraus lässt sich erkennen, dass die Affinität der KS zum nichtnatürlichen *R*-Enantiomer auf etwa die Hälfte reduziert ist, wohingegen die Umsetzungsrate dieses Substrats gegenüber jener des *S*-Enantiomers zehnmal niedriger ist. Dies zeigt, dass die KS grundsätzlich nicht zwischen den beiden Konfigurationen der δ -Hydroxygruppe unterscheidet, die Lactonisierung aber im Falle des nichtnatürlichen Substrats deutlich langsamer abläuft. Wir konnten daraus schließen, dass die Abfolge aus Michael-Addition und Lactonisierung aus-

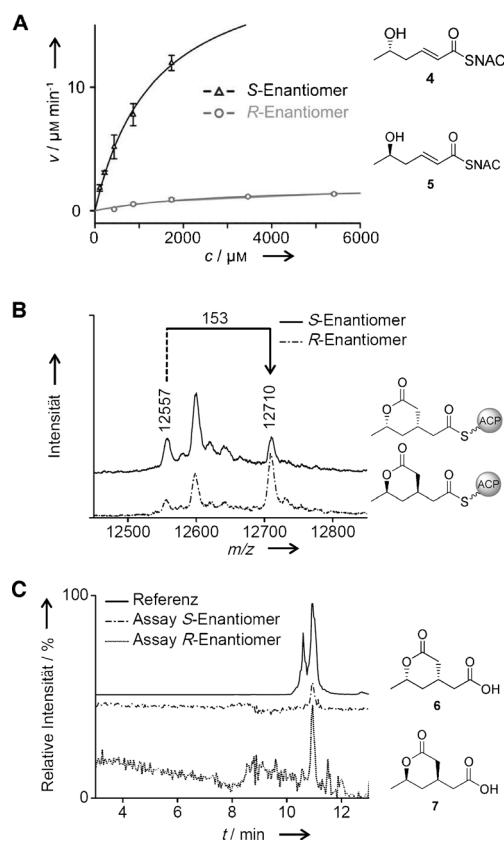


Abbildung 2. Vinyloge Kettenverzweigung der reinen *R*- und *S*-Enantiomere des *N*-Acetylcysteaminthioesters der 5-Hydroxyhexensäure mit anschließender Lactonbildung. A) Kinetik der Biotransformation nach Michaelis-Menten; B) MALDI-Analyse des ACP-gebundenen Produkts (mittleres Signal entspricht der malonylierten ACP-Spezies in decarboxylierter Form); C) SIM-HRMS-Analyse des hydrolysierten Produkts und Vergleich mit der synthetischen Referenz. SIM = selected ion monitoring.

schließlich *syn*-substituierte Lactone ergibt und dass die Konfiguration der Hydroxygruppe den stereochemischen Verlauf der Reaktion bestimmt.

Zur Bestätigung des postulierten Reaktionsverlaufs synthetisierten und testeten wir das δ -Hydroxy-substituierte, vollständig gesättigte Substrat **8**, das wegen der fehlenden Doppelbindung keine Kettenverzweigung eingehen kann. Weiterhin wurde ein Phenolanalogon **10** hergestellt (Abbildung 3). Die aktivierten Malonyleinheiten und die Rhizoxin-Polyketid-Ketten-Mimetika wurden getrennt zum *in vitro* rekonstituierten PKS-Modul gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde sowohl durch MALDI-Analyse des ACP-gebundenen Produkts als auch durch hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) der Hydrolyseprodukte verfolgt. Wie erwartet ging der gesättigte Alkohol **8** keine Kettenverzweigungsreaktion ein. Dies bestätigt, dass die Michael-Addition der Bildung der Esterbindung vorausgeht. Außerdem zeigt dieses Experiment, dass die KS keine Claisen-Kondensation katalysiert, wenn ein vinyloger Angriff verhindert wird. Der Einsatz eines Phenolnucleophils anstelle des aliphatischen Alkohols führte nicht zum hypothetischen Produkt **11**. Diese Befunde zeigen eine hohe Spezifität des KS-B-ACP-Moduls auf.

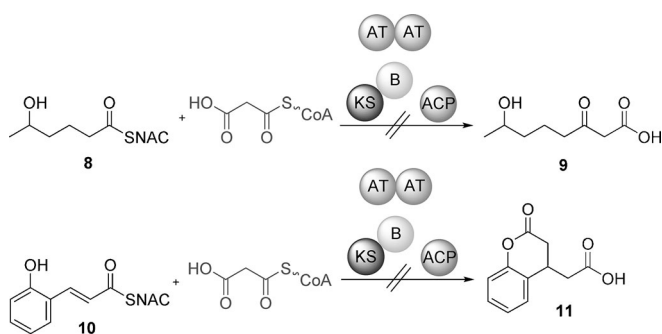


Abbildung 3. Untersuchung der Substrattoleranz des Verzweigungsmoduls gegenüber gesättigten und Phenolvarianten der synthetischen Polyketidsubstrate.

Als nächstes untersuchten wir, ob sich die nucleophile δ -Hydroxygruppe der Polyketidkette durch andere funktionelle Gruppen ersetzen lässt. Hierbei sollte hervorgehoben werden, dass die OH-Gruppe für die Freisetzung des KS-gebundenen Produkts durch Lactonisierung notwendig ist und damit eine weitere Prozessierung erst ermöglicht wird. Dennoch ist anzunehmen, dass auch andere nucleophile Gruppen die Thioesterbindung spalten können, was mit der Bildung alternativer Heterocyclen einhergehen würde. Falls alternative Substrate akzeptiert würden, könnte beispielsweise ein Lactam über Aminolyse entstehen. Um den Effekt einer Aminogruppe anstelle einer Hydroxygruppe zu untersuchen, synthetisierten wir ein δ -Aminoderivat des natürlichen Polyketidvorläufers. *N*-*tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-geschützter D,L-3-Aminobuttersäureethylester wurde mit Diisobutylaluminiumhydrid (DibalH) reduziert, und der Aminoaldehyd wurde direkt in einer Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)-Olefinierung umgesetzt. Nach erfolgter Entschützung wurde das gewünschte Amin **12** erhalten (siehe Hintergrundinformationen). Dieses synthetische Mimetikum des Polyketidinintermediates wurde im In-vitro-Assay eingesetzt, und die Produktbildung wurde mithilfe von HRMS untersucht. Die Bildung einer neuen Verbindung mit $m/z = 172.0966$ und einer Summenformel von $C_8H_{14}O_3N$ ($[M+H]^+$) wies auf die Bildung des gewünschten Produkts hin. Um die Identität des Lactams zu bestätigen, stellten wir eine synthetische Referenz her. Dazu wurde der geschützte D,L- β -Aminosäureethylester reduziert und einer HWE-Olefinierung unterzogen, was zur Bildung des substituierten α,β -ungesättigten Ethylesters führte. Eine Cäsiumcarbonat-katalysierte Michael-Addition von Diethylmalonat, gefolgt von einer sauren Hydrolyse, ergab das Lactam als Mischung von Diastereomeren (siehe Hintergrundinformationen). Der Vergleich der hochauflösten Massenspektren sowie der Retentionszeiten des Biotransformationsprodukts mit denen der synthetischen Referenz bestätigten die erfolgreiche Umsetzung von **12** zum Lactam **13**. Wir konnten beobachten, dass die Enzymreaktion hochselektiv erfolgt und in Analogie zur Bildung der δ -Lactone nur zu einem Diastereomer aus einer Mischung von Enantiomeren δ -Amino-substituierten Substraten führt. Wiederum wurde nur das (spät eluierende) *syn*-Diastereomer gebildet (Abbildung 4).

Die erfolgreiche Biotransformation des Aminoanalogons bestärkte uns, unseren Ansatz auf weitere funktionelle

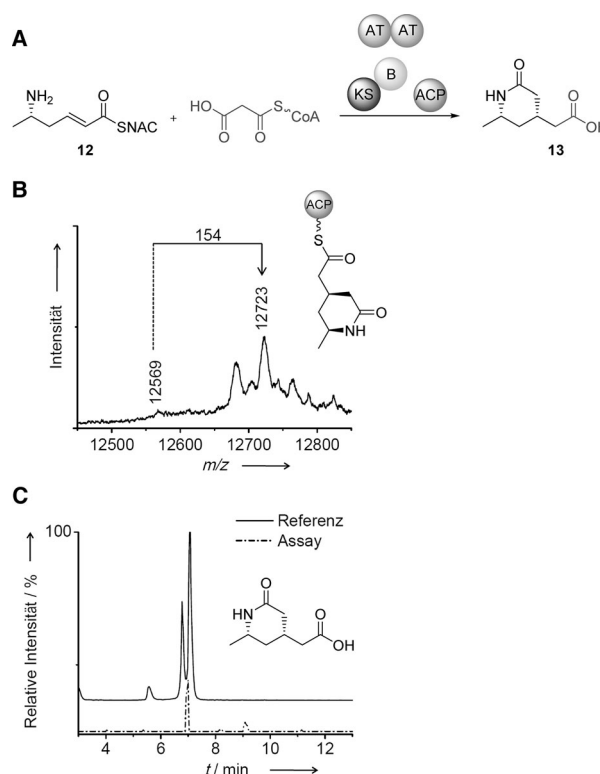


Abbildung 4. In-vitro-Biotransformation von Amino-substituierten Polyketidmimetika und Umsetzung zu Lactamen. A) Allgemeines Schema des Enzymassays; B) MALDI-Analyse des ACP-gebundenen Produkts; C) SIM-HRMS-Analyse des hydrolysierten Produkts und Vergleich mit der synthetischen Referenz (Mischung von Diastereomeren); nur eines der beiden Enantiomere ist dargestellt.

Gruppen, wie Carbonsäuren und Carbonsäureamide, zu übertragen. Grundsätzlich könnte ein Carboxylat in ein Anhydrid oder auch in eine Dicarbonsäure überführt werden. Analog könnte aus dem Carbonsäureamid ein Glutarimid, eine in zahlreichen Naturstoffen zu findende Struktureinheit, gebildet werden. Die Synthese von entsprechenden Carboxylat- und Amid-funktionalisierten SNAC-Thioestern gestaltete sich jedoch anspruchsvoller als zunächst erwartet. Zahlreiche Versuche zur Funktionalisierung der Glutaconsäure und HWE-basierte Ansätze führten nicht zum Ziel, möglicherweise wegen des reaktiven α -Protons in Allylstellung. Schließlich gelang die Synthese des gewünschten Polyketidinintermediats **14** und des analogen Amids **16** (siehe Hintergrundinformationen) über eine Alkenmetathese und die Nutzung von SNAC-Acrylat mit 3-Butensäure und 3-Butenamid. Die Zugabe des Carboxy-substituierten SNAC-Derivats **14** zum Enzymassay führte zur Ausfällung der Proteine. Eine Biotransformation konnte hierbei nicht beobachtet werden. Um die Möglichkeit eines pH-Effekts auszuschließen, wiederholten wir das Experiment unter genauer Einhaltung des pH-Werts mit Tris-Puffer auf pH 7.0. Allerdings konnten erneut weder das potenzielle Anhydrid **15** noch dessen Hydrolyseprodukt, die freie Tricarbonsäure, detektiert werden.

Im Unterschied dazu wurde das Carbonsäureamid **16** als Substrat für das Kettenverzweigungsmodul akzeptiert. Über

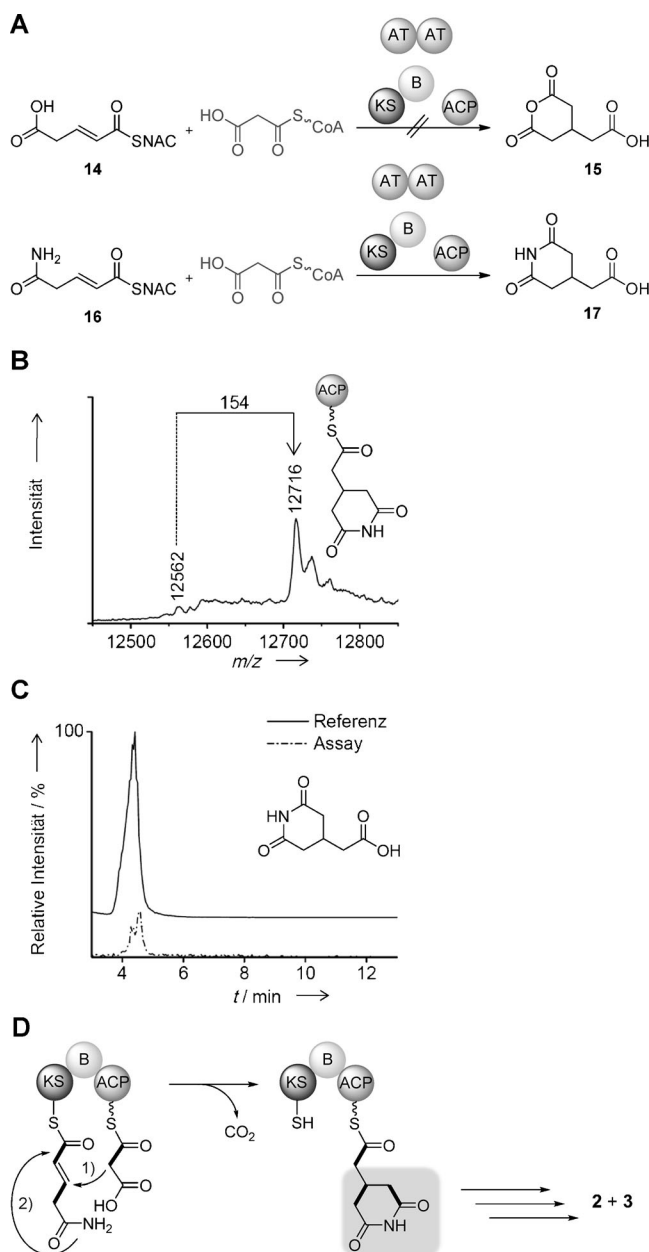


Abbildung 5. In-vitro-Biotransformationen von Polyketidmimetika mit Carboxy- und Carboxamidsubstituenten. A) Allgemeine Schemata der Enzymassays; B) MALDI-Analyse des ACP-gebundenen Glutarimids; C) SIM-HRMS-Analyse des hydrolysierten Glutarimids und Vergleich mit der synthetischen Referenz; D) vorgeschlagener Mechanismus der Biosynthese von Glutarimid-haltigen Polyketiden wie **2** und **3** (siehe Abbildung 1).

die Analyse der Enzymmischung detektierten wir ein MALDI-Signal, das dem ACP-gebundenen Glutarimid entspricht (Abbildung 5). Ebenso konnte das freigesetzte Produkt **17** nach saurer Hydrolyse mit einem HRMS-Signal von $m/z = 172.0610$ und einer Summenformel von $C_7H_{10}O_4N$ nachgewiesen werden. Die Identität des Glutarimids wurde schließlich eindeutig durch den Vergleich der Retentionszeit und des HRMS-Signals einer kommerziell erhältlichen Referenzsubstanz nachgewiesen (Abbildung 5). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit der hitzeinaktivierten KS-B-

Didomäne, die bestätigte, dass die vorliegende Reaktion tatsächlich enzymkatalysiert abläuft.

Unsere Befunde zeigen, dass das außergewöhnliche KS-B-ACP-Modul der *rhi*-PKS nicht nur auf die Lactonbildung beschränkt ist, sondern auch die Bildung von Lactamen und Glutarimiden katalysiert. Letztere sind besonders bemerkenswert, da verwandte Module (KS-, X“-ACP oder KS-B-ACP) in PKS gefunden wurden, die bei der Biosynthese von Glutarimid-haltigen Polyketiden, wie 9-Methylstreptimidon,^[14] Isomigrastatin^[12] oder Cycloheximid^[15] genutzt werden. Die enzymatische Synthese von Glutarimiden unter Nutzung der *rhi*-PKS-Module zeigt nun zum ersten Mal experimentell, dass der Reaktionsweg über eine Michael-Addition und anschließende Heterocyclisierung läuft.

Zusammengefasst liefern diese Befunde tiefere Einblicke in die Vielseitigkeit eines speziellen PKS-Moduls, das eine ungewöhnliche vinyloge Addition von C_2 -Einheiten katalysiert und damit Polyketid-Kettenverzweigungen einführt. Über die Synthese einer Reihe von alternativen Substraten mit unterschiedlicher Funktionalisierung an der δ -Position, In-vitro-Biotransformationsexperimenten und Produktanalysen mithilfe von synthetischen Referenzverbindungen konnten wir zeigen, dass das Kettenverzweigungsmodul Lactone, Lactame und auch Glutarimidheterocyclen generiert. Wir haben gezeigt, dass das Set der verschiedenen Domänen eine klare stereochemische Substratpräferenz aufweist und dass ausschließlich *syn*-substituierte Lactone und Lactame gebildet werden. Dennoch gestattet ein hohes Maß an Flexibilität zahlreiche alternative Umsetzungen. Die enzymatische Glutarimidbildung belegt die postulierten Biosynthesewege zu Glutarimid-haltigen Naturstoffen. Obgleich analoge δ -Lactamstrukturen unseres Wissens in natürlichen Polyketiden bisher noch nicht beobachtet wurden, postulieren wir das Auftreten solcher Biosyntheseschritte. Möglicherweise warten diese Naturstoffe erst noch auf ihre Entdeckung. In Bezug auf mögliche Anwendungen liefern unsere Befunde neue Einblicke in nichtterpenoide Polyketid-Kettenverzweigungen. Eine Nutzung des Kettenverzweigungsmoduls im Sinne der synthetischen Biologie oder des Engineerings enzymatischer Reaktionswege kann neue Möglichkeiten zur chemischen Diversifizierung eröffnen.

Eingegangen am 16. Juli 2014

Online veröffentlicht am 11. September 2014

Stichwörter: β -Kettenverzweigung · Biotransformation · Macrolide · Michael-Additionen · Polyketidsynthese

[1] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811.

[2] J. Hong, J. D. White, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5653–5681.

[3] a) L. P. Partida-Martinez, C. Hertweck, *Nature* **2005**, *437*, 884–888; b) K. Scherlach, L. P. Partida-Martinez, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11529–11536; c) L. P. Partida-Martinez, I. Groth, M. Roth, I. Schmitt, K. Buder, C. Hertweck, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 2583–2590; d) K. Scherlach, B. Busch, G. Lackner, U. Paszkowski, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9615–9618; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9753–9756.

- [4] a) M. Takahashi, S. Iwasaki, H. Kobayashi, S. Okuda, T. Murai, Y. Sato, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1987**, 926, 215–223; b) I. Schmitt, L. P. Partida-Martinez, R. Winkler, K. Voigt, A. Einax, J. Wöstemeyer, C. Hertweck, *ISME J.* **2008**, 2, 632–641; c) B. Kusebauch, K. Scherlach, H. Kirchner, H. M. Dahse, C. Hertweck, *ChemMedChem* **2011**, 6, 1998–2001.
- [5] H. Kobayashi, S. Iwasaki, E. Yamada, S. Okuda, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1702–1703.
- [6] a) Y. A. Chan, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 90–114; b) M. C. Wilson, B. S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 72–86.
- [7] a) C. T. Calderone, W. E. Kowtoniuk, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, P. C. Dorrestein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 8977–8982; b) C. T. Calderone, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 845–853.
- [8] a) G. Lackner, N. Moebius, L. P. Partida-Martinez, C. Hertweck, *J. Bacteriol.* **2011**, 193, 783–784; b) G. Lackner, N. Moebius, L. P. Partida-Martinez, S. Boland, C. Hertweck, *BMC Genomics* **2011**, 12, 210.
- [9] a) L. P. Partida-Martinez, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2007**, 8, 41–45; b) T. Nguyen, K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck, J. Piel, *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 225–233.
- [10] a) B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5001–5004; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5101–5104; b) B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1460–1464; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1502–1506.
- [11] T. Bretschneider, J. B. Heim, D. Heine, R. Winkler, B. Busch, B. Kusebauch, T. Stehle, G. Zocher, C. Hertweck, *Nature* **2013**, 502, 124–128; zugehörige Highlight-Artikel: C. A. Townsend, *Nature* **2013**, 502, 44–45; R. J. Cox, *ChemBioChem* **2014**, 15, 27–29.
- [12] S. K. Lim, J. Ju, E. Zazopoulos, H. Jiang, J. W. Seo, Y. Chen, Z. Feng, S. R. Rajsiki, C. M. Farnet, B. Shen, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 29746–29756.
- [13] S. R. Rajsiki, B. Shen, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1951–1954.
- [14] B. Wang, Y. Song, M. Luo, Q. Chen, J. Ma, H. Huang, J. Ju, *Org. Lett.* **2013**, 15, 1278–1281.
- [15] M. Yin, Y. Yan, J. R. Lohman, S. X. Huang, M. Ma, G. R. Zhao, L. H. Xu, W. Xiang, B. Shen, *Org. Lett.* **2014**, 16, 3072–3075.