

Konformationsanalyse, thermische Umlagerung und EI-MS-Fragmentierungsmechanismus von (1(10)*E*,4*E*,6*S*,7*R*)-Germacradien-6-ol durch ¹³C-Markierungsexperimente

Patrick Rabe, Lena Barra, Jan Rinkel, Ramona Riclea, Christian A. Citron, Tim A. Klapschinski, Aron Janusko und Jeroen S. Dickschat*

Abstract: Eine uncharakterisierte Terpenzyklase aus *Streptomyces pratensis* wurde als (+)-(1(10)*E*,4*E*,6*S*,7*R*)-Germacradien-6-ol-Synthase identifiziert, deren Produkt als zwei ineinander konvertierbare Konformere existiert, wodurch komplexe NMR-Spektren resultieren. Für eine komplette Zuordnung der NMR-Daten wurden alle fünfzehn Isotopomere des (¹³C₁)FPP sowie (¹³C₁₅)FPP synthetisiert und enzymatisch umgesetzt und die Produkte durch diverse NMR-Methoden einschließlich ¹³C, ¹³C-COSY analysiert. Die (¹³C)FPP-Isotopomere wurden weiterhin für die Untersuchung der thermischen Umlagerung und des EI-Fragmentierungsmechanismus des Enzymprodukts verwendet.

Terpenoide sind hinsichtlich Struktur und Funktion faszinierende Naturstoffe. Die ersten aus Bakterien beschriebenen Verbindungen sind die erdig bzw. muffig riechenden Duftstoffe Geosmin und 2-Methylisoborneol,^[1] die in den 1960er Jahren aus Streptomyceten isoliert wurden. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen, dass Terpene in diesem Taxon besonders weit verbreitet sind.^[2] Ihre Biosynthese startet ausgehend von einem linearen Oligoprenyldiphosphat, das durch eine Terpenzyklase in einer Reaktionskaskade über kationische Intermediate in einen (poly-)cyclischen Kohlenwasserstoff oder Alkohol mit meist mehreren Stereozentren überführt wird. Kristallstrukturen von Terpenzyklasen^[3] zeigten, dass spezifische Reste im aktiven Zentrum einen dreikernigen (Mg²⁺)₃-Cluster binden, der seinerseits die Diphosphatgruppe des Substrats bindet und die Ionisierung zu einem hochreaktiven Kation initiiert. Hydrophobe Reste formen eine Schablone, die das Substrat für eine gerichtete Produktbildung in eine spezifische Konformation zwingt und Wasser von der Kavität ausschließt, um ein vorzeitiges Abfangen reaktiver Intermediate zu verhindern. Die Produkte diverser bakterieller Terpenzyklasen wurden bereits charakterisiert,^[3g,4] und unser strukturbasiertes mechanistisches Verständnis wurde durch quantenchemische Rechnungen,^[4s,5] ortsgerichtete Mutagenese^[3g,h,4c,6] und Isotopenmarkierungsstudien^[4b,g,q,7] substantiell erweitert. Hier berichten wir über

die Konformationsanalyse, thermische Umlagerung und EI-MS-Fragmentierung (EI-MS = Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie) eines Sesquiterpenalkohols aus *Streptomyces pratensis* mittels ¹³C-Markierungstechniken.

Das Genom von *S. pratensis* ATCC 33331 kodiert fünf Terpenzyklasen, von denen vier durch ihre hohe Homologie zu den Synthasen für Geosmin,^[4c] 2-Methylisoborneol,^[4fg] 7-*epi*-α-Eudesmol^[4hn] und *epi*-Cubenol^[4i] unmittelbar zugeordnet werden können, in Übereinstimmung mit der Produktion dieser Terpene durch das Bakterium.^[2a] Das Gen der fünften uncharakterisierten Terpenzyklase (Zugangsnummer ADW03055, diese Zykase weist das Aspartat-reiche Motiv ⁸⁶DDEYCD und die NSE-Triade ²²⁷NDLVSYHKE auf) wurde durch homologe Rekombination in Hefe in den Expressionsvektor pYE-Express kloniert.^[4o] Das gereinigte Protein konvertiert Farnesyldiphosphat (FPP) in (1(10)*E*,4*E*)-Germacradien-6-ol (**1**), das durch GC/MS identifiziert wurde (Abbildung 1), wohingegen Geranyl- und Geranylgeranyldiphosphat nicht akzeptiert werden. Zwei Produkte der Cope-Umlagerung von **1** (**2a** und **2b**), die aufgrund der thermischen Belastung während der GC-Analyse entstehen, wurden ebenfalls beobachtet (Massenspektren von **1**, **2a** und **2b** sind in Abbildung 1 der Hintergrundinformationen (SI) gezeigt). Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **1** in CDCl₃ bei Raumtemperatur zeigten breite und schlecht aufgelöste Signale (Abbildung 2 der SI), während die bei –50 °C

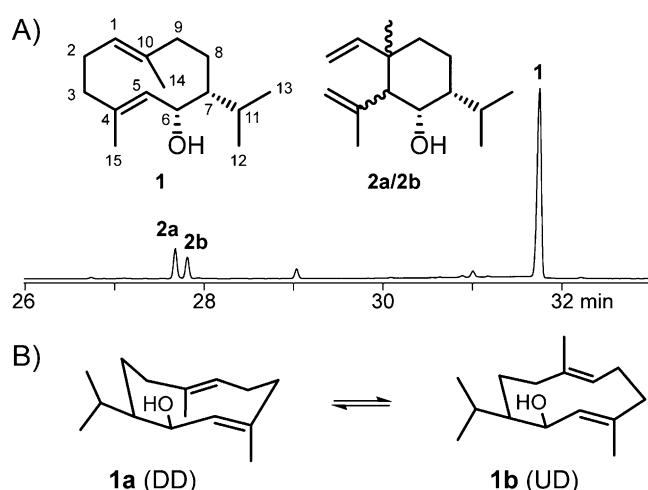


Abbildung 1. A) Totalionenstromchromatogramm der Produkte der (1(10)*E*,4*E*,6*S*,7*R*)-Germacradien-6-ol-Synthase (**1**) aus *S. pratensis*, B) Strukturen der Konformere **1a** und **1b**.

[*] P. Rabe, L. Barra, J. Rinkel, Dr. R. Riclea, Dr. C. A. Citron, T. A. Klapschinski, A. Janusko, 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

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507615> zu finden.

und bei 0°C aufgenommene Spektren zwei Sätze scharfer Signale für die bekannten Konformere **1a** und **1b** lieferten (in Abbildung 1 durch die „up-down“-Nomenklatur benannt; U und D: Methylgruppe zeigt nach oben bzw. unten).^[8] Die NMR-Daten stimmten mit literaturbekannten, aber unvollständigen Daten für (–)-**1** aus *Santolina rosmarinifolia* überein,^[8a] während die optische Aktivität von $[\alpha]_D^{24} = +21.4$ auf das Enantiomer zur pflanzlichen Verbindung schließen ließ ($[\alpha]_D^{20} = -14.8$), sodass das Terpen aus *S. pratensis* als (+)-(1(10)*E*,4*E*,6*S*,7*R*)-Germacradien-6-ol identifiziert wurde. Die absolute Konfiguration des pflanzlichen **1** wurde jüngst durch Totalsynthese bestätigt.^[9] Im Gegensatz zu den Produkten der anderen Terpenzyklen wird **1** nicht in Laborkulturen von *S. pratensis* gefunden (nicht gezeigt).

Die komplexen NMR-Spektren verhinderten wie in einem vorherigen Bericht^[8a] eine vollständige Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale zu **1a** und **1b**. Um dieses Problem zu lösen, wurden alle fünfzehn (¹³C₁)FPP-Isotopomere synthetisiert (Abbildungen 3–6 der SI)^[10] und mit der Germacradienol-Synthese umgesetzt. Die einzelnen Produkte wurden mit (²H₈)Toluol extrahiert und per ¹³C-NMR-Spektroskopie analysiert, wodurch je zwei starke Signale für die markierten Kohlenstoffatome der Konformere **1a** und **1b** resultierten (Abbildung 7 der SI). Diese Daten zeigten eindeutig auf, welches ¹³C-NMR-Signal von **1** zu welchem Kohlenstoff gehört, es war aber nicht möglich zuzuordnen, welches der in jedem einzelnen Experiment beobachteten zwei ¹³C-NMR-Signale zu welchem Konformer gehört. Daher wurde komplett markiertes (¹³C₁₅)FPP synthetisiert und mit der Germacradienol-Synthese inkubiert, und das Produkt wurde per ¹³C,¹³C-COSY-NMR untersucht.^[11] Dieses Experiment lieferte zwei diskrete Sätze von Kreuzpeaks (Abbildung 2, für eine vergrößerte Version siehe Abbildung 8 der

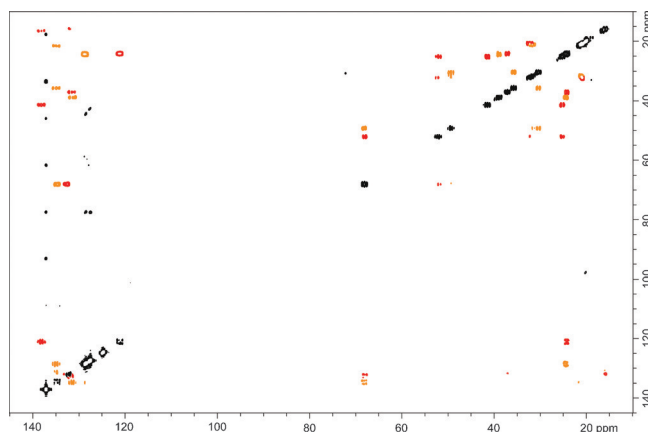


Abbildung 2. ¹³C,¹³C-COSY-Spektrum von (¹³C₁₅)-**1** nach enzymatischer Umsetzung von (¹³C₁₅)FPP. Die zwei Sätze der Kreuzpeaks für die Konformere sind gelb (für **1a**) und rot (für **1b**) dargestellt.

SI), die eine eindeutige Zuordnung aller 30 Kohlenstoffsignale zu jedem einzelnen der fünfzehn Kohlenstoffatome von **1a** und **1b** erlaubten (Tabelle 1). Die Zuordnung der meisten ¹H-NMR-Verschiebungen war auf Basis der ¹H,¹H-COSY-, HSQC- und HMBC-Korrelationen der unmarkierten Verbindung möglich (Abbildung 3). Für einige wenige Fälle erwiesen sich darüber hinaus die HSQC-Spektren der relevanten Isotopomere von (¹³C₁)-**1** als nützlich (Abbildung 9 der SI).

Für die Strukturaufklärung der zwei Produkte der Cope-Umlagerung, die in der GC/MS-Analyse von **1** beobachtet worden waren, wurde eine Mikrowellenreaktion bei 225°C in Toluol durchgeführt. Die Produkte konnten durch Säulenchromatographie getrennt werden und erwiesen sich hin-

Tabelle 1: NMR-Daten der Konformere **1a** und **1b** von (1(10)*E*,4*E*,6*S*,7*R*)-Germacradien-6-ol in (²H₈)Toluol bei –50°C und von **2a/2b** in (²H₆)Benzol bei 25°C^[a].

1 + 2	1a (DD)		1b (UD)		2a		2b		
C ^[a]	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	
1	CH 4.80 (d, <i>J</i> = 11.6, 1 H)	129.0	4.87 (t, <i>J</i> = 7.5, 1 H)	121.5	5.78 (dd, <i>J</i> = 17.5, 10.8, 1 H)	150.3	5.85 (dd, <i>J</i> = 17.6, 10.8, 1 H)	150.2	
2	CH ₂ 2.17 (m, 1 H)	24.8	2.24 (m, 1 H)	24.6	4.98 (dd, <i>J</i> = 17.5, 1.2, 1 H, <i>E</i>)	110.1	4.90 (dd, <i>J</i> = 17.6, 0.8, 1 H, <i>E</i>)	110.4	
	1.95 (m, 1 H)		1.89 (m, 1 H)		4.94 (dd, <i>J</i> = 10.8, 1.2, 1 H, <i>Z</i>)		4.86 (dd, <i>J</i> = 10.8, 0.8, 1 H, <i>Z</i>)		
3	CH ₂ 2.04 (m, 1 H)	39.2	2.09 (m, 1 H)	37.5	5.02 (br s, 1 H, <i>Z</i>)	113.3	4.90 (br s, 1 H)	113.9	
	2.00 (m, 1 H)		1.94 (m, 1 H)		4.91 (br s, 1 H, <i>E</i>)		4.70 (br s, 1 H)		
4	C _q –	131.8	–	132.0	–	146.8	–	145.5	
5	CH 5.06 (d, <i>J</i> = 7.0, 1 H)	135.1	5.04 (d, <i>J</i> = 8.5, 1 H)	133.0	1.69 (d, <i>J</i> = 1.7, 1 H)	56.6	2.32 (d, <i>J</i> = 6.8, 1 H)	57.4	
6	CH 4.54 (d, <i>J</i> = 6.0, 1 H)	68.5	4.55 (d, <i>J</i> = 6.0, 1 H)	68.4	3.81 (br s, 1 H)	70.2	3.94 (m, 1 H)	71.9	
7	CH 0.75 (d, <i>J</i> = 9.0, 1 H)	49.7	0.66 (d, <i>J</i> = 9.5, 1 H)	52.5	0.74 (m, 1 H)	49.8	1.54 (m, 1 H)	44.6	
8	CH ₂ 1.95 (m, 2 H)	30.7	1.80 (m, 1 H)	25.6	1.63 (m, 1 H)	21.1	1.56 (m, 2 H)	22.3	
	1.39 (d, <i>J</i> = 13.8, 1 H)		1.30 (m, 1 H)		1.49 (m, 1 H)				
9	CH ₂ 2.44 (d, <i>J</i> = 13.1, 1 H)	36.1	2.14 (m, 1 H)	41.8	1.48 (m, 1 H)	41.1	1.53 (m, 1 H)	33.7	
	1.62 (t, <i>J</i> = 13.5, 1 H)		1.79 (m, 1 H)		1.29 (m, 1 H)		1.25 (m, 1 H)		
10	C _q –	135.3	–	138.5	–	40.2	–	30.3	
11	CH 1.78 (m, 1 H)	32.0	1.73 (m, 1 H)	32.6	1.68 (m, 1 H)	29.4	1.88 (oct, <i>J</i> = 6.8, 1 H)	27.4	
12	CH ₃ 1.00 (d, <i>J</i> = 6.0, 3 H)	21.4	1.09 (d, <i>J</i> = 6.3, 3 H)	21.2	0.92 (d, <i>J</i> = 6.8, 3 H)	20.8	0.94 (d, <i>J</i> = 6.8, 3 H)	21.9	
13	CH ₃ 1.05 (d, <i>J</i> = 6.5, 3 H)	21.6	1.00 (d, <i>J</i> = 6.0, 3 H)	21.3	0.94 (d, <i>J</i> = 6.9, 3 H)	21.3	1.20 (d, <i>J</i> = 6.6, 3 H)	23.1	
14	CH ₃ 1.55 (s, 3 H)	22.0	1.48 (s, 3 H)	16.9	1.46 (s, 3 H)	20.3	0.93 (s, 3 H)	23.1	
15	CH ₃ 1.32 (s, 3 H)	16.3	1.30 (s, 3 H)	16.2	1.72 (s, 3 H)	27.8	1.68 (s, 3 H)	26.8	

[a] Nummerierung der C-Atome wie in Abbildung 1. Chemische Verschiebungen δ in ppm, Multiplizitäten m (s = Singulett, d = Doublett, t = Triplett, oct = Octett, m = Multiplett, br = breit), Kopplungskonstanten *J* in Hz. Signalzuordnung für **1** abgeleitet aus Inkubationsexperimenten mit ¹³C-Isotopomeren des FPP (siehe Text).

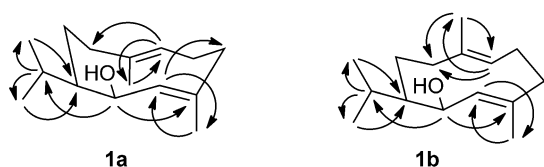


Abbildung 3. Schlüsselkorrelationen im HMBC, die eine Zuordnung der ^1H -NMR-Signale für unmarkiertes **1** erlauben.

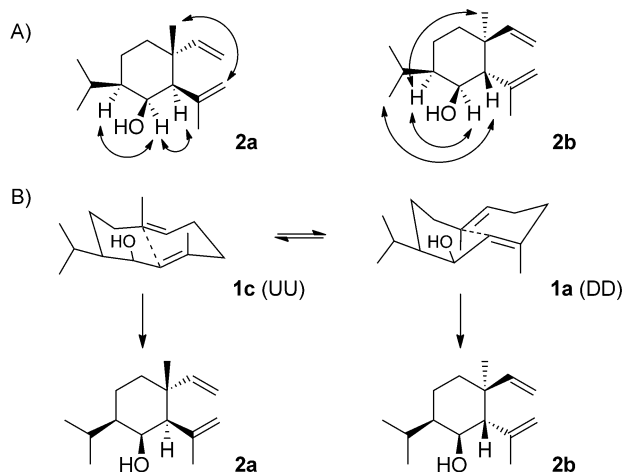


Abbildung 4. Cope-Umlagerung von **1**. A) Schlüsselkorrelationen im NOESY für die Bestimmung der relativen Konfigurationen von **2a** und **2b**, B) Konformationen von **1**, die die Bildung von **2a** und **2b** erklären.

sichtlich ihrer Massenspektren und GC-Retentionszeiten als identisch zu **2a** und **2b**. Ihre Strukturen wurden per ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie umfassend aufgeklärt (Tabelle 1), wodurch die Verbindungen als Shyobunol (**2a**) und 5,10-Di-*epi*-shyobunol (**2b**) identifiziert wurden.^[12] Die relativen Konfigurationen wurden auf Grundlage von Schlüsselsignalen im NOESY-Spektrum bestimmt (Abbildung 4A). Die Zuordnung der NMR-Daten wurde durch Cope-Umlagerung von enzymatisch aus ($^{13}\text{C}_{15}$)FPP erhaltenem ($^{13}\text{C}_{15}$)-**1** und Analyse des Produktgemischs per ^{13}C , ^{13}C -COSY-NMR bestätigt (Abbildung 10 der SI). Dies ermöglichte die Beobachtung von zwei diskreten Sätzen von Kreuzpeaks für **2a** und **2b** und gab direkte Einblicke in die C-C-Konnektivitäten. Die absoluten Konfigurationen von **2a** und **2b** können aus den Stereozentren an C-6 und C-7 von **1** abgeleitet werden, die durch die Cope-Umlagerung nach allem, was für Germacrane bekannt ist,^[13] nicht betroffen werden. Die hier aus Bakterien isolierten Stereoisomere des Shyobunols sind die Enantiomere zu aus der Pflanze *Acorus calamus* bekannten Verbindungen,^[12] was mit der Tatsache, dass auch bakterielles **1** der optische Antipode eines pflanzlichen Terpens darstellt, koinzidiert. Während **2b** aus dem bekannten Konformer **1a** hervorgeht,^[8a] ist die Bildung von **2a** aus dem „up-up“-Konformer **1c** (UU, Abbildung 4B) möglich. Beide Umlagerungsprodukte entstehen über sesselartige Übergangszustände, ähnlich wie es für die Cope-Umlagerung anderer Germacrane bekannt ist.^[8b, 14]

Die relativen Konfigurationen von **2a** und **2b** unterstützen die *syn*-Orientierung der Hydroxy- und Isopropylgruppen in **1**. Tatsächlich sind die ^{13}C -NMR-Verschiebungen von **1** und seinem *anti*-Stereoisomer Kunzeaol^[15] sehr ähnlich (Tabelle 11 der SI), und die *syn*- oder *anti*-Orientierung der Substituenten in den konformativ flexiblen Verbindungen **1** und Kunzeaol^[15] schwierig zu bestimmen. Allerdings bewiesen die NOESY-Spektren der rigideren Verbindungen **2a** und **2b** eindeutig die *syn*-Anordnung von Hydroxy- und Isopropylgruppe, wodurch die relative Konfiguration von **1** indirekt bewiesen werden konnte.

Da isotoptenmarkierte Verbindungen für die Untersuchung von Fragmentierungsreaktionen sehr nützlich sind,^[16] wurden die aus allen fünfzehn Isotopomeren des (^{13}C)FPPs mit der Germacradienol-Synthese erhaltenen Produkte per GC/EI-MS und GC/EI-MS-QTOF analysiert. Die beobachteten Fragmentationen für alle Isotopomere von (^{13}C)-**1** (Abbildung 11 der SI) gaben direkte Einblicke in den Fragmentierungsmechanismus. Elektronstoßionisierung von **1** läuft bevorzugt unter Verlust eines nichtbindenden Elektrons am Sauerstoff ab, wodurch das Molekülion $[\text{M}]^+$ (Abbildung 5 A)

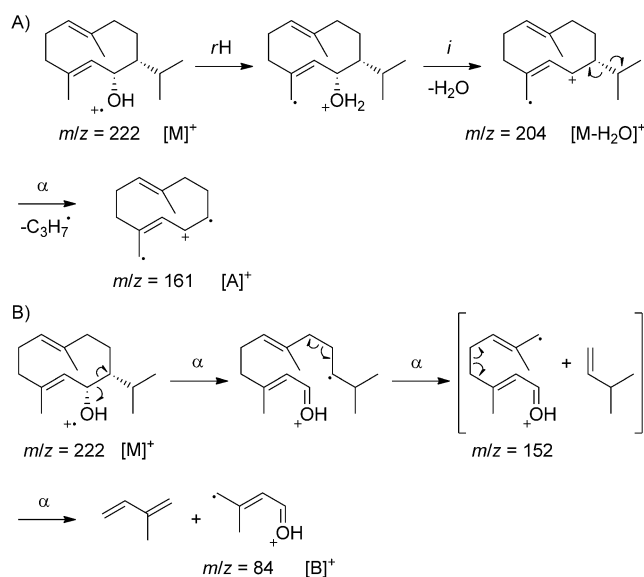


Abbildung 5. EI-MS-Fragmentierung von **1**. Bildungsmechanismen des Fragments $[\text{A}]^+$ ($m/z = 161$) und des Basisions $[\text{B}]^+$ ($m/z = 84$).

mit $m/z = 222$ für unmarkiertes **1** und mit $m/z = 223$ für alle Isotopomere ($^{13}\text{C}_1$)-**1** gebildet wird (Tabelle 12 der SI). Umlagerung eines Wasserstoffs ($r\text{H}$) und induktive Spaltung (i) unter Neutralverlust von Wasser liefert das Fragmentation $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ mit $m/z = 204$ für natürliches **1** und mit $m/z = 205$ für alle ($^{13}\text{C}_1$)-**1**. Nachfolgende α -Spaltung (α) mit Verlust der Isopropylgruppe ist der einzig relevante Mechanismus für die Bildung des Fragments $[\text{A}]^+$. Dies ist aus der Beobachtung von $[\text{A}]^+$ bei $m/z = 161$ für unmarkiertes **1** und alle Isotopomere mit ^{13}C -Markierung in der Isopropylgruppe (gebildet aus ($^{11-13}\text{C}$)FPP, ($^{12-13}\text{C}$)FPP bzw. ($^{13-13}\text{C}$)FPP) ableitbar. Alle anderen ($^{13}\text{C}_1$)FPP-Isotopomere liefern $[\text{A}]^+$ bei $m/z = 162$ (Abbildung 11 der SI). Dieser Mechanismus wird durch HR-MS-Daten weiter gestützt, die für $[\text{A}]^+$ mit $m/z = 161$ die

Formel $C_{12}H_{17}^+$ und mit $m/z = 162$ die Formel $^{13}C_1^{12}C_{11}H_{17}^+$ ergeben (Tabelle 12 der SI) und durch MS²-Analyse die direkte Bildung von $[A]^+$ aus $[M-H_2O]^+$ nachweisen.

Für die Bildung des Basispeaks $[B]^+$ bei $m/z = 84$ wurde ein Mechanismus über zwei α -Spaltungen mit Neutralverlust von 3-Methylbut-1-en zu einem Fragmentation mit $m/z = 152$ und eine dritte α -Spaltung unter Verlust von Isopren nachgewiesen (Abbildung 5B). Dieser Nachweis erfolgt durch die Verschiebung von $[B]^+$ zu $m/z = 85$ für alle ($^{13}C_1$)-**1**, in denen die Markierung in dem Molekülteil auftritt, aus dem $[B]^+$ gebildet wird, also für **1**, das aus (^{13}C)FPP, (^{2-13}C)FPP, (^{3-13}C)FPP, (^{4-13}C)FPP und ($^{15-13}C$)FPP hervorgeht (Abbildung 11 und Tabelle 12 der SI). Weiterhin ergeben sich aus HR-MS-Daten die erwarteten Summenformeln für $m/z = 84$ ($C_5H_8O^+$) und für $m/z = 85$ ($^{13}C_1^{12}C_4H_8O^+$). Die Bildung von $[B]^+$ als Tochterion des Fragments bei $m/z = 152$ wurde durch MS²-Analyse untersucht, dieses Experiment war aber aufgrund der geringen Intensität dieses Ions wenig aufschlussreich. Die Bildung von $[B]^+$ sollte daher besser als konzentrierter Prozess dreier simultaner α -Spaltungen beschrieben werden.

Zusammenfassend haben wir eine bakterielle Terpenzyklase aus *S. pratensis* als (+)-(1(10)E,4E,6S,7R)-Germacradien-6-ol-Synthase identifiziert. Es wird nur ein nahe verwandtes Enzym mit 99.4% identischen Resten in *Streptomyces* sp. PAMC26508 gefunden. Wie bekannt für Germacrane, existiert **1** in verschiedenen definierten Konformeren, die per Tieftemperatur-NMR-Spektroskopie beobachtet werden können. Markierungsexperimente mit synthetischen ^{13}C -markierten FPP-Isotopomeren erlaubten eine vollständige Zuordnung der 1H - und ^{13}C -NMR-Daten von **1**, was bislang für **1** und ähnliche Germacrane wegen ihrer komplexen NMR-Spektren nicht möglich war.^[8] Die thermische Umlagerung von **1** über sesselartige Übergangszustände gab zwei Produkte, deren absolute Konfigurationen aus derjenigen von **1** abgeleitet wurden, während die relativen Konfigurationen der Umlagerungsprodukte bestätigten, dass **1** von seinem Epimer Kunzeaol verschieden ist. Mit den ^{13}C -markierten FPP-Isotopomeren haben wir weiterhin die Grundlage für die Analyse von EI-MS-Fragmentierungen von Sesquiterpenen gelegt, wie wir für ein Paradebeispiel demonstrieren. Zukünftige Experimente in unseren Laboratorien umfassen die Verwendung der FPP-Isotopomere für die Klärung anderer komplexer Probleme der Chemie von Sesquiterpenen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DI1536/7-1) und durch das Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften mit einem Promotionsstipendium an P.R. gefördert. Wir danken Dr. Senada Nozinovic (Bonn) für NMR-Messungen.

Stichwörter: Isotopenmarkierung · Konformation · Massenspektrometrie · NMR-Spektroskopie · Terpenoide

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13448–13451
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13649–13653

- [1] a) N. N. Gerber, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 2971; b) N. N. Gerber, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 508.
- [2] a) C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 202; b) P. Rabe, C. A. Citron, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2345; c) C. A. Citron, L. Barra, J. Wink, J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2673.
- [3] a) C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*, 1815; b) C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *277*, 1820; c) M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13543; d) E. Y. Shishova, L. Di Constanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1941; e) J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787; f) M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature* **2011**, *469*, 116; g) P. Baer, P. Rabe, C. A. Citron, C. C. de Oliveira Mann, N. Kaufmann, M. Groll, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 213; h) P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7652; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7783.
- [4] a) 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; b) X. Lin, R. Hopson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6022; c) J. Jiang, X. He, D. E. Cane, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 711; d) C.-M. Wang, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8908; e) S. A. Agger, F. Lopez-Gallego, T. R. Hoyer, C. Schmidt-Dannert, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 6084; f) M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7422; g) W. K. W. Chou, I. Fanizza, T. Uchiyama, M. Komatsu, H. Ikeda, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8850; h) Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson, D. E. Cane, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 32; i) C. Nakano, M. H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1988; j) C. Nakano, M. H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2403; k) C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27980; l) C. Nakano, T. Tezuka, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 551; m) C. Nakano, F. Kudo, T. Eguchi, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2271; n) P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1810; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1855; o) J. S. Dickschat, K. A. K. Pahirulzaman, P. Rabe, T. Klapschinski, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 810; p) A. Schiffrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 337; q) P. Rabe, K. A. K. Pahirulzaman, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6041; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6139; r) Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane, H. Ikeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 857; s) J.-Y. Chow, B.-X. Tian, G. Ramamoorthy, B. S. Hillerich, R. D. Seidel, S. C. Almo, M. P. Jacobson, C. D. Poulter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5661.
- [5] a) P. Gutta, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6172; b) Y. J. Hong, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7999; c) Y. J. Hong, D. J. Tantillo, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1294.
- [6] M. Seemann, G. Zhai, J.-W. de Kraker, C. M. Paschall, D. W. Christianson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7681.
- [7] a) 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; b) L. Zu, M. Xu, M. W. Lodewyk, D. E. Cane, R. J. Peters, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11369.
- [8] a) A. F. Barrero, M. M. Herrador, J. F. Quilez, R. Alvarez-Manzaneda, D. Portal, J. A. Gavin, D. G. Gravalos, M. S. J. Simmonds, W. M. Blaney, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 529; b) J. A.

- Faraldos, S. Wu, J. Chappell, R. M. Coates, *Tetrahedron* **2007**, 63, 7733.
- [9] K. Foo, I. Usui, D. C. G. Götz, E. W. Werner, D. Holte, P. S. Barran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11491; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 11659.
- [10] C. A. Citron, P. Rabe, L. Barra, C. Nakano, T. Hoshino, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7684.
- [11] L. Barra, K. Ibrom, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 6637; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 6737.
- [12] R. Kaiser, D. Lamparski, *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2671.
- [13] A. M. Adio, *Tetrahedron* **2009**, 65, 5145.
- [14] a) A. J. Weinheimer, W. W. Youngblood, P. H. Washecheck, T. K. B. Karns, L. S. Chiereszko, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11, 497; b) J. A. Faraldos, Y. Zhao, P. E. O'Maille, J. P. Noel, R. M. Coates, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1826; c) S. Rosselli, A. Maggio, R. A. Raccuglia, M. Bruno, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2690.
- [15] a) C. P. Cornwell, N. Reddy, D. N. Leach, S. G. Wyllie, *Flavour Fragrance J.* **2001**, 16, 263; b) B. Szafranek, K. Chrapkowska, D. Waligóra, R. Palavinskas, A. Banach, J. Szafranek, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7729; c) B. Pickel, D. P. Drew, T. Manczak, C. Weitzel, H. T. Simonsen, D.-K. Ro, *Biochem. J.* **2012**, 448, 261.
- [16] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 838.

Eingegangen am 14. August 2015

Online veröffentlicht am 11. September 2015