

Mechanistische Charakterisierung von zwei Sesquiterpen-Cyclasen aus dem phytopathogenen Pilz *Fusarium fujikuroi*

Immo Burkhardt, Thomas Siemon, Matthias Henrot, Lena Studt, Sarah Rösler, Bettina Tudzynski, Mathias Christmann* und Jeroen S. Dickschat*

Abstract: Zwei Sesquiterpencyclasen aus *Fusarium fujikuroi* wurden in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt. Das erste Enzym war wegen einer kritischen Mutation inaktiv, die Aktivität konnte aber durch Sequenzkorrektur per ortsgerechteter Mutagenese wiederhergestellt werden. Das mutierte Enzym und zwei natürlicherweise funktionale Homologe aus anderen Fusarien konvertierten Farnesyldiphosphat zu Guaia-6,10(14)-dien. Das zweite Enzym produzierte Eremophilen. Die absolute Konfiguration von Guaia-6,10(14)-dien wurde durch enantioselektive Synthese aufgeklärt, während die des Eremophilens aus dem Vorzeichen der optischen Drehung ableitbar war und derjenigen aus Pflanzen entgegengesetzt ist, aber mit der aus *Sorangium cellulosum* übereinstimmt. Die Mechanismen beider Terpencyclasen wurden mithilfe diverser ¹³C- und ²H-markierter FPP-Isotopomere studiert.

Das Reispathogen *Fusarium fujikuroi* verursacht wegen seiner Produktion von Mykotoxinen wie den Fumonisinen, Fusarin, Fusarinsäure und Moniliformin schwere Ernteausfälle in der Landwirtschaft.^[1] Weiterhin bildet der Pilz große Mengen an Gibberellinen, einer wichtigen Klasse von Pflanzenhormonen, die aus dem Diterpen *ent*-Kauren hervorgehen.^[2] In Pflanzen regulieren Gibberelline Prozesse wie Stamm- und Blattwachstum, Blüte, Fruchtbildung und Keimung. Ihre Überproduktion durch Fusarien führt zu unkontrolliertem Wachstum und Fehlentwicklungen in infizierten Pflanzen, deren Krankheitsbild als „Foolish Seedling“ oder „Bakanae“ bezeichnet werden. Die entfernt verwandte Art *F. sporotrichioides* macht eine Familie von vom Trichodien ab-

geleiteten Mykotoxinen, die Trichothecene.^[3] Diese Verbindungen sind in *F. fujikuroi* und verwandten Arten nicht präsent, da die Biosynthesegene unter anderem für die Trichodien-Synthase nicht in den Genomen kodiert sind. Stattdessen kodiert das Genom von *F. fujikuroi* eine difunktionale *ent*-Copolyldiphosphat-Synthase/*ent*-Kauren-Synthase CPS/KS) für die Gibberellin-Biosynthese,^[4] eine Lanosterol-Synthase, eine Phytoen-Synthase für die Biosynthese von Neurosporaxanthin^[5] und neun Sesquiterpen-Cyclasen (STC1-9).^[6] Nur zwei davon wurden als (+)-Koraiol- (STC4) und (-)- α -Acorenol-Synthasen (STC6) charakterisiert,^[7] aber die Kenntnis der Produkte der anderen STCs ist wichtig, da sie zur Identifizierung unbekannter Mykotoxine führen könnte, die potentiell in der Phytopathogenität eine Rolle spielen. Wir beschreiben hier die Identifizierung der Produkte von STC5 (FFUJ11739) und STC3 (FFUJ04067) und ihre mechanistische Charakterisierung durch Isotopenmarkierungsexperimente.^[8]

Zwei nicht charakterisierte STCs aus *F. fujikuroi* (STC5 und STC3) wurden durch Konstruktion von Überexpressionsmutanten untersucht. Die Mutanten wurden hinsichtlich der Produktion von Terpenen studiert, indem die emittierten Duftstoffe auf Aktivkohle adsorbiert und dann per GC/MS analysiert wurden.^[9] Obwohl quantitative RT-PCR eine höhere Expression der Terpencyclase-Gene anzeigen konnte in keiner Mutante im Vergleich zum Wildtyp die Produktion eines neuen Terpens nachgewiesen werden, möglicherweise wegen oxidativer Modifikationen durch andere Enzyme, deren Gene mit den Genen der Terpencyclasen geclustert sind (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Reverse Transkription der korrespondierenden mRNA und Amplifikation der cDNA durch PCR ermöglichte die Klonierung der Gene in den Hefe-*E. coli*-Transfervektor pYE-Express durch homologe Rekombination.^[10] Die Proteine wurden exprimiert, gereinigt und mit Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) und Geranylgeranyl-diphosphat (GGPP) inkubiert, gefolgt von einer Produktanalyse per GC/MS.

STC5 lieferte mit keinem der getesteten Substrate ein Produkt, vermutlich da eine kritische Mutation des natürlichen Gens einen Austausch von Asparagin zu Lysin in der NSE-Triade bewirkt, die üblicherweise in funktionalen Terpen-Cyclasen die Sequenz ND(L,I,V)XSXXXE aufweist (Abbildung S2).^[11] Entsprechend ergaben zwei Homologe von STC5 aus *F. mangiferae* und *F. proliferatum* mit intakter NSE-Triade ein Sesquiterpen aus FPP (Abbildungen S3 und S4 A), während keine Produkte mit GPP oder GGPP erhalten wurden. Eine Korrektur der Sequenz von STC5 aus *F. fujikuroi* durch die Mutation K288N stellte die Aktivität wieder

[*] I. Burkhardt, 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

T. Siemon, Dr. M. Henrot, Prof. Dr. M. Christmann
Institut für Chemie und Biochemie – Organische Chemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

Dr. L. Studt, S. Rösler, Prof. Dr. B. Tudzynski
Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Schlossplatz 8, 48143 Münster (Deutschland)

Dr. L. Studt
Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie
Universität für Bodenkultur Wien
Konrad-Lorenz-Straße 24/I, 3430 Tulln an der Donau (Österreich)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)
eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603782>
zu finden.

her und ergab dasselbe Produkt. Eine Inkubation in präparativem Maßstab von 60 mg FPP mit STC5 aus *F. mangiferae* ermöglichte die Isolierung von 1 mg (4 %) der reinen Verbindung. Die Struktur wurde durch ein- und zweidimensionale NMR-Techniken etabliert (Tabelle S1). Das ^{13}C -NMR-Spektrum enthielt fünfzehn Signale (für drei Methylgruppen, vier sp^3 -Methylen- und vier sp^3 -Methin-Kohlenstoffatome, zwei olefinische quartäre Kohlenstoffatome und je ein olefinisches CH_2 und CH), was auf ein bicyclisches System hindeutet. Die ^1H -NMR-Signale für die direkt gekoppelten Wasserstoffatome wurden aus dem HMQC-Spektrum ermittelt, und das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum verwies auf drei Spinsysteme (C1-2-3-4-(15)-5-6, C11-(13)-12 und C8-9, Abbildung 1 A).

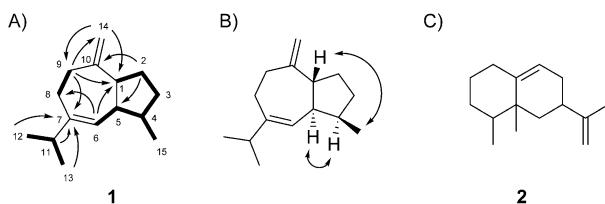
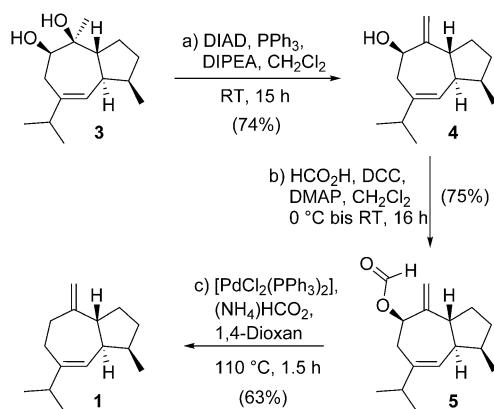


Abbildung 1. Strukturen der Enzymprodukte. A) Spinsysteme von **1** per $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (fett) und wichtige HMBC-Korrelationen (Pfeile); B) wichtige NOESY-Korrelationen für **1** (Doppelpfeile); C) Struktur von **2**.

HMBC-Korrelationen von H11, H12 und H13 nach C7 zeigten eine C7-C11-Bindung an, während Kreuzpeaks von H8 und H9 nach C7 und von H6 nach C8 die Gruppe C6-7-8 aufdeckten. Korrelationen von H14 nach C1 und C9, von H9 nach C1 und C14 sowie von H2 nach C10 platzierten C10 zwischen C1 und C9. Der Ringschluss von C1 nach C5 konnte durch Kreuzpeaks zwischen H2 und C5 sowie H6 und C1 nachgewiesen werden, sodass sich die Planarstruktur von Guaia-6,10(14)-dien (**1**) ergab. Diagnostische NOESY-Korrelationen zwischen H1-H15 und H4-H5 sprachen für ein *trans*-Guaian (Abbildung 1 B).

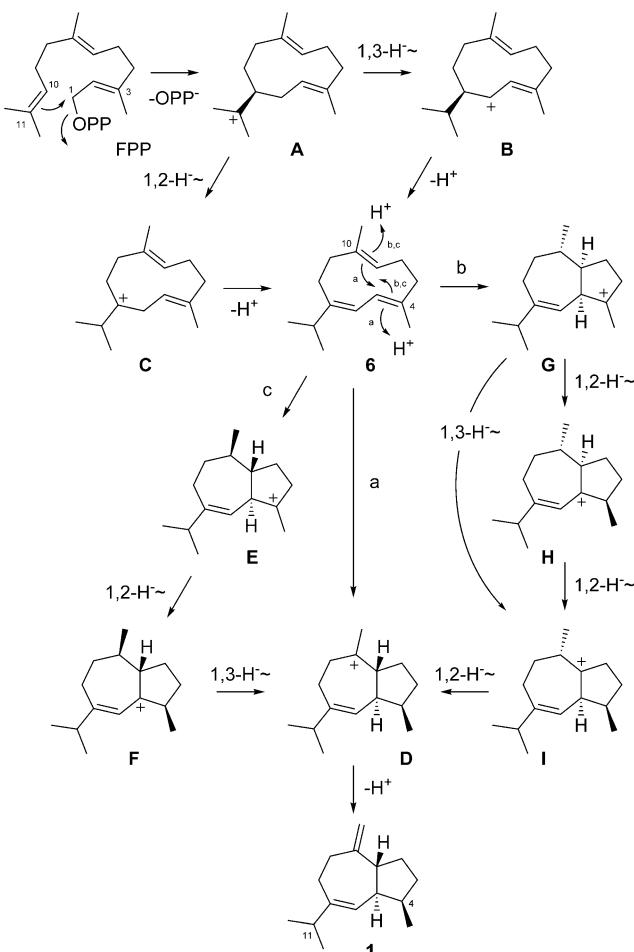
Die absolute Konfiguration von **1** wurde durch enantioselektive Synthese ausgehend vom Diol **3**, einem gut charakterisierten Intermediat unserer Englerin-Synthese (Schema 1), aufgeklärt.^[12] Unter Verwendung eines Mitsunobu-Protokolls^[13] ergab die selektive Eliminierung des tertiären Alkohols das exocyclische Alken **4** in 74 % Ausbeute (bemerkenswerterweise wurde ein Naturstoff mit identischen



Schema 1. Enantioselektive Synthese von (1*R*,4*R*,5*S*)-**1**.

spektroskopischen Daten, aber unterschiedlicher Struktur publiziert).^[14] Der sekundäre Alkohol wurde durch Steglich-Veresterung in das Formiat **5** überführt.^[15] Pd-katalysierte Hydrogenolyse^[16] des Allylformiats lieferte (1*R*,4*R*,5*S*)-**1** in 63 % Ausbeute mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{22.8} = -22.2$ (*c* 0.15, CH_2Cl_2), während die optische Drehung des Enzymproduktes zu $[\alpha]_D^{22.0} = -19.3$ (*c* 0.15, CH_2Cl_2) bestimmt wurde, wodurch ihre Identität bewiesen wurde. Eine Verbindung mit identischen spektroskopischen Daten, aber einer unvollständig bestimmten Konfiguration, war zuvor aus der Weichkoralle *Nephthea chabrollii* berichtet worden.^[17]

Für die Cyclisierung von FPP zu **1** können mehrere Mechanismen angenommen werden (Schema 2). Auf die initiale 1,10-Cyclisierung von FPP zum (*E,E*)-Germacraadienyl-Kation (**A**) kann eine 1,3-Hydridverschiebung zu **B** oder eine 1,2-Hydridwanderung zu **C** und Deprotonierung zu Germacen **6** folgen. Reprotonierung an C4 von **6** und Cyclisierung (Weg a) führt zu **D**, aus dem **1** durch Deprotonierung hervorgeht. Alternativ kann **6** durch Reprotonierung an C10 zu **G** cyclisieren, worauf drei sequenzielle 1,2-Hydridverschiebungen über **H** und **I** zu **D** folgen mögen (Weg b). Kation **I** ist auch aus **G** durch 1,3-Hydridwanderung zugänglich. Schließlich kann die Reprotonierung von **6** an C10 eine Cyclisierung zu **E**, einem Stereoisomer von **G**, auslösen, aus dem **D** durch eine Sequenz von einem 1,2- und einem 1,3-



Schema 2. Mögliche Cyclisierungsmechanismen für die Biosynthese von **1**.

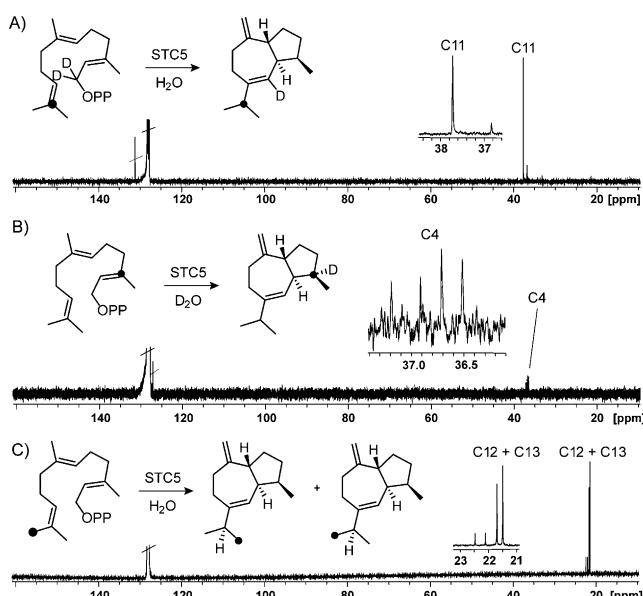
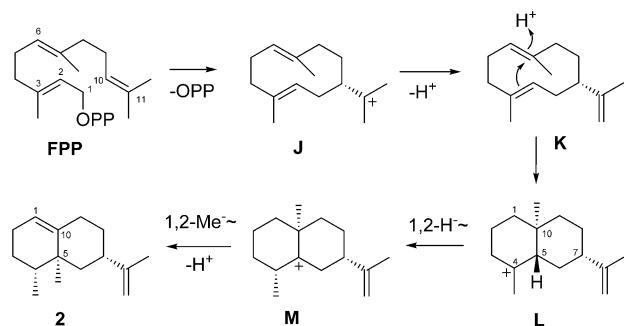


Abbildung 2. Enzymmechanismus von STC5. ¹³C-NMR-Spektren von A) (⁶⁻²H,¹¹⁻¹³C)-1 erhalten aus (^{1,1-2}H,¹¹⁻¹³C)FPP, B) (⁴⁻²H,⁴⁻¹³C)-1 aus (³⁻¹³C)FPP in D₂O, C) einer Mischung von (¹²⁻¹³C)-1 und (¹³⁻¹³C)-1 erhalten aus (¹³⁻¹³C)FPP. Schwarze Punkte verweisen auf ¹³C-markierte Kohlenstoffpositionen.

Hydridtransfer entsteht (Weg c). Die vorgeschlagenen Mechanismen wurden experimentell durch enzymatische Konversion markierter FPP-Isotopomere getestet.^[18] (^{1,1-2}H,¹¹⁻¹³C)FPP resultierte in markiertem **1**, das ein Singulett bei $\delta = 37.8$ ppm für C11 im ¹³C-NMR-Spektrum aufwies, wodurch angezeigt wurde, dass kein Deuterium an diesem Kohlenstoffatom gebunden war (Abbildung 2A). Daraus kann geschlossen werden, dass die Umwandlung von **A** zu **6** nicht über eine 1,3-Hydridverschiebung über **B** abläuft. GC/MS-Analyse des Produktes zeigte den Verlust eines Deuteriumatoms durch ein Molekülion bei m/z 206 an, wie es für den Weg über **C** zu erwarten ist (Abbildung S4B). Enzymatische Umsetzung von (¹⁰⁻²H)FPP^[19] lieferte ein Produkt mit erhöhtem Molekülge wicht (m/z 205). Im zugehörigen Massenspektrum lag der Basispeak, wie für unmarkiertes **1**, bei m/z 161 (Abbildung S4C). Da dieses Fragmention durch Abspaltung der Isopropylgruppe gebildet wird, kann die Deuteriummarkierung des aus (¹⁰⁻²H)FPP erhaltenen Terpen in der Isopropylgruppe lokalisiert werden, was die 1,2-Hydridverschiebung von **A** zu **C** bestätigt. Um zwischen den verschiedenen Optionen für die Reprotonierung von **6** unterscheiden zu können, wurden Inkubationsexperimente in D₂O durchgeführt.^[20] Inkubation von (³⁻¹³C)FPP in D₂O lieferte ein Triplet für C4 von **1** bei $\delta = 36.7$ ppm ($\Delta\delta = -0.5$ ppm, $^1J_{C,D} = 20.1$ Hz), wodurch erwiesen war, dass Deuterium an C4 gebunden war (Abbildung 2B). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Konversion von **6** zu **D** und **1** über Weg a, aber nicht über die Wege b oder c. Das Singulett bei $\delta = 37.2$ ppm zeigte an, dass ein Teil des markierten Materials nicht an C4 deuteriert war, da der Inkubationspuffer Spuren von Wasser enthielt, was auch durch GC/MS-Analyse der Probe nachweisbar war (Abbildung S4D). Um auszuschließen, dass ein kleiner Teil von **6** über einen der

Wege b oder c zu Kation **D** reagiert haben könnte, wurden (²⁻¹³C)FPP und (⁶⁻¹³C)FPP enzymatisch in D₂O umgesetzt, wodurch (²H,⁵⁻¹³C)-**1** und (²H,¹⁻¹³C)-**1** erhalten wurden, die lediglich Singulette für C5 und C1 hervorbrachten (Abbildung S5), während die Aufnahme von Deuterium aus den Massenspektren nachweisbar war (Abbildungen S4E,F). Daraus kann gefolgt werden, dass Weg a der einzige relevante für die Reaktion von **6** zu **D** ist. Ein Inkubationsexperiment mit (¹³⁻¹³C)FPP resultierte in verstärkten ¹³C-Signalen sowohl für C12 als auch C13 (Abbildung 2C), woraus ableitbar ist, dass die Isopropylgruppe in Kation **A** nicht konformativ fixiert ist, sondern vor der folgenden 1,2-Hydridverschiebung zu **C** frei rotieren kann.

Die Inkubation von STC3 mit FPP lieferte ein Sesquiterpen, während GPP und GGPP nicht akzeptiert wurden. Auf Basis einer GC/MS-Analyse (Abbildung S6 A) konnten die Strukturen von Valencen oder Eremophilen vorgeschlagen werden, es war aber nicht möglich, dem Produkt eine dieser beiden Strukturen klar zuzuweisen. Eine Inkubation in präparativem Maßstab ergab aus 50 mg FPP 4.6 mg (19%) des reinen Sesquiterpens, dessen ¹H- und ¹³C-NMR-Daten mit denen von Eremophilen (**2**) übereinstimmten (Tabelle S1).^[21] Die Bestimmung des Drehwertes zu $[\alpha]_D^{20.8} = +86.1$ (c 0.36, CHCl₃) (Lit.: $[\alpha]_D^{25} = +131.7$ (c 1.0, CHCl₃))^[21] verwies auf das entgegengesetzte Enantiomer als in Pflanzen und der Koralle *Plexaurella fusifera*,^[22] aber dasselbe Enantiomer wie in dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*.^[21] Die vorgeschlagene Biosynthese von **2** (Schema 3) startet mit einer 1,10-Cyclisierung von FPP zum (*E,E*)-Germacra dienyl-Kation **J**, gefolgt von einer Deprotonierung zu Germacen A (**K**). Eine durch Reprotonierung an C6 ausgelöste Cyclisierung führt zum Kation **L**, das anschließend durch 1,2-Hydrid- und 1,2-Methylwanderungen und Deprotonierung zu **2** reagiert. Die 1,2-Hydridverschiebung zu **M** wurde durch enzymatische Umsetzung von (²⁻²H,³⁻¹³C)FPP nachgewiesen, die in einem Triplet bei $\delta = 36.6$ ppm ($\Delta\delta = -0.5$ ppm, $^1J_{C,D} = 19.0$ Hz) im ¹³C-NMR-Spektrum von **2** resultierte, wodurch die Anbindung von Deuterium an C4 nachgewiesen wurde (Abbildung 3 A). Ein Singulett für die nicht deuterierte Verbindung ist ebenfalls bei $\delta = 37.1$ ppm erkennbar und aus dem Deuterierungsgrad des Substrates (86% per MS, Abbildung S6B) erklärbar. Die Reprotonierung von **K** findet am selben Kohlenstoffatom statt, von dem im letzten Schritt ein Proton abstrahiert wird. Um zu untersuchen, ob dasselbe Proton, das zunächst eingeführt wird, später verloren geht,



Schema 3. Vorgeschlagener Cyclisierungsmechanismus in der Biosynthese von **2**.

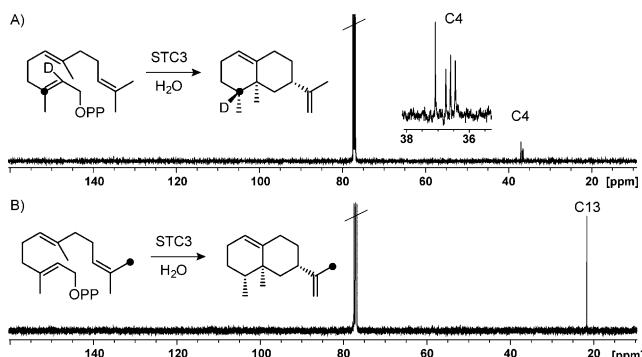


Abbildung 3. Enzymmechanismus von STC3. ^{13}C -NMR-Spektren von A) ($4\text{-}^2\text{H},4\text{-}^{13}\text{C}$)-**2** erhalten aus ($2\text{-}^2\text{H},3\text{-}^{13}\text{C}$)FPP, B) ($13\text{-}^{13}\text{C}$)-**2** erhalten aus ($13\text{-}^{13}\text{C}$)FPP. Schwarze Punkte verweisen auf ^{13}C -markierte Kohlenstoffpositionen.

wurde eine enzymatische Umsetzung von FPP in D_2O durchgeführt. Tatsächlich lieferte die GC/MS-Analyse des Produktes keinen Hinweis auf eine Deuteriumaufnahme aus D_2O (Abbildung S6C). Schließlich wurde das stereochemische Schicksal der terminalen Methylgruppen von FPP durch enzymatische Umsetzung von ($13\text{-}^{13}\text{C}$)FPP verfolgt, wobei sich ein Einbau der Markierung nur in die Methylgruppe C13 und nicht in C12 von **2** ergab (Abbildung 3B). Im Unterschied zu STC5 zeigt STC3 also einen strikten stereochemischen Verlauf in dieser Hinsicht, so wie es zuvor für eine Reihe anderer Terpen-Cyclasen beschrieben worden war.^[18a,23]

Zusammenfassend haben wir STC3 und STC5 aus *F. fujikuroi* als (+)-Eremophilen- und (-)-Guaia-6,10(14)-dien-Synthasen identifiziert. STC5 in *F. fujikuroi* war nur nach einer Sequenzkorrektur einer Mutation in der NSE-Triade aktiv, während Homologe aus *F. proliferatum* und *F. mangiferae* natürlicherweise funktional waren. Die Biosynthesen beider Verbindungen wurden im Detail hinsichtlich des stereospezifischen Verlaufs von Cyclisierungen, Reprotonierungen und Hydridverschiebungen untersucht. Eine detaillierte Untersuchung zur vielschichtigen Regulation des STC5-Genclusters durch für den Biosyntheseweg spezifische und epigenetische Prozesse in *F. fujikuroi* ist Gegenstand unserer derzeitigen Studien.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die DFG gefördert (DI1536/7-1, TU101/16-3).

Stichwörter: Enzymmechanismen · *Fusarium fujikuroi* · Isotopenmarkierung · NMR-Spektroskopie · Terpene

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8748–8751
Angew. Chem. **2016**, *128*, 8890–8893

- [1] a) M. Jestoi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 21; b) E. M. Niehaus, K. Kleigrewe, P. Wiemann, L. Studt, C. M. Sieber, L. R. Connolly, M. Freitag, U. Güldener, B. Tudzynski, H.-U. Humpf, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1055; c) L. Studt, S. Janevska, E. M. Nie-

haus, I. Burkhardt, B. Arndt, C. M. Sieber, H.-U. Humpf, J. S. Dickschat, B. Tudzynski, *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 936.

- [2] C. Bömk, B. Tudzynski, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1876.
[3] M. Kimura, T. Tokai, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato, M. Fujimura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2105.
[4] B. Tudzynski, H. Kawaide, Y. Kamiya, *Curr. Genet.* **1998**, *34*, 234.
[5] P. Linnemannstöns, M. M. Prado, R. Fernandez-Martin, B. Tudzynski, J. Avalos, *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *267*, 593.
[6] P. Wiemann, C. M. Sieber, K. W. von Bargen, L. Studt, E. M. Niehaus, J. J. Espino, K. Huß, C. B. Michielse, S. Albermann, S. V. Bergner, et al., *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003475.
[7] a) N. L. Brock, K. Huss, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 311; b) C. A. Citron, N. L. Brock, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5224.
[8] J. Rinkel, J. S. Dickschat, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2493.
[9] a) K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr. A* **1976**, *117*, 285; b) J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 838; c) C. A. Citron, P. Rabe, J. S. Dickschat, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1765.
[10] J. S. Dickschat, K. A. K. Pahirulzaman, P. Rabe, T. A. Klapschinski, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 810.
[11] a) M. Seemann, G. Zhai, J.-W. de Kraker, C. M. Paschall, D. W. Christianson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7681; b) J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 87.
[12] a) M. Willot, L. Radtke, D. Könning, R. Fröhlich, V. H. Gessner, C. Strohmann, M. Christmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9105; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9269; b) L. Radtke, M. Willot, H. Y. Sun, S. Ziegler, S. Sauerland, C. Strohmann, R. Fröhlich, P. Habenberger, H. Waldmann, M. Christmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3998; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4084.
[13] A. F. Barrero, E. J. Alvarez-Manzaneda, R. Chahboun, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1959.
[14] Q. Wang, D. Chen, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 2432.
[15] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522; *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556.
[16] J. Tsuji, T. Yamakawa, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 613.
[17] M. Rama Rao, K. V. Sridevi, U. Venkatesham, T. Prabhakar Rao, S. S. Lee, Y. Venkatesvarlu, *J. Chem. Res.* **2000**, 245.
[18] a) P. Rabe, L. Barra, J. Rinkel, R. Riclea, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, A. Janusko, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13448; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13649; b) D. E. Cane, J. S. Oliver, P. H. M. Harrison, C. Abell, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4513; c) J. A. Faraldo, S. Wu, J. Chappell, R. M. Coates, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2998.
[19] C. A. Citron, P. Rabe, L. Barra, C. Nakano, T. Hoshino, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7684.
[20] a) P. Rabe, K. A. K. Pahirulzaman, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6041; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6139; b) P. Rabe, J. Rinkel, T. A. Klapschinski, L. Barra, J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 158; c) P. Rabe, A. Janusko, B. Goldfuss, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 146.
[21] A. Schifrin, T. T. B. Ly, N. Günnewich, J. Zapp, V. Thiel, S. Schulz, F. Hannemann, Y. Khatri, R. Bernhardt, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 337.
[22] a) J. Hochmannová, V. Herout, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2369; b) J. L. Frenz-Ross, J. J. Enticknap, R. G. Kerr, *Mar. Biotechnol.* **2008**, *10*, 572.
[23] a) F. C. Baker, C. J. W. Brooks, S. A. Hutchinson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 293b; b) D. E. Cane, P. C. Prabhakaran, J. S. Oliver, D. B. McIlwaine, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3209; c) C.-M. Wang, R. Hopson, X. Lin, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8360; d) N. L. Brock, S. R. Ravella, S. Schulz, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2100; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2154.

Eingegangen am 19. April 2016
Online veröffentlicht am 13. Juni 2016