

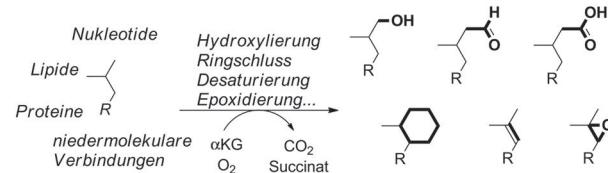
Struktur der Dioxygenase AsqJ: mechanistische Einblicke in die Eintopf-Mehrstufen-Biosynthese eines Chinolonantibiotikums

Alois Bräuer, Philipp Beck, Lukas Hintermann* und Michael Groll*

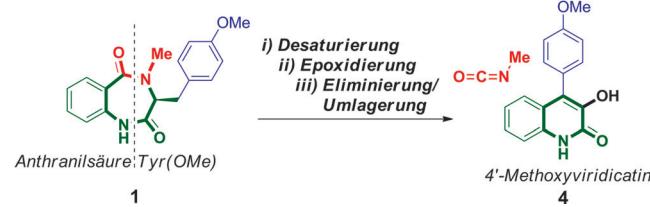
Abstract: Für die Biosynthese von Naturstoffen sind Multi-Enzymkaskaden verantwortlich, die generell eine Inspirationsquelle für Synthesechemiker darstellen. Die $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase AsqJ aus Aspergillus nidulans}$ ist außergewöhnlich, da sie stereoselektiv sowohl eine Desaturierung als auch Epoxidierung eines Benzodiazepindions katalysiert. Interessanterweise löst das enzymatisch gebildete, gespannte Spiro-Epoxyd die enzymunabhängige Umlagerung des 6,7-Bicyclus zum 6,6-Chinolongerüst des Alkaloids 4'-Methoxyviridicatin aus. Verschiedene Kristallstrukturen des Proteins in Ab- und Anwesenheit synthetisierter Substrate, Substratanaloga und Zwischenprodukte erlaubten uns, die einzelnen Stufen der Reaktionssequenz dieser einzigartigen Dioxygenase nachzuahmen und zu hinterleuchten.

Sauerstoff aktivierende $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{-Ketoglutarat-abhängige Oxygenasen}$ nehmen an einer Vielzahl biologisch wichtiger und energetisch anspruchsvoller Reaktionen teil. Dazu gehören beispielsweise stereoselektive Desaturierungen nicht aktiverer C-C-Einfachbindungen, oxidative Ringschlüsse, Epoxidierungen, Hydroxylierungsreaktionen, sowie Oxidationen von Alkoholen, Thioethern und Phosphanen (Schema 1a).^[1] Die durch diese Enzyme vermittelte Substratoxidation ist mit der Zersetzung von $\alpha\text{-Ketoglutarat}$ (αKG) zu CO_2 und Succinat gekoppelt, wobei eine hochvalente Fe^{IV}oxo -Spezies wohl die entscheidende Zwischenstufe darstellt.^[2] Kürzlich identifizierten Watanabe und Mitarbeiter das Enzym AsqJ aus *Aspergillus nidulans* als wesentlichen Bestandteil in der Biosynthese von 4'-Methoxyviridicatin (**4**, Schema 1b).^[3] Das charakteristische 4-Arylchinolin-2(1H)-on-Gerüst von **4** findet sich in verschiedenen Chinolonalkaloiden,^[4] die mit ihren antibakteriellen, Antimalaria-, antiviralen und Antitumor-Aktivitäten privilegierte Wirkstoffe darstellen.^[5] Ein besonderer Aspekt des Enzyms AsqJ ist, dass es nacheinander zwei verschiedene Oxidationen ausgehend von 4'-Methoxycyclopeptin (**1**, Schema 1b), dem Produkt der nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS) AsqK, katalysiert: Zuerst wird mittels einer Desaturierung zu 4'-

a) $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{KG}$ -abhängige Oxygenasen



b) AsqJ-katalysierte Eintopf-Mehrstufen-Biosynthese



Schema 1. a) Reaktivitätsspektrum der $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{KG}$ -abhängigen Oxygenasen.^[1] b) AsqJ wandelt 4'-Methoxycyclopeptin (**1**) in das Chinolonalkaloid 4'-Methoxyviridicatin (**4**) um. An die enzymatischen Schritte der Desaturierung und Epoxidierung schließt sich eine nicht-enzymatische Umlagerung mit konzertierter Eliminierung von Methylisocyanat (rot) an. Substrat **1** ist das durch AsqK katalysierte NRPS-Produkt aus Anthraniolsäure und Tyr(OMe); die N-Methylgruppe des Benzodiazepindions entstammt S-Adenosylmethionin.^[9]

Methoxydehydrocyclopeptin (**2**) eine Doppelbindung eingeführt, die dann unter Bildung von 4'-Methoxycycloopenin (**3**) (Abbildung 1) epoxidiert wird. Letzterer Schritt löst eine faszinierende nicht-enzymatische Eliminierung/Umlagerung des 6,7-Bicyclus **3** zum 6,6-Chinolingerüst von **4** aus.^[6] Um die durch AsqJ eingeleitete Reaktionssequenz aus Desaturierung, Epoxidierung und Eliminierung/Umlagerung besser zu verstehen, beabsichtigten wir, an hochauflöste Strukturinformationen zu gelangen.

Das *asqJ*-Gen aus *A. nidulans* wurde zunächst kloniert und in dem *Escherichia coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert. Danach wurde die rekombinante Dioxygenase durch Ni^{2+} -Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Anschließend wurde AsqJ kristallisiert und die Struktur bei einer Auflösung von 1.7 \AA ($R_{\text{free}} = 19.5\%$; PDB ID: 5DAP, siehe Hintergrundinformationen) mittels Molekularem Ersatz unter Verwendung der Koordinaten der Phytanoyl-Coenzym-A-Hydroxylase EasH (PDB ID: 4NAO)^[7] als Suchmodell bestimmt. Hinsichtlich der Faltung zeigt das homodimere AsqJ ausschließlich Ähnlichkeit zu EasH (C_{α} r.m.s.d. 1.2 \AA für 80% aller C_{α} -Atome; Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen) und bildet eine trichterförmige Reaktionskammer vergleichbar dem für diese Enzymfamilie üblichen „Jelly-Roll“-Motiv (Abbildung S1).^[8]

[*] M. Sc. A. Bräuer, Dr. P. Beck, Prof. Dr. M. Groll
Center für Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

Prof. Dr. L. Hintermann
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: lukas.hintermann@tum.de

Hintergrundinformationen und ORCID(s) der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507835> zu finden.

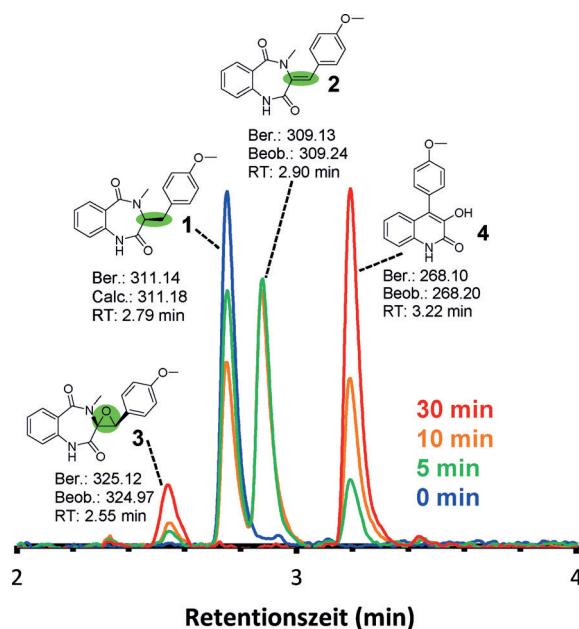


Abbildung 1. RP-HPLC/MS-gekoppelter Aktivitätstest für AsqJ in Anwesenheit von Fe^{2+} , αKG , Sauerstoff und Ascorbinsäure. Gezeigt sind Chromatogramme ($\lambda = 280 \text{ nm}$) mit Peaks für Substrat 1, die Zwischenprodukte 2 und 3 und das Endprodukt 4. Der Reaktionsfortschritt wurde nach 0 min (blaue Kurve), 5 min (grün), 10 min (orange) bzw. 30 min (rot) analysiert.

Die für die Metall- und αKG -Bindung verantwortliche Teilstruktur von AsqJ zeigt das für $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{KG}$ -Dioxygenasen charakteristische $\text{H}_1\text{-X-D/E-X}_n\text{-H}_2$ -Motiv mit den drei metallbindenden Aminosäuren H134, D136 und H211 (Abbildung 2b).^[1a] Die oktaedrische Koordinationssphäre des Metalls im Ruhezustand des Enzyms wird durch das C1-Carboxylat und die C2-Ketogruppe des Kosubstrats αKG und durch ein definiertes Wassermolekül komplettiert. Das am Synchrotron aufgenommene Fluoreszenzspektrum des AsqJ-Kristalls zeigte überraschenderweise die Anwesenheit von Nickel als einziges Schwermetallatom auf. Ein an der Ni-Kante ($\lambda = 1.4843 \text{ \AA}$) aufgenommener anomaler Datensatz bestätigte, dass dieses Ni^{2+} -Ion das aktive Zentrum der Dioxygenase besetzt, woraus es das katalytische Eisen wohl während der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie verdrängt hat.

Um die Aktivität des Enzyms abzusichern, wurde AsqJ mit dessen Substrat 1 versetzt, das in einem Schritt aus Isatoinsäureanhydrid und *N*-Methyl-Tyr(OMe) synthetisiert wurde (Hintergrundinformationen).^[10] Voraussetzung für die Wiederherstellung der Aktivität von AsqJ (Tabelle S1) war die Zugabe von $100 \mu\text{M} \text{Fe}^{2+}$, was den Austausch von Ni^{2+} gegen Fe^{2+} bewirkte. Die enzymatisch induzierte Umsetzung von 1 zu 4 wurde mit einem HPLC/MS-gekoppelten Aktivitätstest analysiert und erlaubte, übereinstimmend mit früheren Arbeiten, die Identifizierung zweier Reaktionszwischenstufen – Desaturase-Produkt 2 und Oxiran 3 – neben dem Chinolon-Alkaloid 4 als Endprodukt (Abbildung 1).^[3]

Die Substitution von Fe^{2+} zu Ni^{2+} inaktivierte das Enzym vollständig und ermöglichte damit die Strukturbestimmung von AsqJ als Komplex mit Substrat 1 durch Kokristallisation.^[11] Die Gesamtstruktur des Enzyms einschließlich der

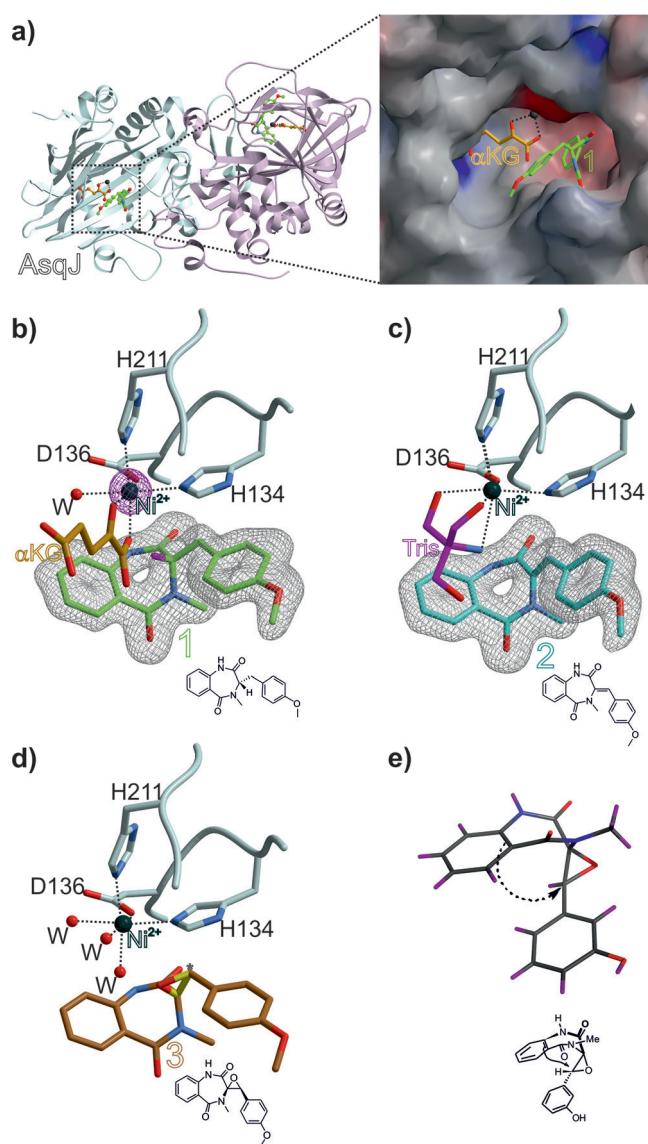


Abbildung 2. a) Bändermodell des AsqJ-Homodimers und Ausschnitt des aktiven Zentrums als Potentialoberfläche mit Konturen von -30 kT^{-1} (rot) bis $+30 \text{ kT}^{-1}$ (blau). Das Kosubstrat $\alpha\text{-Ketoglutarat}$ (αKG , gold) und das Substrat 1 (grün) sind als Stäbchenmodelle gezeigt (PDB ID: 5DAQ). b) Die AsqJ-1-Komplexstruktur weist eine oktaedrische Koordination des Ni^{2+} -Ions durch das HxD_nH -Motiv, die C2-Oxogruppe und das C1-Carboxylat von αKG , das H3-Wasserstoffatom (magenta) sowie ein Wassermolekül (W) auf. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte ist konturiert zu 1σ (graue Masche), wohingegen die anomale Elektronendichte (magenta) für Ni^{2+} zu 10σ konturiert ist. c,d) AsqJ als Komplex mit desaturiertem 2 (PDB ID: 5DAV; hier koordiniert ein Tris-Molekül anstelle des erwarteten αKG das Ni^{2+} -Ion) und modellierter Komplex mit Epoxid 3. e) Die Röntgenstrukturanalyse eines Analogs von 3 mit einer 3-Hydroxy- statt einer 4-Methoxygruppe (CSD ID: POHBEV)^[15] zeigt die notwendige Vororientierung des Spiro-Oxiranbenzodiazepindions bezüglich der folgenden, nicht-enzymatischen Eliminierung/Umlagerung zu Produkt 4 auf.

oktaedrischen Metallkoordinationsgeometrie wurde durch das Anbinden des Liganden nicht verändert. Substrat 1 befindet sich gegenüber der H134-D136-H211-Triade und wird mittels zweier Wasserstoffbrücken zwischen den Diazepin-

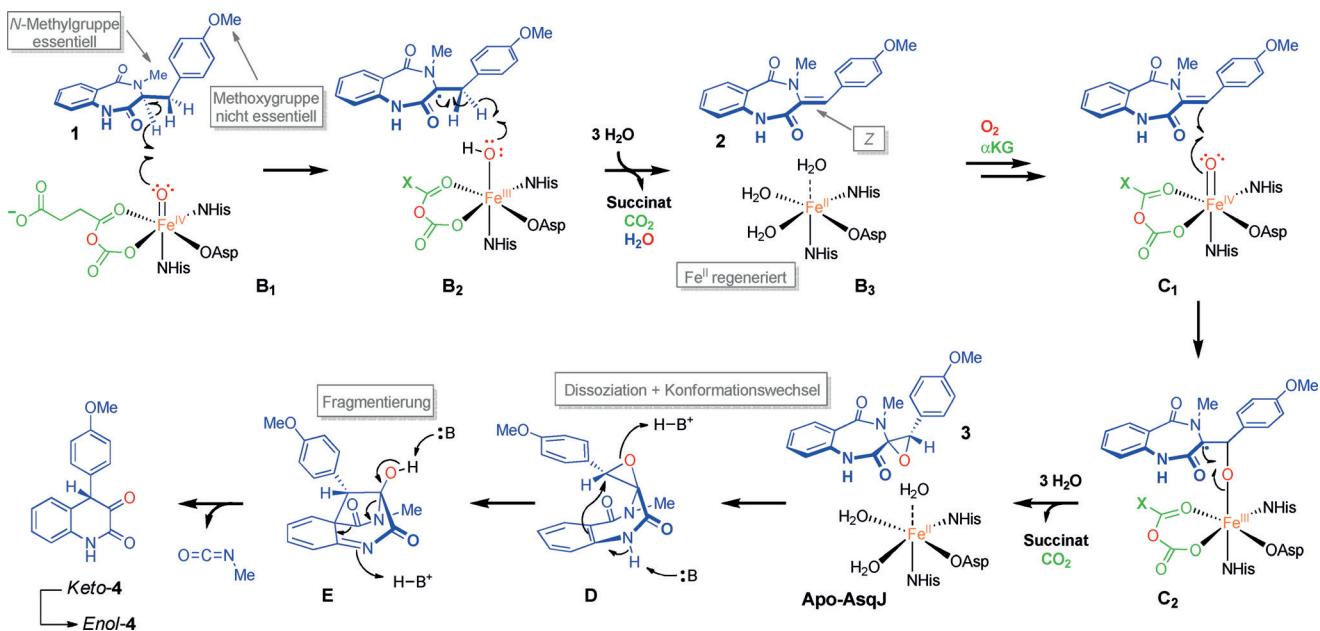
dion-Sauerstoffatomen und M137NH bzw. N70N^{δ2} im Protein verankert. Der Siebenring von **1** ist in einer Boot-Konformation mit einem pseudo-äquatorialen Methoxybenzylsubstituenten fixiert. Diese Konformation entspricht der weniger häufigen der beiden Konformere von **1**, welche in [D₆]DMSO-Lösung beobachtet wurden. In der Bindungstasche ist das Substrat perfekt für eine π - π -Stapelwechselwirkung zwischen seiner 4-Methoxyphenyl(*p*-anisyl)-Gruppe und H134 mit einem interplanaren Abstand von 3.6 Å und einer Verschiebung von 1.7 Å orientiert.^[12] Zusätzlich ist das Substrat über seine beiden Arylringe durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Resten M118, L79, V72 und F139 stabilisiert. Das Ni²⁺-Ion ist 4.5 Å von der C-C-Einfachbindung entfernt, die anschließend desaturiert wird. In Einklang mit dem generellen Mechanismus für Fe^{II}/ α KG-abhängige Dioxygenasen (Schema S1)^[1a,13] koordiniert im nächsten Schritt O₂ an das Eisenzentrum des Enzym-Substrat-Komplexes, was mit der Verdrängung des definierten Wassermoleküls von der sechsten Koordinationsstelle einhergeht.^[1a,14] Ein nukleophiler Angriff des Peroxoliganden an die Kettocarbonylgruppe von α KG bildet zunächst einen bicyclischen Fe^{III}-Peroxyhemiketal-Komplex (Schema S1 A), der sich in das entscheidende Fe^{III}hydroxyl-Radikal bzw. die Fe^{IV}oxo-Spezies umlagert (Schema 3, **B**₁).^[1a,13] Diese hochreaktive Fe^{IV}oxo-Spezies ist nun in der Lage, ein Wasserstoffatom von C3 oder dem benzyllischen C1' des Substrats **1** zu abstrahieren (Schema 3, **B**₁), wobei ein Hydroxo-Fe^{III}-Intermediat in Nachbarschaft zum Substratradikal entsteht.^[1a] Im nächsten Schritt wird der zweite Wasserstoff unter stereoselektiver Bildung des Alkens (*Z*)-**2** (Schema 3, **B**₂–**B**₃) abstrahiert. Der Zerfall des aus α KG stammenden Koliganden unter Freisetzung von CO₂ und Succinat stellt schließlich das aktive Zentrum in seiner Fe^{II}-Form wieder her.

Es wurden nun In-vitro-Aktivitätstests mit den synthetisierten Substratanaloga **1b**–**d** (Schema 2) durchgeführt. Zu-

sammen mit den kristallographischen Ergebnissen betrachtet, konnten wir so die Mindestvoraussetzungen für die Ligandenbindung und Umsetzung festlegen. Entgegen früheren Angaben wurde das Analogon **1b**, dem die Methoxygruppe

gesättigt	ungesättigt	Epoxid	Produkt
	keine Reaktion	n. a.	n. a.
	keine Reaktion	n. a.	n. a.
		keine Reaktion	n. a.

Schema 2. Substratspektrum der Einzelschritte der durch AsqJ katalysierten Reaktion. An = *p*-Anisyl (*p*-Methoxyphenyl), n.a. = nicht auswertbar. (Siehe auch Tabelle S1.)



Schema 3. Vorgeschlagener AsqJ-Mechanismus für die Umsetzung von 4'-Methoxycyclopeptin (**1**) zu 4'-Methoxyviridicatin (**4**). Die Umlagerung von **3** zu **4** ist enzymunabhängig.

fehlt, weiterhin der Sequenz aus Desaturierung, Epoxidierung und Eliminierung/Umlagerung folgend umgesetzt (Schema 2, Abbildung S8).^[3] Die beiden Analoga **1c** und **1d**, denen die *N*-Methylgruppe fehlt, wurden nicht umgesetzt (Schema 2); die Methylierung an N4 ist also von entscheidender Bedeutung für den Ablauf der Katalyse, was im Einklang mit der Anwesenheit einer *N*-Methylierungdomäne in der NRPS AsqK steht. Allerdings offenbarte die AsqJ:**1d**-Kokristallstruktur (Auflösung: 1.7 Å, $R_{\text{free}} = 19.4$; PDB ID: 5DAX), dass das Surrogat **1d** eine zum Substrat **1** identische Konformation einnimmt. Die Methylgruppe an N4 scheint also lediglich einen elektronischen Effekt auf die Katalyse auszuüben, für die Substratbindung ist sie nicht erforderlich.

Weil AsqJ sowohl eine Desaturierung als auch eine Epoxidierung katalysiert, wollten wir die gegenseitige Abhängigkeit beider oxidativer Prozesse untersuchen. Das Zwischenprodukt **2** wurde ausgehend von Isatosäureanhydrid und Sarkosin durch Kondensation zum Benzodiazepindionkern^[10] und Einführung einer exocyclischen 4-Anisylidengruppe mittels Perkin-Kondensierung hergestellt (Hintergrundinformationen).^[16] Wenn nun die durch AsqJ katalisierte Reaktion mit **2** als Edukt gestartet wurde, konnte sowohl die Bildung des Oxiran-Zwischenprodukts **3** als auch des Endprodukts **4** beobachtet werden, aber ausschließlich in Anwesenheit von Fe^{2+} , αKG und Sauerstoff. Dieser Befund zeigt, dass die Desaturierung und Epoxidierung entkoppelte Prozesse sind, die je ein Molekül αKG als auch Sauerstoff benötigen. Das regenerierte Fe^{II} -Zentrum ist also bereit für die Epoxidierung, sobald das Succinat aus dem Dehydrierungsschritt durch ein neues αKG -Kosubstrat ersetzt wird. Bemerkenswert ist, dass AsqJ ausschließlich Aktivität gegenüber dem *Z*-konfigurierten **2** zeigt, nicht aber dem geometrischen *E*-Isomer **2'** (Schema 2, Abbildung S7). Passend dazu haben wir nur eine Komplexstruktur von AsqJ mit **2** (Abbildung 2c, PDB ID: 5DAV) erhalten, die zeigt, dass das *Z*-Isomer von **2**, nicht aber das *E*-Isomer **2'**, in das aktive Zentrum binden kann.

Im zweiten $\text{Fe}^{II}/\alpha\text{-Ketoglutarat}$ -abhängigen Reaktionszyklus setzt die Fe^{IV} -oxo-Spezies das ungesättigte Zwischenprodukt **2** zum Epoxid **3** um (Schema 3, **C₁** und **C₂**). Obwohl die Kristallstruktur des AsqJ-Komplexes nicht erhalten wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Struktur des Enzymgebundenen Oxirans **3** eine identische Konformation einnimmt wie **1** und **2**, da die Proteinumgebung nur eine offene Bootkonformation zulässt (Abbildung 2d). Diese durch AsqJ vorgegebene Substratkonformation kontrastiert mit der Kleinmolekülkristallstruktur von 3'-Hydroxycyclopenin (CSD ID: POHBEV).^[15] Letztere zeigt das Molekül in einer gegenüber dem enzymgebundenen **3** signifikant unterschiedlichen umgeklappten Konformation, die als „geschlossen“ charakterisiert werden kann und von einer vorteilhaften intramolekularen π - π -Wechselwirkung zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen profitiert (Abbildung 2e, Abbildung S3b). Diese „geschlossene“ räumliche Anordnung in **3** ist entscheidend, um den nukleophilen Angriff des einen *ortho*-Kohlenstoffatoms der Acrylamideinheit auf das benzylische Oxiran-Kohlenstoffatom einzuleiten (Schema 3, **D**). Demzufolge ist das AsqJ-gebundene Intermediat **3** in eine nichtreaktive offene Konformation gezwungen (Abbil-

dung S4), und die abschließende Eliminierung/Umlagerung von **3** erfolgt erst nach Dissoziation von der Dioxygenase als spontaner, nicht-enzymatischer Prozess. In dieser Reaktion fragmentiert die tricyclische Kernstruktur des Intermediats **E** unter Eliminierung von Methylisocyanat zur Ketoform von **4**, die schließlich zur aromatischen Enolform tautomerisiert.^[6,17] Im Wesentlichen löst das enzymatisch gebildete Spiro-Epoxid die Umlagerung des 6,7-Bicyclus in das 6,6-Chinolongerüst von 4'-Methoxyviridicatin **4** aufgrund seiner Ringspannung und entsprechenden strukturellen Vororientierung aus.

Zusammenfassend führt die Biosynthese von 4-Arylcholin-2(1*H*)-on-Alkaloiden über eine komplexe Sequenz aus Dehydrierung, Epoxidierung und einer überraschenden abschließenden Umlagerung unter Abspaltung von Methylisocyanat hin zur heterocyclischen Zielstruktur. Es ist bemerkenswert, dass für einen analogen Benzodiazepin-Chinolon-Reaktionsweg in der Biosynthese von Viridicatin in *Penicillium cyclopium* bzw. *P. viride* gezeigt wurde, dass drei Enzyme beteiligt sind: Eine Dehydrogenase, eine Epoxidase und ein Enzym namens Cyclopenease, das an der Umlagerung beteiligt ist.^[18] Die Dioxygenase AsqJ ist bislang einmalig, indem sie die gesamte Reaktionssequenz aus Desaturierung, Epoxidierung und Eliminierung/Umlagerung ausführt. Ein weiteres Enzym, das eine sequentielle Dehydrierung-Epoxidierung bewirkt, ist in der Pentalenolacton-Sesquiterpenoid-Biosynthese in *Streptomyces* involviert.^[19]

Die hier gezeigte spezifische konformativ kontrollierte Reaktionsselektivität ist eine Besonderheit enzymatischer Reaktionen, die in der Regel nicht durch Metallkomplex-Modellsysteme erreicht oder imitiert werden kann. AsqJ ist ein Katalysator, der eine bemerkenswerte mehrstufige Ein-topfsynthese ausführt, die mit einer grundlegenden Strukturänderung verbunden ist; es stellt daher ein ungewöhnlich effizientes Reagens für die Synthese dar.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das 1974-01 TUM-KAUST Agreement on Selective C-H Bond Activation (A.B.) und den SFB749 (M.G.) gefördert. Wir danken den Mitarbeitern der Beamline X06SA des Paul Scherrer-Instituts, SLS, Villigen (Schweiz) für die Unterstützung bei der Datenaufnahme.

Stichwörter: 4'-Methoxyviridicatin · Alkalioide · AsqJ-Dioxygenase · Biosynthese · C-H-Aktivierung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 422–426
Angew. Chem. **2016**, *128*, 432–436

- [1] a) R. P. Hausinger, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 21–68; b) W. Nam, Y. M. Lee, S. Fukuzumi, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1146–1154; c) T. D. H. Bugg, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7075–7101.
- [2] a) J. C. Price, E. W. Barr, T. E. Glass, C. Krebs, J. M. Bollinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13008–13009; b) E. Flashman, C. J. Schofield, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 86–87.
- [3] N. Ishikawa, H. Tanaka, F. Koyama, H. Noguchi, C. C. Wang, K. Hotta, K. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12880–12884; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13094–13098.

- [4] a) K. Scherlach, C. Hertweck, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3517–3520; b) R. Uchida, R. Imasato, H. Tomoda, S. Omura, *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 652–658; c) C. Y. An, X. M. Li, H. Luo, C. S. Li, M. H. Wang, G. M. Xu, B. G. Wang, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1896–1901.
- [5] A. Ahmed, M. Daneshtalab, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15*, 52–72.
- [6] a) J. D. White, M. J. Dimsdale, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1969**, 1285b–1286; b) H. W. Smith, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6083–6089.
- [7] J. Havemann, D. Vogel, B. Loll, U. Keller, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 146–155.
- [8] W. Aik, M. A. McDonough, A. Thalhammer, R. Chowdhury, C. J. Schofield, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 691–700.
- [9] C. T. Walsh, S. W. Haynes, B. D. Ames, X. Gao, Y. Tang, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1366–1382.
- [10] N. H. Al-Said, *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 1249–1251.
- [11] E. Kalliri, P. K. Grzyska, R. P. Hausinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 191–197.
- [12] a) S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 104–112; b) L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808–4842; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4908–4944; c) L. Wang, N. Na Sun, S. Terzyan, X. Zhang, D. R. Benson, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13750–13759.
- [13] a) C. Krebs, D. Galonic Fujimori, C. T. Walsh, J. M. Bollinger Jr., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 484–492; b) I. Müller, A. Kahnert, T. Pape, G. M. Sheldrick, W. Meyer-Klaucke, T. Dierks, M. Kertesz, I. Usón, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3075–3088.
- [14] a) P. K. Grzyska, M. J. Ryle, G. R. Monterosso, J. Liu, D. P. Ballou, R. P. Hausinger, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3845–3855; b) L. M. Hoffart, E. W. Barr, R. B. Guyer, J. M. Bollinger Jr., C. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14738–14743; c) J. Zhou, W. L. Kelly, B. O. Bachmann, M. Gunsior, C. A. Townsend, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7388–7398.
- [15] J. Li, J. Wang, C. S. Jiang, G. Li, Y. W. Guo, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, *16*, 542–548.
- [16] a) M. Ishikura, M. Mori, T. Ikeda, M. Terashima, Y. Ban, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2456–2461; b) P. K. Martin, H. Rapoport, H. W. Smith, J. L. Wong, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1359–1363.
- [17] Y. S. Mohammed, M. Luckner, *Tetrahedron Lett.* **1963**, *4*, 1953–1958.
- [18] a) E. A. Aboutabl, M. Luckner, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2573–2577; b) T. Voigt, M. Luckner, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1651–1655; c) M. Luckner, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 74–78.
- [19] a) M. J. Seo, D. Zhu, S. Endo, H. Ikeda, D. E. Cane, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1739–1754; b) Z. Zhang, J. Ren, D. K. Stammers, J. E. Baldwin, K. Harlos, C. J. Schofield, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 127–133; c) T. Hashimoto, J. Matsuda, Y. Yamada, *FEBS Lett.* **1993**, *329*, 35–39; d) A. X. Cheng, X. J. Han, Y. F. Wu, H. X. Lou, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 1080–1095.

Eingegangen am 21. August 2015,
veränderte Fassung am 5. Oktober 2015
Online veröffentlicht am 10. November 2015