



Strukturaufklärung und Aktivität des aus einer riesigen nicht-ribosomalen Peptidsynthetase stammenden D-L-Pentadecapeptids Kolossin A**

Helge B. Bode,* Alexander O. Brachmann, Kirtikumar B. Jadhav, Lydia Seyfarth, Christina Dauth, Sebastian W. Fuchs, Marcel Kaiser, Nick R. Waterfield, Holger Sack, Stefan H. Heinemann und Hans-Dieter Arndt*

Professor Peter B. Dervan zum 70. Geburtstag gewidmet

Abstract: Es wird die bislang größte zusammenhängende bakterielle nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) beschrieben, die aus 15 konsekutiven Modulen besteht und aus einem einzigen voll funktionalen Gen des entomopathogenen Bakteriums *Photorhabdus luminescens* hervorgeht. Die Identifikation ihres kryptischen Biosynthetprodukts wurde mit Hilfe einer Kombination aus Genomanalyse, Promotoraus tausch, Isotopenmarkierung und Totalsynthese einer fokussierten Sammlung von Peptidkandidaten erreicht. Obwohl zur wachsenden Klasse der D-L-Peptid-Naturstoffe zählend, wies der produzierte Metabolit Kolossin A keine nennenswerte antibakterielle Aktivität auf und ist möglicherweise an einer Interspeziesinteraktion beteiligt. Ein Stereoisomer des ungewöhnlichen Naturstoffs zeigte hohe Aktivität gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense*, einen hartnäckigen Parasiten, der die tödliche afrikanische Schlafkrankheit verursacht.

Fortgeschrittene Sequenziertmethoden und bioinformatische Analysen haben die Untersuchung von unerforschten oder sogar unbekannten Verbindungen in der Naturstoffforschung möglich gemacht.^[1-4] Zur Bestimmung ihrer Konstitution sind Verbesserungen massenspektrometrischer (MS-)Methoden von großem Nutzen.^[5-8] Darüber hinaus ermöglichen Fortschritte bei der Gewinnung genomicscher Daten und deren Korrelation die Vorhersage der Konfiguration der Produkte

von Polyketidsynthetasen und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (PKSs und NRPSs) mit wachsender Zuverlässigkeit.^[9-11] Um allerdings mutmaßliche Biosyntheseprodukte auch für weitere Forschung zugänglich zu machen, müssen diese nach Fermentation im präparativen Maßstab isoliert werden. Sind nur analytische Mengen der Substanz zugänglich, gewinnt die chemische Synthese an Wichtigkeit, wenn die Identität, Konfiguration, Bioaktivität und Funktion der Produkte kryptischer Gencluster ermittelt werden sollen.

Besondere Herausforderungen stellen sehr große Gencluster, die nicht leicht in heterologen Wirten kloniert und überexprimiert werden können, genauso wie Produzenten mit einem komplexen Lebensstil, etwa Symbionten oder speziesselektive Pathogene. Wir beschreiben hier die Computer-gestützte Vorhersage des kryptischen Biosynthetproduktes Kolossin A (**1**) aus *Photorhabdus luminescens*, die induzierte Expression der zusammenhängenden 1.8-MDa-NRPS Kol sowie die eindeutige Bestätigung der Struktur (**1**) des formylierten D-L-Pentadecapeptidprodukts durch Markierungsexperimente und chemische Synthese, die auch eine Profilierung der Bioaktivität ermöglichte.

Im Genom des entomopathogenen Modellbakteriums *Photorhabdus luminescens* TTO1 wurden bereits verschiedene Gencluster charakterisiert, die mit der Biosynthese diverser Naturstoffe verknüpft sind.^[12,13] Darunter identifizier-

[*] Prof. Dr. H. B. Bode, Dr. A. O. Brachmann, Dipl.-Chem. C. Dauth, Dr. S. W. Fuchs
Merck-Stiftungsprofessur für Molekulare Biotechnologie
Goethe-Universität Frankfurt, Biozentrum
Campus Riedberg 250
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt/Main (Deutschland)
E-Mail: h.bode@bio.uni-frankfurt.de

Dr. K. B. Jadhav, Dr. L. Seyfarth, Prof. Dr. H.-D. Arndt
Friedrich-Schiller-Universität
Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
Humboldtstraße 10, 07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: hd.arndt@uni-jena.de

Prof. Dr. H. B. Bode
Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften (BMLS),
Goethe-Universität Frankfurt (Deutschland)

Dr. M. Kaiser
Schweizerisches Tropen- und Public-Health-Institut
Parasiten-Chemotherapie, Basel (Schweiz)

Dr. N. R. Waterfield
University of Warwick, Warwick Medical School
Coventry (Großbritannien)
Dipl.-Phys. H. Sack, Prof. Dr. S. H. Heinemann
Zentrum für Molekulare Biomedizin/Biophysik
Friedrich-Schiller-Universität Jena und
Universitätsklinikum Jena (Deutschland)

[**] Wir danken dem DAAD (Doktorandenstipendium für K.B.J.) für Unterstützung. Diese Arbeit profitierte in Teilen von Mitteln des TMBWK (Zuwendung Nr. 43-5572-321-12040-12 an H.-D.A.), der DFG (SFB 1127, an H.-D.A.) und der Europäischen Kommission („ERC starting grant“ Nr. 311477 für H.B.B.). Wir danken Dr. O. Makarewicz (UKJ Jena) für die Durchführung von antibakteriellen Aktivitätstests.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502835> zu finden.

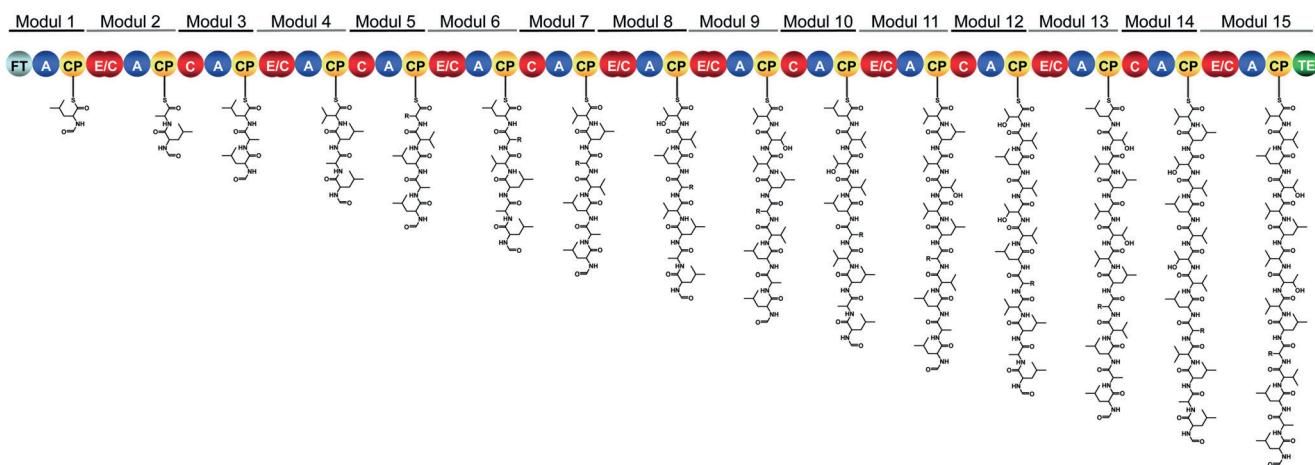


Abbildung 1. Modell der für die Biosynthese von Kolossin A (**1**) verantwortlichen NRPS Kol mit 15 konsekutiven Modulen. Domänen: C: Kondensation, E/C: diale Epimerase/Kondensation, A: Adenylierung, T: Thiolierung, TE: Thioesterase, FT: Formyltransferase, CP: Peptidylträgerprotein.

ten wir das Gen *kol* (*plu2670*, 49.1 kbp), das für die größte (uns bekannte) einzelne NRPS bakteriellen Ursprungs mit einer abgeschätzten Molekularmasse von 1.81 MDa codiert (Kol) – der Größe nach vergleichbar mit dem bakteriellen Ribosom. Eine detaillierte Analyse ergab 15 NRPS-Module mit 45 Domänen (Abbildung 1), weshalb Kol ein Pentadecapeptid produzieren sollte.^[14] Allerdings gelang es uns nicht, ein solches Peptid unter verschiedenen Fermentationsbedingungen im Labor nachzuweisen. Dabei wurde *P. luminescens* sogar in Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* kultiviert, um den natürlichen Lebenszyklus von *Photorhabdus* nachzuvollziehen (Daten nicht gezeigt). Ebenso zeigte Transkriptomanalyse mittels RNAseq keine signifikante Aktivierung des Gens *kol*, weder in exponentieller oder in stationärer Wachstumsphase noch in Gegenwart von Hämolymphe aus der Insektenlarve (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Es gelang, den „stillen“ Gencluster durch einen kürzlich vorgestellten Promotor austausch^[15] am *kol*-Gen zu aktivieren, was zum Nachweis dreier neuer Biosyntheseprodukte durch HPLC/MS-Überprüfung führte (Abbildung 2). Allerdings ermöglichen die geringen Mengen an Material keine detaillierte chemische Analyse oder Strukturaufklärung. Summenformeln und auch Aminosäuresequenzen ließen sich jedoch aus MS"-Experimenten ableiten (Abbildung 1, Tabellen S3 und S4, Abbildung S2). Diese Daten wiesen auf die hydrophobe Verbindung **1** als das vollständige Kolossin A

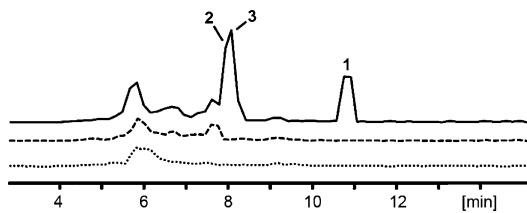


Abbildung 2. HPLC/MS-Chromatogramme der Metaboliten aus *P. luminescens* Wildtyp (····), pCEP-kol ohne (----) und mit Arabinoseinduktion (—). Abgebildet sind extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) der *m/z*-Werte von **1-3** (Tabelle S3).

sowie auf Kolossin B (**2**) und Kolossin C (**3**) als C-terminale Abbruchfragmente hin. Die Konfiguration aller stereogenen Zentren wurde ausgehend von der Gegenwart dualer Kondensations- und Epimerisierungsdomänen^[16,17] in Kol vorhergesagt, die eine voll alternierende D-L-Konfiguration anzeigt, mit Ausnahme zweier konsekutiv D-konfigurierter Aminosäuren Val⁷ und Thr⁸ (Tabelle S5). Damit ordnet sich Kolossin A unter die seltenen linearen D-L-Peptidnaturstoffe ein, wie Gramicidin A,^[18] Feglymycin^[19] oder die Polytheonamide,^[20] die alle eine Neigung zur Bildung β-helikaler Strukturen sowie häufig potente Bioaktivität zeigen. Interessanterweise konnten kürzlich mit den Xenoamicinen ähnliche, hydrophobe D-L-Depsipeptide in *Xenorhabdus* gefunden werden, jedoch keinerlei lineare Derivate.^[21]

Um die Aktivität der C/E-Domänen in der NRPS Kol und damit die höchst relevante Konfiguration des Biosyntheseproduktes zu prüfen^[18-20] wurden Markierungsexperimente mit voll deuteriertem Alanin, Valin, Leucin, Tyrosin und Threonin in einer *ΔilvE*-Mutante aus *P. luminescens* durchgeführt.^[8] Der Verlust eines Deuteriumatoms in Tyrosin und Threonin (Abbildungen S2 und S4) zeigte an, dass zumindest die auf die Einbaudomänen von Tyr und Thr folgenden C/E-Domänen funktional waren und dass somit beide Thr-Reste D-konfiguriert sein sollten. Die Aminotransferasereaktion für Leu und Ile ist in der *ΔilvE*-Mutante gestört, sodass mit ihr auch die Epimerisierung dieser Aminosäuren untersucht werden kann. Tatsächlich wurde der Einbau eines L- und eines D-Leucins in die Abbruchprodukte **2** und **3** gefunden, was den Vorschlag der Konfiguration weiter stützte.

Die Konfiguration der β-substituierten Thr-Reste war mithilfe der Isotopenmarkierung nicht zugänglich. Um die wahrscheinliche Struktur abzusichern und um Material für Bioaktivitätstests bereitzustellen, war ein Zugang zu synthetischem Kolossin A nötig. Um auch die Identität der Verbindung per LC-MS eindeutig zu validieren und um biologische Studien zu komplementieren, wurde die chemische Synthese von Stereoisomeren angegangen. Dafür wurde eine neungliedrige Sammlung von Kolossin-A-Analoga durch

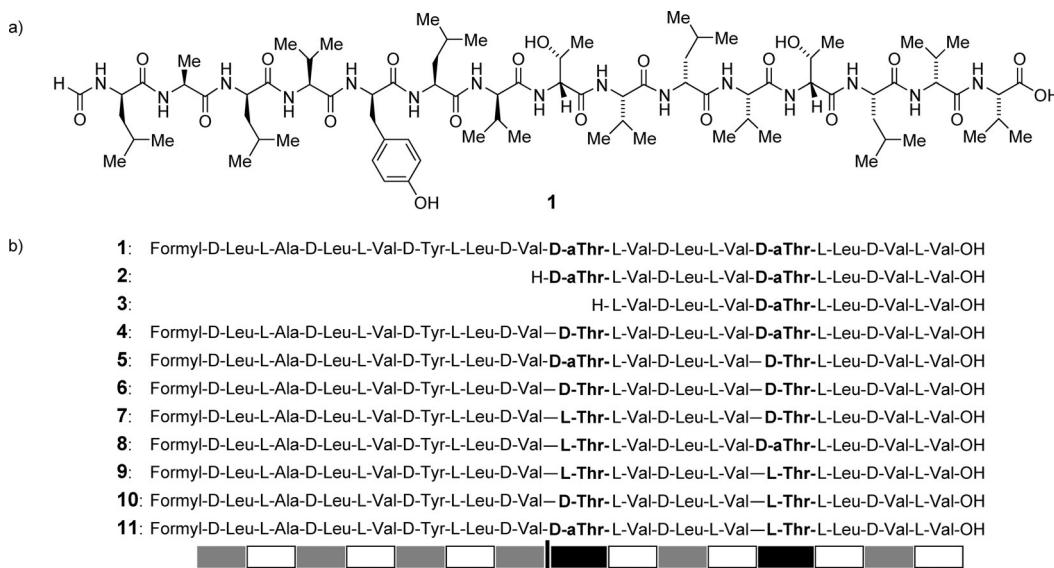


Abbildung 3. a) Strukturformel von Kolossin A (1). b) Sequenzen der Naturstoffe 1–3 und der untersuchten Isomere 4–11. Variierte Positionen (Reste 8 und 12) und der Wechsel der Rückgratkonfiguration zwischen D (grau) und L (weiß) sind markiert, ebenso die irreguläre Fortsetzung zwischen Position 7 und 8; aThr steht für *allo*-Threonin.

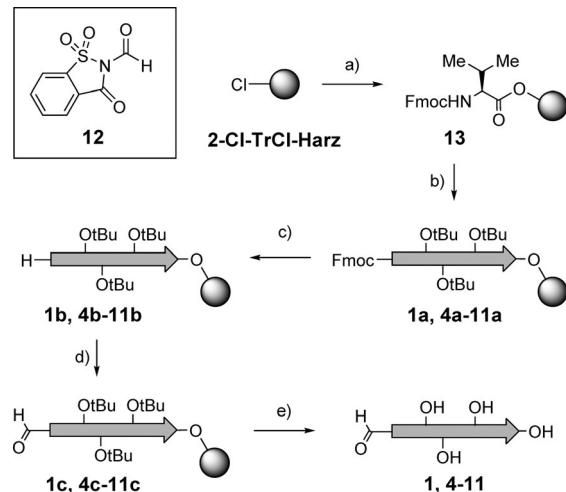
Permutationen von D-*allo*-Thr, D-Thr und L-Thr an den Positionen 8 und 12 entworfen (Abbildung 3).

Alle Stereoisomere wurden unabhängig mithilfe Fmoc-basierter Festphasensynthese (SPPS)^[22] an 2-Chlortriylchloridharz synthetisiert.^[23] Die Peptide wurde unter Nutzung eines Peptidsyntheseautomaten vom C- zum N-Terminus hin aufgebaut (Schema 1). Umfangreiche, von Präzedenz mit schwierigen lipophilen D-L-Peptiden ausgehende Experimente^[24,25] führten zu einer optimierten Synthesevorschrift, die aus Kupplungsszyklen beschleunigter Fmoc-Entschützungen, HBTU-vermittelter Kupplungen in DMF und systematischen „Cappings“ bestand (Schema 1). Die Ausgangsbeladung des Harzes **13** betrug 0.4 mmol g⁻¹. Konventionelle N-terminale Formylierung voll entschützter D-L-Peptide in Lösung oder mithilfe von Standardreagentien^[26] am Harzgebundenen Peptid führte zu unreinen Produkten, offensichtlich wegen mangelnder Chemoselektivität und schwieriger Abtrennung von Nebenprodukten. Die Formylierung des harzgebundenen, seitenkettengeschützten Peptids gelang selektiv an der terminalen Aminogruppe durch Umsetzung mit Saccharinomiat (**12**) in THF.^[27] Die rohen Peptide wurden anschließend vom festen Träger unter optimierten Bedingungen abgespalten, die die N-terminale Formylgruppe intakt ließen, um so die entsprechenden Kolossin-A-Analoga **1** und **4–11** in > 90% Rohausbeute zu erhalten. Niedrige Löslichkeit und Aggregation, die diese Peptide auszeichnen, wurden durch Auflösen in HFIP unmittelbar vor der Reinigung mittels RP-HPLC (C4-Säule, MeOH/H₂O, pH 3.5) überwunden. Im Mittel wurden so 20–23 mg der Kolossin-A-Analoga aus je 100 mg Harz in sehr hoher Reinheit mit exzellenten Gesamtausbeuten von 31–34% erhalten. Alle Verbindungen ließen sich voll durch NMR-Spektroskopie und Chromatographie charakterisieren und voneinander unterscheiden, obwohl sie nur in ihrer Seitenkettenchiralität verschieden sind. Mithilfe einer Kombination von HPLC/MS und Fragmentierungsanalyse ließen sich die chemische Struktur und

Konfiguration des kaum verfügbaren (μg) Naturstoffs klar mit **1** korrelieren, sodass die Struktur von Kolossin A und der Reste 8 und 12 jeweils als D-*allo*-Thr belegt wurde (Abbildung S5).

Bei biologischen Untersuchungen zeigten weder Kolossin A noch seine Isomere Zytotoxizität in L6-Rattenmyoblastenzellen oder antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*) oder Gram-negative Bakterien (*Escherichia*

coli wt, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). Um die oft mit D-L-Peptiden assoziierten Porenbildungseigenschaften in Membranen^[18–20] zu erforschen, wurden alle Kandidaten in einem „black lipid bilayer“-Testsystem untersucht. Keine der Verbindungen löste messbare Leitfähigkeit (< 1 μS) bei Badkonzentrationen von 1 μM aus (100 mM KCl, pH 8.0 Tris/HCl), während im Unterschied dazu Gramicidin A (gA) Leitfähigkeiten von 100 μS bei



Schema 1. Optimierte festphasengestützte Synthese von Kolossin-A-Analoga (1, 4–11). Reagentien und Bedingungen: a) Fmoc-L-Val-OH, EtN(iPr)₂, CH₂Cl₂, 16 h; b) Piperidin/DMF 1:3 + 2% DBU; c) Aminosäure *n* (0.40 M in DMF), HBTU, HOEt (0.42 M in DMF), EtN(iPr)₂ (2 M in DMF), 1 h; d) Ac₂O/Pyridin/CH₂Cl₂ = 1:1:4, Wiederholung von (b) für alle *n* = 14 → 1; e) **12** (gesättigt in THF), THF/EtN(iPr)₂ 9:1, 2 × 15 min; f) TFA/Et₃SiH/H₂O/CH₂Cl₂ = 70:7.5:7.5:15, 20°C, 1.5 h. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DMF = Dimethylformamid; Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, HBTU = O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOEt = 1-Hydroxybenzotriazol, HFIP = 1,1,1,3,3-Hexafluorpropan-2-ol, TFA = Trifluoressigsäure.

0.5 nm induzierte (Abbildung S6). Demzufolge sind allgemein porenbildende Eigenschaften der Kolossine 10⁶–10⁷-fach schwächer ausgeprägt als bei gA und könnten daher bei biologischen Konzentrationen nicht auftreten. Weitere Tests von **1** und **4–11** wurden in eukaryotischen Parasiten durchgeführt: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruci*, *Leishmania donovani* und *Plasmodium falciparum*.^[21,28] Für **8** wurde bemerkenswerte Aktivität gegen *T. brucei rhodesiense* festgestellt ($IC_{50} = 2.7 \mu\text{m}$), den Verursacher der afrikanischen Schlafkrankheit, weiter auch für **11** gegen *T. brucei r.* ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{m}$) und *P. falciparum* ($IC_{50} = 16.1 \mu\text{m}$), den Erreger von Malaria (Tabelle S6). Alle anderen Isomere sowie der Naturstoff selbst waren inaktiv.

Zusammengefasst wurde die bioinformatische Vorhersage eines NRPS-abgeleiteten Peptids mit stimulierter Überexpression, MS-Analyse, Markierungsexperimenten und Totalsynthese kombiniert, um die chemische Struktur und Konfiguration des Produktes Kolossin A aus einem gigantischen NRPS-Gencluster eindeutig zu belegen. Die schiere Größe des Gens *kol* und der NRPS Kol sowie die Menge an Vorläufern, Energie und Zeit, die für die Biosynthese benötigt wird, lassen auf eine wichtige biologische Rolle der Kolossine schließen. Porenbildende Eigenschaften wurden nicht festgestellt, im Einklang mit der Unterbrechung der regulären D-L-Konfiguration entlang des Rückgrats, und der Produzent *P. luminescens* reagierte nicht auf die Verbindung. Da die Produktion von Kolossin bei Kultivierung im Labor nicht ausgelöst werden konnte, weisen unsere Befunde klar darauf hin, dass die Produktion von Kolossin eines speziellen Signalfaktors bedarf, der möglicherweise mit dem Wirtinsekt oder einer spezifischen Stufe seines Lebenszyklus verknüpft ist. Wir fanden, dass das nicht-natürliche Isomer **8** spezifische Aktivität gegen *T. brucei rhodesiense* zeigte, dessen durchwegs tödliche Infektionen, wenn Sie nicht behandelt werden, ein schwerwiegendes Gesundheitsproblem im subsaharischen Afrika darstellen. Weitergehende Untersuchungen widmen sich der Verfolgung dieser vielversprechenden Aktivität sowie deren möglicher Verknüpfung mit der schwer fassbaren endogenen Funktion von Kolossin im produzierenden Bakterium *P. luminescens*.

Stichwörter: Biologische Aktivität · Biosynthese · Naturstoffe · Peptide · Totalsynthesen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10352–10355
Angew. Chem. **2015**, *127*, 10493–10496

- [1] A. O. Brachmann, F. Kirchner, C. Kegler, S. C. Kinski, I. Schmitt, H. B. Bode, *J. Biotechnol.* **2012**, *157*, 96–99.
- [2] J. B. Biggins, X. Liu, Z. Feng, S. F. Brady, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1638–1641.
- [3] J. Piel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 431–453.
- [4] K. Yamanaka, K. A. Reynolds, R. D. Kersten, K. S. Ryan, D. J. Gonzalez, V. Nizet, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1957–1962.
- [5] R. D. Kersten, Y.-L. Yang, Y. Xu, P. Cimermancic, S.-J. Nam, W. Fenical, M. A. Fischbach, B. S. Moore, P. C. Dorrestein, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 794–802.
- [6] R. D. Kersten, P. C. Dorrestein, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 599–601.

- [7] S. W. Fuchs, C. C. Sachs, C. Kegler, F. I. Nollmann, M. Karas, H. B. Bode, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6948–6955.
- [8] C. Cregler, F. I. Nollmann, T. Ahrendt, F. Fleischhacker, E. Bode, H. B. Bode, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 826–828.
- [9] M. H. Medema, R. van Raaphorst, E. Takano, R. Breitling, *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 191–202.
- [10] K. Blin, M. H. Medema, D. Kazempour, M. A. Fischbach, R. Breitling, E. Takano, T. Weber, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W204–12.
- [11] A. O. Brachmann, H. B. Bode, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2013**, *135*, 123–155.
- [12] E. Duchaud et al., *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1307–1313.
- [13] a) H. B. Bode, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 224–230; b) J. Yin, H. Zhu, L. Xia, X. Ding, T. Hoffmann, M. Hoffmann, X. Bian, R. Müller, J. Fu, A. F. Stewart, Y. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e36.
- [14] Die Biosynthese des D-L-Pentadecapeptids Gramicidin A durchläuft vier genetisch unabhängige NRPS-Module: N. Kessler, H. Schumann, S. Morneweg, U. Linne, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7413–7419.
- [15] E. Bode, A. O. Brachmann, C. Kegler, R. Simsek, C. Dauth, Q. Zhou, M. Kaiser, P. Klemmt, H. B. Bode, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1115–1119.
- [16] 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.
- [17] T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5775–5787.
- [18] a) R. Sarges, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2020–2027; b) D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 672–676; c) R. R. Ketcham, W. Hu, T. A. Cross, *Science* **1993**, *261*, 1457–1460.
- [19] a) G. Bunkóczki, L. Vértesy, G. M. Sheldrick, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1340–1342; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1364–1366; b) F. Dettner, A. Hänchen, D. Schols, L. Toti, A. Nusser, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1856–1861; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1888–1893.
- [20] a) T. Hamada, S. Matsunaga, G. Yano, N. Fusetani, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110–118; b) M. Inoue, N. Shinohara, S. Tanabe, T. Takahashi, K. Okura, H. Itoh, Y. Mizoguchi, M. Iida, N. Lee, S. Matsuoka, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 280–285.
- [21] Q. Zhou, F. Grundmann, M. Kaiser, M. Schiell, S. Gaudriault, A. Batzer, M. Kurz, H. B. Bode, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16772–16779.
- [22] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247–3256.
- [23] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943–3946.
- [24] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2076–2078; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2137–2140; b) H.-D. Arndt, D. Bockelmann, A. Knoll, S. Lamberth, C. Griesinger, U. Koert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4062–4065; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4234–4238.
- [25] a) R. J. Lichtenegger, B. Ellinger, H.-M. Han, K. B. Jadhav, S. Baumann, O. Makarewicz, M. Grabenbauer, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2492–2499; b) K. B. Jadhav, R. J. Lichtenegger, A. Bullach, B. Mandal, H.-D. Arndt, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 5898–5908.
- [26] a) L. I. Krimen, *Org. Synth.* **1970**, *50*, 1–2; b) G. H. Zayia, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 989–991; c) A. R. Katritzky, H.-X. Chang, B. Yang, *Synthesis* **1995**, 503–505.
- [27] T. Cochet, V. Bellosta, A. Greiner, D. Roche, J. Cossy, *Synlett* **2011**, 1920–1922.
- [28] F. Grundmann, M. Kaiser, M. Kurz, M. Schiell, A. Batzer, H. B. Bode, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22072–22077.

Eingegangen am 27. März 2015
 Online veröffentlicht am 26. Juni 2015