

Strukturen und Biosynthese der Corvolether – Sesquiterpene aus dem Actinomyceten *Kitasatospora setae***

Patrick Rabe, Khomaizon A. K. Pahirulzaman und Jeroen S. Dickschat*

Abstract: Wir berichten über die funktionale Charakterisierung einer Sesquiterpencyclase aus *Kitasatospora setae*. Das Enzym konvertiert den Sesquiterpen-Vorläufer Farnesyldiphosphat (FPP) in zwei zuvor unbekannte und instabile Sesquiterpenether, für die wir die Trivialnamen Corvolether A und B vorschlagen. Beide Verbindungen wurden gereinigt und ihre Strukturen durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Ein Biosynthesemechanismus für die FPP-Cyclisierung durch die Corvolether-Synthase wurde vorgeschlagen. Die Ergebnisse aus Inkubationsexperimenten der Corvolether-Synthase mit isotopenmarkierten Vorläufern waren in Übereinstimmung mit diesem Mechanismus, wohingegen alternative Mechanismen ausgeschlossen werden konnten.

Terpenoide repräsentieren mit über 50 000 bekannten Verbindungen aus allen Lebensformen die größte Klasse von Sekundärmetaboliten. Ihre Biosynthese startet ausgehend von den linearen Vorläufern Geranyldiphosphat (GPP, Vorläufer der Monoterpene), Farnesyldiphosphat (FPP, Sesquiterpene) oder Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, Diterpene), die durch Terpencyclasen in Terpenkohlenwasserstoffe, -alkohole oder -ether umgesetzt werden. Diese Konversion verläuft über eine Substrationsierung durch Abstraktion des Diphosphats (Typ-I-Terpencyclasen) oder durch Protonierung (Typ-II-Enzyme), wodurch ein hochreaktives kationisches Intermediat entsteht, das anschließend in einer Dominoreaktion mit üblicherweise mehreren Elementarschritten weiterreagiert. Diese Schritte umfassen Cyclisierungsreaktionen durch intramolekularen Angriff einer olefinischen Doppelbindung an einem kationischen Zentrum, Hydrid- und Protonenwanderungen, Wagner-Meerwein-Umlagerungen sowie eine terminale Deprotonierung oder Angriff von Wasser.^[1,2] Da diverse Varianten dieser Reaktionen hinsichtlich ihrer sequenziellen Anordnung oder ihres stereo-

chemischen Verlaufs möglich sind, ist eine große Vielfalt an Kohlenstoffgerüsten zugänglich. Nach der Cyclisierung sind weitere Modifikationen durch Oxidationen, O-Acylierungen und Methylierungen möglich, die die ungewöhnliche Strukturvielfalt der natürlichen Terpenoide weiter erhöhen.

Die Kristallstrukturen von Terpencyclasen, insbesondere solcher im Komplex mit unreaktiven Substratsurrogaten, haben wichtige Einblicke in die Substratfaltung der linearen Vorläufer in den aktiven Zentren der Enzyme gegeben und dadurch Rückschlüsse auf die Mechanismen dieser faszinierenden Enzymklasse ermöglicht.^[3–10] Solche Kokristalle können den Anfangspunkt einer Terpencyclisierung visualisieren, die kationischen Intermediate und Elementarschritte entlang der Reaktionskaskade sind aber schwierig zu beobachten. Bis heute wurden die Produkte diverser bakterieller Terpencyclasen durch Inkubation des Substrats mit gereinigtem Enzym oder durch heterologe Expression charakterisiert.^[9–27] Hier berichten wir über die Klonierung und Expression einer Terpencyclase aus *Kitasatospora setae*, die Reinigung des Enzyms und die Strukturaufklärung der zwei Sesquiterpen-Produkte. Weiterhin präsentieren wir enzymmechanistische Untersuchungen auf der Basis von Isotopenmarkierungsstudien.

Das Genom von *K. setae* KM-6054 codiert neben der charakterisierten (2Z,6E)-Hedycaryol-Synthase^[9] und zwei Terpensynthasen mit vorausgesagten Funktionen als Geosmin-Synthase und 2-Methylisoborneol-Synthase^[28] zwei weitere putative Sesquiterpen-Synthasen mit unbekannten Produkten. Eines dieser Terpencyclase-Gene (Zugangsnummer YP_004903082) wurde in den Vektor pYE-Express, ein pET28-abgeleitetes Plasmid, das für die effiziente Klonierung durch homologe Rekombination in Hefe und für die heterologe Expression rekombinanter Enzyme mit einem His-Tag in *Escherichia coli* verwendet werden kann, eingebracht.^[25]

Während GGPP nicht als Substrat akzeptiert wurde, ergab die Inkubation des gereinigten Enzyms mit GPP kleine Mengen verschiedener acylischer und cyclischer Monoterpe- ne mit Linalool als Hauptprodukt (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen (SI)). Das native Substrat des Enzyms FPP wurde effizient in zwei Hauptprodukte überführt (Abbildung 1A). Ihre EI-Massenspektren (Abbildung S2) waren nicht in unseren MS-Bibliotheken enthalten und zeigten keine klaren Molekülionen bei m/z 204 oder m/z 222 wie sie gewöhnlich für Sesquiterpene beobachtet werden ($C_{15}H_{24}$ bzw. $C_{15}H_{26}O$). Detektierbare Fragmentationen bei m/z 179 wiesen auf ein Molekülion von m/z 222 hin (die Massendifferenz von 43 Da kann z.B. durch den Verlust einer Isopropylgruppe C_3H_7 erklärt werden, wohingegen eine Massendifferenz von 25 Da schwierig zu verstehen wäre). Übereinstimmend zeigte das CI-HRMS-Spektrum des

[*] P. Rabe, Prof. Dr. J. S. Dickschat
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: dickschat@uni-bonn.de

P. Rabe, Dr. K. A. K. Pahirulzaman, Prof. Dr. J. S. Dickschat
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch das Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften mit einem Promotionsstipendium an P.R. gefördert. Wir danken Kerstin Ibrom (Braunschweig) und Claus Schmidt (Bonn) für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201501119> zu finden.

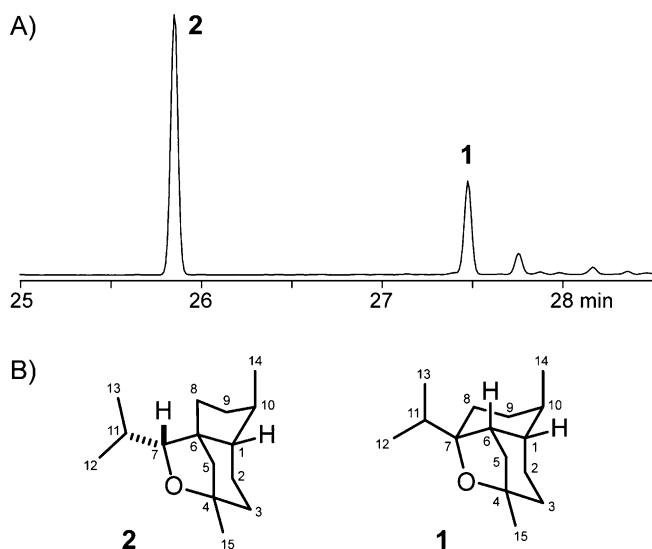


Abbildung 1. Produkte der Corvolether-Synthese aus *K. setae*. A) Totalionenstromchromatogramm der extrahierten Produkte aus einer Inkubation von FPP mit gereinigtem Enzym, B) Strukturen der Corvolether A (1) und B (2).

Hauptprodukts **2** Ionen bei m/z 223.20864 (berechnet für $C_{15}H_{27}O^+$, $[M+H]^+$: 223.20564) und m/z 240.23495 (berechnet für $C_{15}H_{30}NO^+$, $[M+NH_4]^+$: 240.23219). Spuren beider flüchtiger Terpene wurden überdies in einem ähnlichen Verhältnis (3:1) wie vom rekombinanten Enzym gebildet per GC/MS^[29] in Duftstoffextrakten von *K. setae* gefunden (Abbildung S3).

Die Trennung der zwei Enzymprodukte **1** und **2** durch Säulenchromatographie an Kieselgel erwies sich als schwie-

rig, da diese sehr ähnliche Polaritäten aufwiesen und instabil sind. Eine Mischung von 20 mg von **1** und **2**, erhalten aus einer Inkubation von 50 mg FPP mit gereinigtem Enzym aus 6 L einer *E. coli*-Kultur, ergab lediglich ca. 2 mg von **2** und weniger als 1 mg von **1**, während sich der Rest des Materials zersetzt hatte. Die Verwendung anderer üblicher Materialien für die Säulenchromatographie ergab keine besseren Ergebnisse (basisches Aluminiumoxid führte ebenfalls zur Zersetzung, und Florisil gab keine erfolgreiche Trennung). Die wiederholte Inkubation von drei 50-mg-Portionen an FPP mit frisch präpariertem Enzym gefolgt von sofortiger säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel unter Verwendung gekühlter Lösungsmittel (4°C, Pentan und Diethylether) lieferte letztlich 6.4 mg von **2** und 2.5 mg von **1**.

Die Strukturen beider Sesquiterpene wurden durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Die ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektren („distorsionless enhancement by polarisation transfer“) von **1** zeigten fünfzehn Kohlenstoffsignale (vier Methylgruppen, fünf Methylengruppen, vier Methin-Kohlenstoffe und zwei oxygenierte quartäre Kohlenstoffe, Tabelle 1). Keines dieser Signale erschien in der Region olefinischer Kohlenstoffe, was auf die Struktur eines tricyclischen Sesquiterpenethers hinwies. Die zugehörigen Signale der Protonen, die an die jeweiligen CH_3 -, CH_2 - und CH -Kohlenstoffe gebunden sind, wurden durch HSQC-Spektroskopie („heteronuclear single quantum correlation“) zugewiesen. Das 1H -NMR-Spektrum offenbarte zusammen mit dem 1H , 1H -Korrelationsspektrum (COSY) drei verbundene Spinsysteme (C-8-9-10-14, C-5-6-1-2-3 und C-12-11-13, Abbildung 2A) und eine an ein quartäres Kohlenstoff gebundene Methylgruppe (C-15), die im 1H , 1H -COSY-Spektrum Fernkopplungen zu H-5a und H-6 zeigte. Wegen der

Tabelle 1: NMR-Daten von Corvolether A (1) und B (2) in C_6D_6 .

1			2		
C ^[a]	1H (δ , m, J, int) ^[b]	^{13}C (δ) ^[c]	C ^[a]	1H (δ , m, J, int) ^[b]	^{13}C (δ) ^[c]
1	1.39 (m, 1 H)	39.9 (CH)	1	1.01 (ddt, $^4J=1.2$, $^3J=4.9$, 12.6, 1 H)	56.1 (CH)
2a	1.59 (dd, $^2J=8.7$, $^3J=5.5$, 1 H)	29.1 (CH ₂)	2a	1.56 (dddd, $^2J=13.2$, $^3J=5.2$, 5.2, 0.9, 1 H)	22.7 (CH ₂)
2b	1.61 (ddd, $^2J=8.7$, $^3J=5.2$, 0.8, 1 H)		2b	1.81 (dddd, $^2J=13.0$, $^3J=12.9$, 11.8, 5.8, 1 H)	
3a	1.35 (ddd, $^2J=12.9$, $^3J=8.7$, 8.3, 1 H)	39.1 (CH ₂)	3a	1.24 (ddd, $^2J=13.2$, $^3J=11.7$, 5.7, 1 H)	38.5 (CH ₂)
3b	1.69 (m, 1 H)		3b	1.64 (dddd, $^2J=13.1$, $^3J=5.8$, 1.3, $^4J=2.2$, 1 H)	
4		79.7 (C _q)	4		78.6 (C _q)
5a	1.15 (d, $^2J=11.4$, 1 H)	41.2 (CH ₂)	5a	1.21 (d, $^2J=10.4$, 1 H)	54.5 (CH ₂)
5b	1.82 (ddd, $^2J=11.4$, $^3J=5.0$, 2.4, 1 H)		5b	1.93 (dd, $^2J=10.4$, $^4J=2.4$, 1 H)	
6	1.99 (dd, $^3J=4.7$, 4.7, 1 H)	37.4 (CH)	6		53.3 (C _q)
7		86.2 (C _q)	7	3.31 (dd, $^3J=10.5$, $^4J=1.1$, 1 H)	93.7 (CH)
8a	1.72 (m, 2 H)	24.5 (CH ₂)	8a	1.48 (ddd, $^2J=14.1$, $^3J=9.4$, 6.2, 1 H)	28.8 (CH ₂)
8b			8b	1.52 (ddd, $^2J=14.0$, $^3J=11.9$, 4.7, 1 H)	
9a	0.83 (m, 1 H)	27.9 (CH ₂)	9a	1.14 (dddd, $^2J=13.3$, $^3J=12.0$, 10.0, 6.2, 1 H)	33.9 (CH ₂)
9b	1.74 (m, 1 H)		9b	1.87 (dddd, $^2J=13.3$, $^3J=9.3$, 8.2, 4.6, 1 H)	
10	1.42 (q, $^3J=7.0$, 1 H)	33.8 (CH)	10	1.73 (m, 1 H)	37.6 (CH)
11	1.75 (sept, $^3J=6.8$, 1 H)	36.8 (CH)	11	2.16 (dsept, $^3J=10.5$, 6.4, 1 H)	29.3 (CH)
12	1.11 (d, $^3J=6.8$, 3 H)	16.1 (CH ₃)	12	0.81 (d, $^3J=6.4$, 3 H)	20.0 (CH ₃)
13	0.78 (d, $^3J=7.0$, 3 H)	19.1 (CH ₃)	13	1.23 (d, $^3J=6.4$, 3 H)	22.5 (CH ₃)
14	0.87 (d, $^3J=7.0$, 3 H)	21.4 (CH ₃)	14	0.91 (d, $^3J=6.4$, 3 H)	19.2 (CH ₃)
15	1.29 (s, 3 H)	27.5 (CH ₃)	15	1.31 (s, 3 H)	26.8 (CH ₃)

[a] Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts wie in Abbildung 1 gezeigt. [b] Chemische Verschiebungen δ in ppm, Multiplizitäten m (s = Singulett, d = Dublett, m = Multipllett), Kopplungskonstanten nJ sind über n Bindungen und in Hertz angegeben, Integral (Anzahl der Protonen). [c] Zuordnungen der Kohlenstoffsignale (CH₃, CH₂, CH und C_q) wurden aus einem DEPT-Spektrum abgeleitet. Alle ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren von **1** und **2** sind in Abbildungen S4–S17 der Hintergrundinformationen gezeigt.

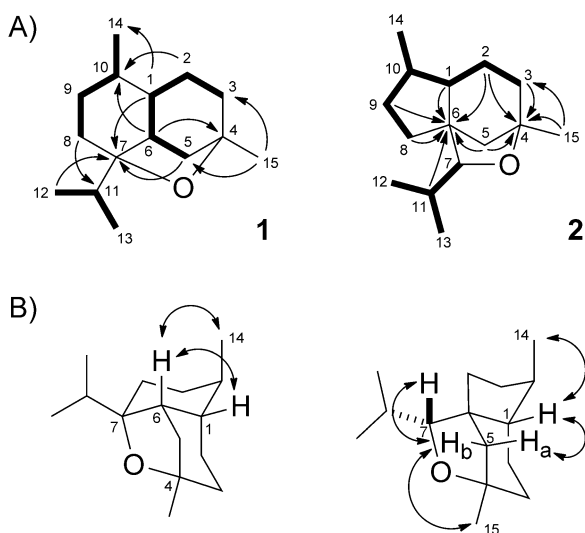


Abbildung 2. Strukturaufklärung von **1** und **2**. A) Spinsysteme von **1** und **2** bestimmt durch ¹H, ¹H-COSY (fett) und ausgewählte HMBC-Korrelationen über drei Bindungen (Pfeile). B) Schlüsselkorrelationen im NOESY (Pfeile), die die relativen Konfigurationen von **1** und **2** anzeigen.

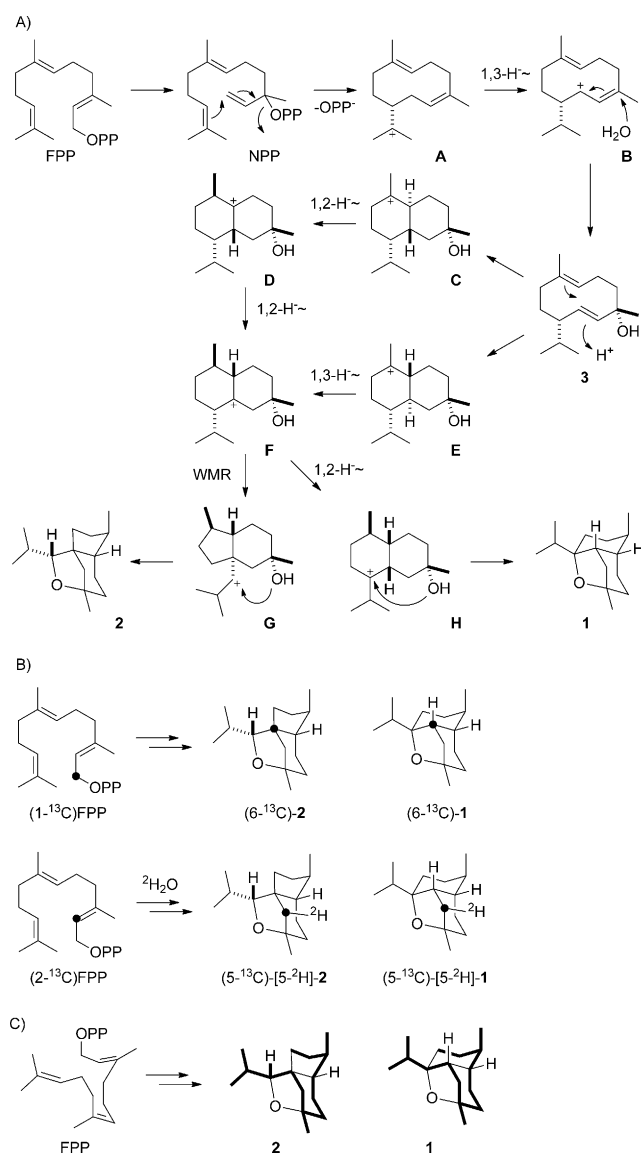
überlappenden Signale von H-1 und H-10 konnte eine Bindung zwischen den entsprechenden Kohlenstoffen nicht mit Sicherheit aus dem ¹H, ¹H-COSY-Spektrum abgeleitet werden und wurde daher aus dem HMBC-Spektrum („heteronuclear multiple bond correlation“) abgelesen (Abbildung 2A). Weiterhin wurden aus dem HMBC-Spektrum Korrelationen von C-6, C-8 und C-11 zum quartären C-7 und von C-3, C-5 und C-15 zum quartären C-4 abgeleitet. Die relative Konfiguration von **1** wurde durch Nuclear-Overhauser-Spektroskopie (NOESY) aufgeklärt. Schlüsselsignale zwischen H-6 und H-1 und zwischen H-6 und H-14 platzierten diese auf dieselbe Seite des Moleküls und etablierten somit das *cis*-Decalinsystem von **1** (Abbildung 2B). Die Etherbrücke zwischen C-4 und C-7 kann dann nur mit der gezeigten relativen Konfiguration realisiert werden. Alle anderen beobachteten NOESY-Korrelationen waren in Übereinstimmung mit der Struktur von **1**.

In Übereinstimmung mit der Bildung aus FPP zeigten die ¹³C- und DEPT-Spektren von **2** einen Aufbau des Kohlenstoffgerüsts aus fünfzehn sp³-Kohlenstoffen an (vier Methylgruppen, fünf Methylengruppen, vier Methin- und zwei quartäre Kohlenstoffatome, Tabelle 1). Eines der Methin- und eines der quartären Kohlenstoffatome ist an Sauerstoff gebunden, was wiederum die Struktur eines tricyclischen Sesquiterpenethers nahelegt. Die direkt angebotenen Wasserstoffatome wurden durch HSQC identifiziert. Die ¹H- und ¹H, ¹H-COSY-Spektren zeigten die Präsenz von zwei ausgedehnten Spinsystemen (C-8-9-10(-14)-1-2-3 und C-7-11(-12)-13, Abbildung 2A) plus je eine einzelne Methylen- (C-5) und Methylgruppe (C-15). Diagnostische HMBC-Korrelationen von C-1, C-5, C-7 und C-8 zum quartären Kohlenstoff C-6 und von C-3, C-5 und C-15 zum quartären C-4 gaben Einblick in die volle Planarstruktur von **2**. Schlüsselsignale im NOESY platzierten H-7, H-5b und H₃-15 auf derselben Seite

des Tetrahydrofuranrings, während eine Korrelation von H-5a nach H-1 die relative Konfiguration an C-1 etablierte. Die relative Konfiguration an C-10 wurde wiederum aus einer NOESY-Korrelation zwischen H-1 und H₃-14 abgeleitet, was ihre *syn*-Orientierung am Cyclopentanring demonstrierte. Die abgeleitete relative Konfiguration wurde durch einen Kreuzpeak zwischen H-1 und H-7 im ¹H, ¹H-COSY-Spektrum aufgrund einer W-Kopplung weiter gestützt.

Beide Sesquiterpenether sind neue Naturstoffe, und wir schlagen die Trivialnamen Corvolether A (**1**) und B (**2**) vor (nach einem Vorschlag des Arbeitsgruppenleiters nach dem Entdecker P. Rabe benannt, lat. Rabe = corvus). Verbindung **2** ist ein Sesquiterpenether mit neuartigem Gerüst, während über 4,7-Epoxy-5-hydroxymurolan, ein formales Oxidationsprodukt von **1**, aus *Fabiana imbricata* (Solanaceae) berichtet wurde.^[30] Ein plausibler Biosynthesemechanismus für die Corvolether-Synthese ist in Schema 1A gezeigt. Der Mechanismus startet mit der Isomerisierung von FPP zu NPP, gefolgt von einer 1,10-Cyclisierung zum Germacradienylkation (**A**). Eine anschließende 1,3-Hydridwanderung zu **B** und Angriff von Wasser ergibt das neutrale Intermediat Germacren-D-4-ol (**3**). Protonierung am originalen C-2 von FPP initiiert eine zweite Cyclisierung zu **C**, gefolgt von zwei sequenziellen 1,2-Hydridwanderungen über **D** zu **F**. Alternativ kann eine 1,3-Hydridwanderung diese zwei Schritte ersetzen, dies erfordert aber einen anderen stereochemischen Verlauf der Cyclisierung (zu **E**), um die korrekte Stereochemie in **F** auszubilden (man beachte, dass alle Hydridwanderungen suprafacial verlaufen müssen). Das Hauptprodukt Corvolether B (**2**) wird durch Wagner-Meerwein-Umlagerung mit Ringverengung zu **G** und intramolekularen Angriff der Alkoholfunktion am kationischen Zentrum gebildet. Wäre die Reaktion von **F** zu **2** ein konzertierter Prozess, könnte die Bildung des explizit gezeigten sekundären Kations **G** vermieden werden. Dies würde eine Inversion der Konfiguration verlangen, wodurch sich zwanglos die beobachtete relative Konfiguration in **2** ergäbe. Alternativ kann **F** durch eine weitere 1,2-Hydridwanderung zu **H** reagieren, woraus durch einen intramolekularen Angriff der Hydroxyfunktion **1** gebildet wird. Obwohl diese Schritte über das stabilere tertiäre Kation ablaufen, können auch diese terminalen Reaktionen konzertiert und mit Inversion der Konfiguration stattfinden.

Um den vorgeschlagenen Biosynthesemechanismus für die Cyclisierung von FPP zu **1** und **2** zu testen, wurden Inkubationsexperimente mit ¹³C-markierten Isotopologen von FPP durchgeführt (Schema 1B). Die Inkubation von (1-¹³C)FPP (für die Synthese siehe Schema S1) mit der Corvolether-Synthase ergab eine Mischung aus (6-¹³C)-**2** und (6-¹³C)-**1**, was eindeutig durch ¹³C-NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Abbildung 3A). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der Terpencyclisierung und schließt eine alternative Faltung des Vorläufers FPP wie in Schema 1C gezeigt aus. In einem zweiten Experiment wurde (2-¹³C)FPP mit der Corvolether-Synthase in einer 1:1-Mischung von Wasser und Deuteriumoxid inkubiert. Der zweite Cyclisierungsschritt ausgehend vom neutralen Intermediat **3** läuft nach unserem Vorschlag mit Protonierung an C-2 von FPP ab. Dieser Mechanismus ist



Schema 1. Biosynthese der Corvolether A und B. A) Vorgeschlagener Biosynthesemechanismus für die Bildung von **1** und **2** durch die Corvolether-Synthase. B) Inkubationsexperimente mit isotonenmarkierten Vorläufern. C) Alternative Faltung von FPP für die Cyclisierung zu **1** und **2**.

durch die Beobachtung eines Triplets für C-5 beider Produkte **1** und **2** aufgrund einer ^2H - ^{13}C -Kopplung im ^{13}C -NMR-Spektrum direkt nachgewiesen (Abbildung 3B).

Wir haben die Produkte einer Sesquiterpencyclase aus dem Actinomyceten *Kitasatospora setae* als Corvolether A und B charakterisiert. Ein vorgeschlagener Biosynthesemechanismus für ihre Bildung wurde durch Inkubationsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorläufern auf die Probe gestellt und ermöglichte den hochempfindlichen Nachweis diagnostischer Kohlenstoffatome per ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Die hier dargestellten Markierungstechniken gaben detaillierte Einblicke in die Elementarschritte des Mechanismus der Terpencyclisierung. Die komplementäre Verwendung von Deuteriummarkierungen in Kombination mit Massenspektrometrie ist eine interessante Alternative für mechanistische

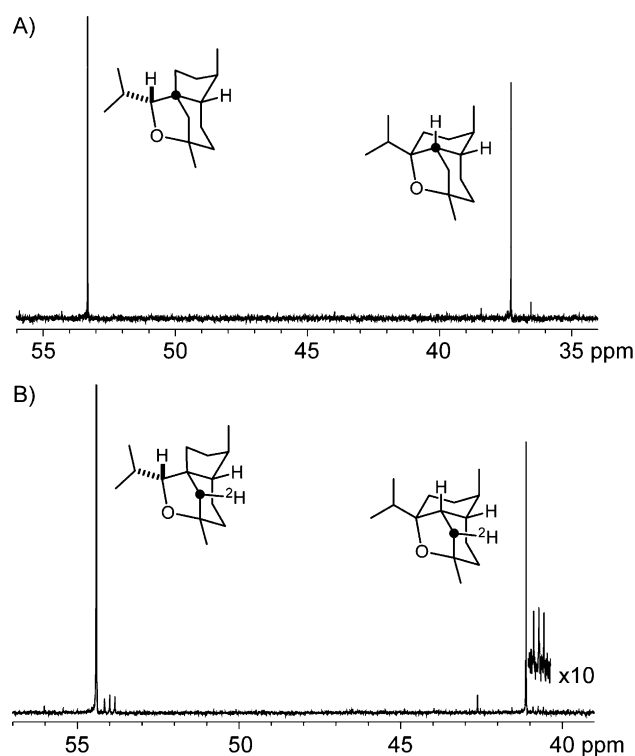


Abbildung 3. Analyse isotonenmarkierter Produkte **1** und **2** aus einer Inkubation von FPP-Isotopologen mit der Corvolether-Synthase.

Untersuchungen, z. B. um Epimerisierungsreaktionen in der Biosynthese nicht-ribosomaler Peptide zu verfolgen.^[31,32] Wir werden in Kürze über weitere mechanistische Studien an Terpencyclasen mit Isotopenmarkierungen berichten.

Stichwörter: Biosynthese · Enzymmechanismen · Isotopenmarkierung · NMR-Spektroskopie · Terpenoide

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6041–6045
Angew. Chem. **2015**, *127*, 6139–6143

- [1] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1917–1936.
- [2] „Biosynthesis of Terpenoids“: N. L. Brock, J. S. Dickschat in *Handbook of Natural Products* (Hrsg.: K. G. Ramawat, J.-M. Mérillon), Springer, Heidelberg, **2013**, S. 2693–2732.
- [3] C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*, 1815–1820.
- [4] C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *277*, 1820–1824.
- [5] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13543–13548.
- [6] E. Y. Shishova, L. Di Constanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1941–1951.
- [7] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787–1797.
- [8] M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature* **2011**, *469*, 116–120.
- [9] P. Baer, P. Rabe, C. A. Citron, C. C. de Oliveira Mann, N. Kaufmann, M. Groll, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 213–216.
- [10] P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7652–7656; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7783–7787.

- [11] D. E. Cane, J. K. Sohng, C. R. Lamberson, S. M. Rudnicki, Z. Wu, M. D. Lloyd, J. S. Oliver, B. R. Hubbard, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5846–5857.
- [12] X. Lin, R. Hopson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6022–6023.
- [13] J. Jiang, X. He, D. E. Cane, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 711–715.
- [14] C.-M. Wang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8908–8909.
- [15] S. A. Agger, F. Lopez-Gallego, T. R. Hoyer, C. Schmidt-Dannert, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 6084–6096.
- [16] M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7422–7427.
- [17] W. K. W. Chou, I. Fanizza, T. Uchiyama, M. Komatsu, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8850–8851.
- [18] Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson, D. E. Cane, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 32–37.
- [19] C. Nakano, M. H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1988–1991.
- [20] C. Nakano, M. H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2403–2407.
- [21] C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27980–27987.
- [22] C. Nakano, T. Tezuka, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 551–558.
- [23] C. Nakano, F. Kudo, T. Eguchi, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2271–2275.
- [24] P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1810–1812; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1855–1857.
- [25] J. S. Dickschat, K. A. K. Pahirulzaman, P. Rabe, T. Klapschinski, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 810–814.
- [26] A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 337–344.
- [27] Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 857–862.
- [28] C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 202–214.
- [29] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 838–861.
- [30] G. D. Brown, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 425–433.
- [31] H. B. Bode, D. Reimer, S. W. Fuchs, F. Kirchner, C. Dauth, C. Kegler, W. Lorenzen, A. O. Brachmann, P. Grün, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2342–2348.
- [32] B. Morinaka, A. L. Vagstad, M. J. Helf, M. Gugger, C. Kegler, M. F. Freeman, H. B. Bode, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8503–8507; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8643–8647.

Eingegangen am 5. Februar 2015
Online veröffentlicht am 24. März 2015