

Isolierung, Strukturaufklärung und (Bio-)Synthese von Haprolid, einem zellspezifisch zytotoxischen myxobakteriellen Makrolidnaturstoff

Heinrich Steinmetz, Jun Li, Chengzhang Fu, Nestor Zaburannyi, Birgitte Kunze, Kirsten Harmrolfs, Viktoria Schmitt, Jennifer Herrmann, Hans Reichenbach, Gerhard Höfle, Markus Kalesse* und Rolf Müller*

Abstract: Myxobakterien sind gut etablierte Quellen diverser hoch bioaktiver Naturstoffe. Das hier beschriebene Haprolid ist ein neuartiges Makrolacton, das aus vier modifizierten Aminosäuren und einem Polyketidfragment aufgebaut ist und aus *Byssovorax-cruenta-Har1*-Kulturen isoliert wurde. Da sich die vollständige Bestimmung der stereochemischen Konfiguration als anspruchsvoll erwies, wurde eine bioinformatische Analyse der Biosynthesegene zur Vorhersage der Konfiguration der einzelnen Zentren angewendet. Eine detaillierte Analyse der für die Haprolidsynthese zuständigen Biosyntheseproteine ergab ein hybrides System aus Polyketidsynthase und Nichribosomaler Peptidsynthetase und ermöglichte die bioinformatische Konfigurationsanalyse der einzelnen Stereozentren. Durch nachfolgende Totalsynthese von Haprolid konnten alle getroffenen Vorhersagen bestätigt werden. Haprolid zeigte eine zytotoxische Aktivität gegen bestimmte Zelllinien im nanomolaren Bereich, auf andere Zellen hatte es aber überraschenderweise kaum Einfluss.

Myxobakterien sind bemerkenswert vielfältige Produzenten von diversen strukturell einzigartigen Naturstoffen mit

einem breiten Bioaktivitätsspektrum.^[1a–c] Haprolid (**1**; Abbildung 1) wurde während eines Standard-Screenings am HZI bereits im Jahr 2000 aus Kulturen des Myxobakteriums *Byssovorax cruenta* (Stamm Har1) isoliert und strukturell, jedoch ohne Bestimmung der stereochemischen Konfiguration, aufgeklärt.^[1d] Hier beschreiben wir die Struktur und Bestimmung der stereochemischen Konfiguration von Haprolid, seine Bio- und Totalsynthese sowie seine außergewöhnlich starke und selektive Zytotoxizität gegen eukaryotische Zellen.

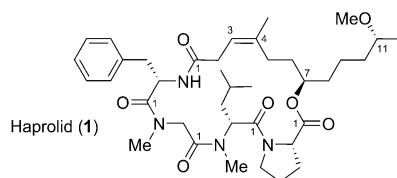


Abbildung 1. Haprolid (1).

Haprolid (**1**) wurde in Form eines weißen Feststoffs isoliert, dem auf Grundlage von HR-ESI-MS-Messungen die Summenformel $C_{38}H_{58}N_4O_7$ zugeordnet werden konnte. Die Analyse der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Tabelle S1 der Hintergrundinformationen) resultierte basierend auf den chemischen Verschiebungen in folgenden Strukturfragmente: ein N-H-Amidproton ($\delta(H) = 8.28$ ppm), sieben Methylgruppen (inklusive einer *O*-Methylgruppe und zweier *N*-Methylgruppen), eine Phenylringeinheit, sieben Methingruppen (von denen fünf heteroatomgebunden sind), neun Methylengruppen und fünf Carbonyl-C-Atome. Die Interpretation der 1D- und 2D-NMR-Daten ergab eine peptidgebundene lipophile C_{12} -Einheit. Die detaillierte Analyse der COSY-, HMQC- und HMBC-Korrelationen lieferte ein Prolinfragment (Pro), gebunden an drei weitere Aminosäuren: *N*-Me-Leucin (*N*-Me-Leu), Sarcosin (Sarc) und Phenylalanin (Phe). Somit konnte Haprolid (**1**) eine tetrapeptidische Teilstruktur zugeordnet werden (Abbildungen S4–S7). Die Aminosäuresequenz konnte mittels ESI-MS/MS-Fragmentierung (Abbildung S11) bestätigt werden, wobei die Bausteine Pro ($m/z = 115$), *N*-Me-Leu ($m/z = 127$) und Sarc ($m/z = 71$) abgespalten wurden. Die Anbindung der Polyketidkette an die Phenylalanineinheit konnte mittels HMBC-Korrelationen zwischen dem Phe- α -Proton und C-1 der Polyketideinheit nachgewiesen werden. Die Konstitution der lipophilen Dodecylkette und die Position der Doppelbindung

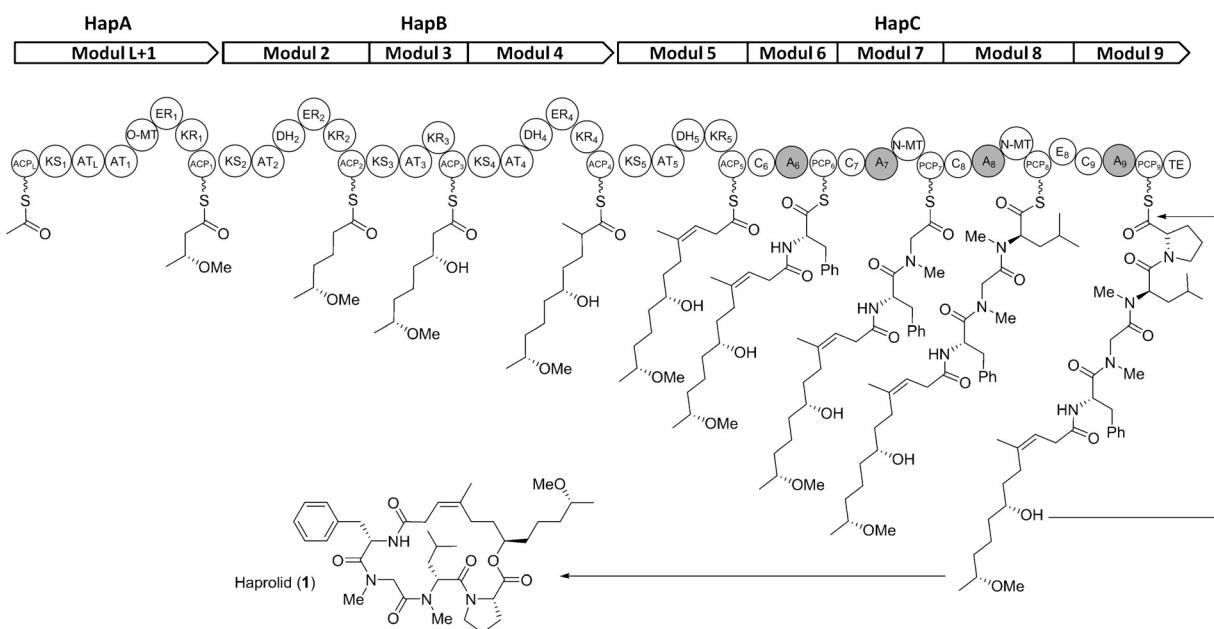
[*] H. Steinmetz, Dr. B. Kunze
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Forschungsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Dr. J. Li, Prof. Dr. M. Kalesse
Institut für Organische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
und
Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ)
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
E-Mail: markus.kalesse@oci.uni-hannover.de
Dr. J. Li, Prof. Dr. H. Reichenbach, Prof. Dr. G. Höfle,
Prof. Dr. M. Kalesse
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Dr. C. Fu, Dr. N. Zaburannyi, Dr. K. Harmrolfs, V. Schmitt,
Dr. J. Herrmann, Prof. Dr. R. Müller
Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS),
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung und Pharmazeutische
Biotechnologie
Universitätscampus E8.1
66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: Rolf.Mueller@helmholtz-hzi.de

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)
 eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603288> zu finden.

(C-3/4) wurde durch Analyse der COSY- und HMBC-Korrelationen aufgeklärt. Starke ROESY-Korrelationen zwischen H-3 und der Methylgruppe an C-4 der Polyketidkette ließen auf eine *Z*-Geometrie der Doppelbindung schließen. Diese Annahme wurde durch weitere ROESY-Korrelationen zwischen H-2b ($\delta(H) = 2.64$ ppm) und H-5b ($\delta(H) = 2.20\text{--}2.14$ ppm) gestützt (Abbildungen S8 und S9). Die cyclische Struktur von **1** konnte mittels starker HMBC-Korrelationen zwischen H-7 ($\delta(H) = 4.62$ ppm) und Pro-C-1 nachgewiesen werden. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Aminosäuren wurde über chemische Standardmethoden (Abbau und Derivatisierung)^[2] durchgeführt. Diese ließen auf die Konfigurationen L-Pro, D-N-Me-Leu und L-Phe schließen. Da sich die Konfigurationsanalyse der Oxymethingruppen in der Polyketidkette (C-7 und C-11) als anspruchsvoll herausstellte, wurde entschieden, diese vorerst mittels bioinformatischer Analyse der Ketoreduktasedomänen durchzuführen.^[3,4] Hierfür wurde die Sequenz des Biosynthesegenclusters von Haprolid benötigt. Um dieses im Genom des Produzenten *Byssvorax cruenta* Har1 zu identifizieren, wurde genomische DNA einer Illumina-Sequenzierung unterzogen, woraus ein erster Entwurf der aus zehn Fragmenten bestehenden Genomsequenz resultierte. Gemäß der chemischen Struktur von Haprolid sollte das Biosynthesecluster ein hybrides System aus Polyketidsynthase und Nichtribosomaler Peptidsynthetase (PKS-NRPS) enthalten. Nach eingehender Analyse aller vorhergesagten hybriden PKS-NRPS-Gencluster mithilfe von antiSMASH^[5] wurde ein Kandidat gefunden, der mit der retrobiosynthetischen Voraussage konform war und zwei Lücken aufwies. Diese konnten durch Sequenzierung von Polymerasekettenreaktionsprodukten geschlossen werden (Tabelle S2). Die BLAST-Analyse der Funktion der einzelnen Gene des ausgewählten Clusters ließ auf drei große Gene schließen (*hapA*, *hapB* und *hapC*), die für zwei PKS-Megaenzyme und einen hybriden

PKS-NRPS-Multienzymkomplex kodieren. Die eingehende Annotation der vor- und nachgelagerten Gene von *hapA*–*hapC* wies auf keine offensichtliche Funktion für die Haprolid-Biosynthese hin. Die Biosynthese beginnt mit dem Multienzym HapA, einem gemischten Lade- und Kettenverlängerungs-Modul, das bereits aus verschiedenen Biosynthesen myxobakterieller Naturstoffe bekannt ist: Soraphen,^[6] Melithiazol,^[7] Thuggacin^[8] und Disciformycin.^[9] Die Polyketidkette wird mithilfe von drei Modulen des Megaenzymes HapB verlängert, und das hybride PKS-NRPS Protein HapC, das ein weiteres PKS-Modul und vier NRPS-Module enthält, erweitert die Polyketidkette um einen Baustein und integriert die vier Aminosäurereste in die Struktur.

Um die vorhergesagten, im Biosynthesegencluster kodierten Funktionalitäten zu bestätigen, wurden alle sechs Acyltransferase(AT)- und die vier Adenylierungs(A)-Domänen hinsichtlich ihrer Substratspezifität analysiert. Die Sequenzen der ATs wurden mit der kristallisierten Form von Malonyl-CoA:Acyl-Carrier-Protein(ACP)-Transacylase aus *Escherichia coli* verglichen (Tabelle S3, Abbildung S12).^[10] Die AT-Ladedomäne (AT_L), die für einen Transfer des Acetyl-CoA-Komplexes auf die ACP_L zuständig sein sollte, trägt erstaunlicherweise einen Arginin-Rest (R117), der als essenziell für die Aktivierung von Dicarbonsäuren als Kettenverlängerungseinheiten angenommen wird (Abbildung S12).^[11] Es sind allerdings auch Beispiele dieser Proteinmodifikation bekannt, die entweder Acetyl-CoA- oder Malonyl-CoA-Komplexe transferieren.^[11,12] Die Analyse der Substratspezifität der AT-Domänen ergab, dass die kollineare Fertigungsstrecke einen Acetyl-CoA-Komplex als Starteinheit lädt, der nachfolgend mit drei Malonyl-CoA-Einheiten erweitert wird, gefolgt von einem Methylmalonyl-CoA- und einem weiteren Malonyl-CoA-Einbau. Diese Schritte sind in Einklang mit der chemischen Struktur von Haprolid (Schema 1, Abbildung S12 und Tabelle S3). Die A-Domänen



Schema 1. Biosynthese von Haprolid. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

wurden hinsichtlich ihrer mutmaßlichen Aminosäure-spezifität analysiert (Tabelle S4, Abbildung S13),^[13] die ebenfalls in Übereinstimmung mit der Haprolidstruktur war (Schema 1).

Basierend auf der Analyse der Ketoreduktase(KR)-Domänen, A-Domänen und Kondensations(K)-Domänen des Haprolid-Biosyntheseclusters (Hap) wurde die absolute stereochemische Konfiguration aller Stereozentren prognostiziert.^[14] Die Konfigurationsanalyse zeigte Übereinstimmung mit den Befunden der chemischen Analyse (siehe oben). Hinweise auf die absolute Konfiguration der beiden Oxymethingruppen in der Polyketidkette wurden durch den Vergleich der spezifischen Sequenzmotive der KR-Domänen erhalten (Typ-A- und Typ-B-Stereospezifität; Abbildung S14).^[3,15] Die statistische Analyse der beiden KR-Domänen ergab einen ScoreDiff-Wert von 27.64 für C-18 und 47.39 für C-22.^[3d] Für beide Oxymethineinheiten wurde somit eine D-Konfiguration vorhergesagt, da sie von Typ-B-KR-Domänen generiert werden (KR1, KR3). Dies ist das zweite Beispiel, in dem die Genauigkeit einer Biosynthese-gestützten Strukturvorhersage mithilfe absoluter Werte einer statistischen Analyse quantifiziert wurde. Die Z-konfigurierte Doppelbindung wird vermutlich vom Haprolid-Biosynthese-modul 5 katalysiert, das eine Typ-B-KR-Domäne enthält. Die meisten cis-Alkene in Polyketiden werden über Dehydratase(DH)-Domänen gebildet, die die Eliminierung von Wasser aus (3S)-Hydroxyacylintermediaten katalysieren, die wiederum von Typ-A-KR-Domänen generiert wurden. Es sind aber bereits Ausnahmen von dieser Regel beschrieben, in denen Typ-B-KR-Domänen in die Bildung einer cis-Doppelbindung involviert sind. Dazu gehören die Biosynthesen von Borrelidin,^[17] Chivosazol,^[4b] Difficidin^[18] und Mupirocin.^[19] Aus der Kombination von C-Domänen-Analyse und Vorhersage der Substratspezifität der A-Domänen konnte eine kollineare Biosynthese gefolgt werden, die mit der Aktivierung einer L-Phe-Einheit startet (Domäne A6) und nachfolgend die Anbindung des PCP-gebundenen L-Phe an die Polyketidkette durch Domäne C6 vollzieht. Im nächsten Schritt wird Glycin aktiviert und in die hybride PK-NRP-Kette integriert, von der N-MT-Domäne (Modul 7) N-methyliert und anschließend mit einer L-Leu-Einheit erweitert, die ebenfalls N-methyliert und epimerisiert wird. Anschließend bewirkt die Typ-D_L-Kondensationsdomäne (C9) die D-L-Peptidverknüpfung zwischen D-Leu und des von Modul 9 eingeführten L-Pro (Schema 1). Schließlich wird die intramolekulare Makrocyclisierung zu Haprolid (**1**) von der TE-Domäne in Modul 9 katalysiert.

Basierend auf der oben beschriebenen Strukturaufklärung entwickelten wir anschließend eine Retrosynthese, bei der das Peptid- und das Polyketidfragment durch eine Peptidkupplung verknüpft werden sollten (Abbildung 2). Die Lactonisierung sollte entweder mithilfe der Shiina^[20] oder der Mitsunobu-Vorschrift^[21] erfolgen, da so auf der letzten

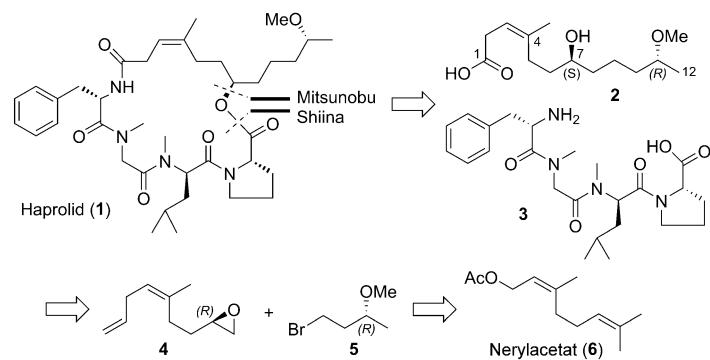
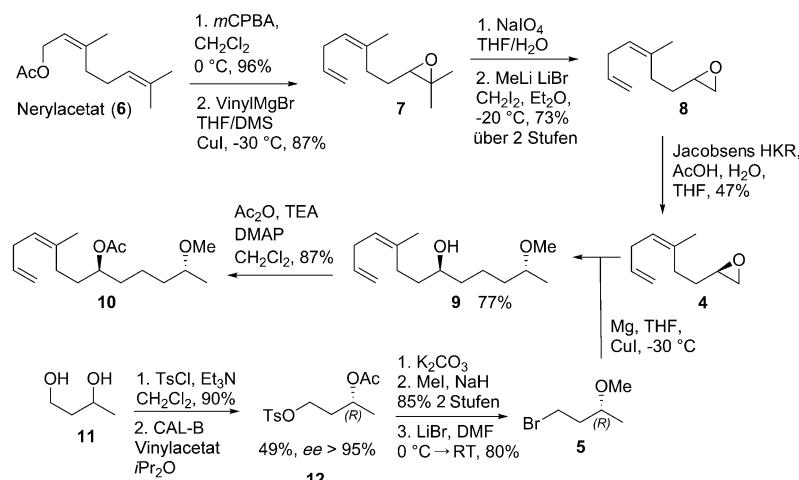


Abbildung 2. Haprolid und seine Retrosynthese.

Stufe die Synthese beider Diastereomere an C-7 ermöglicht werden kann. Um eine möglichst effiziente Synthese durchzuführen, wählten wir Nerylacetat als Ausgangsmaterial, das schlussendlich zu Segment **2** umgesetzt werden musste.^[22] Die Hürden der Synthese waren der Aufbau der Z-konfigurierten und im Bezug zur Säure dekonjugierten Doppelbindung sowie die Synthese der beiden relativ isolierten sekundären Alkoholfunktionen. Die Lösung des ersten Problems lag in der Verwendung eines Olefins als Vorstufe für die Säure. Die Freisetzung der Säure erfolgte später mithilfe von Strukuls Katalysator, der die selektive Epoxidierung der terminalen Doppelbindung, ohne das Z-konfigurierte interne Olefin anzugreifen, ermöglichte. Der Aufbau der sekundären Alkoholfunktionen erfolgte durch enzymatische kinetische Racematspaltung und selektive Epoxidöffnung. Für die Umwandlung von **7** zu **8** wurde schließlich eine optimierte Vorschrift zur Synthese einer thermisch stabilen Iodmethylolithiumverbindung verwendet, die auf die Pionierarbeiten von Köbrich zurückdatiert werden kann.^[23]

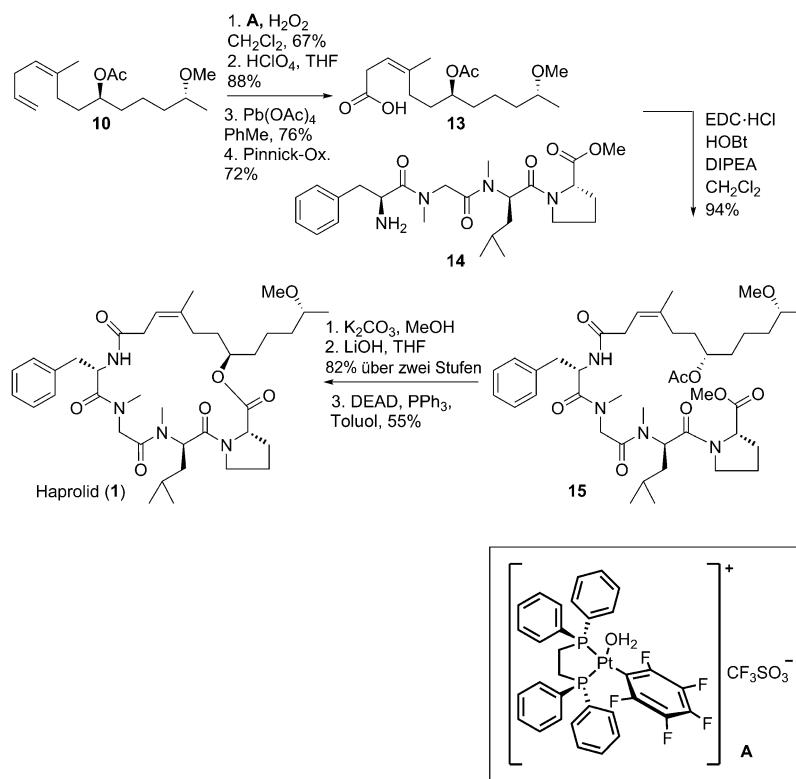
Die Synthese begann mit einer *m*CPBA-vermittelten Epoxidierung der terminalen Doppelbindung^[24] im Neryl-



Schema 2. Synthese des Segments **10**. CAL-B = Lipase B aus *Candida antarctica*, *m*CPBA = *meta*-Chlorperoxybenzoësäure, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DMS = Dimethylsulfid, HKR = hydrolytische kinetische Racematspaltung, TEA = Triethylamin, Ts = Tosylat.

acetat (Schema 2). Die nachfolgende Umsetzung mit Vinylmagnesiumbromid in Gegenwart von Kupfer(I) lieferte Epoxid **7**.^[25] Nach intensiver, aber erfolgloser Untersuchung verschiedener funktioneller Gruppen als Synthesebausteine für das Carboxylat entschieden wir uns dafür, eine monosubstituierte Doppelbindung als Äquivalent der Carboxylatgruppe zu verwenden und damit die Synthese von **2** fortzusetzen. Verbindung **7** wurde mithilfe von NaIO_4 in den entsprechenden Aldehyd überführt und anschließend mit Iodmethylolithium, das *in situ* aus CH_2I_2 und MeLi in der Gegenwart von LiBr generiert wurde, zu Aldehyd **8** umgesetzt.^[26] Dieses optimierte Verfahren zur Herstellung α -halogenierter Organolithiumverbindungen (Köbrich-Reagentien)^[27] ermöglicht die Handhabung solcher Reaktionen bei Temperaturen zwischen -20 und 0°C , ohne dass sich die Produkte zersetzen. Das so erhaltene Epoxid wurde unter Verwendung des ((*R,R*)-Salen) Co^{III} -Komplexes^[28] einer hydrolytischen kinetischen Racematspaltung nach Jacobsen unterzogen. Das so erhaltene Epoxid **4** wurde anschließend mit dem von **5** abgeleiteten Grignard-Reagens umgesetzt und lieferte den Polyketid-Baustein **9**.

Die Umwandlung der terminalen Doppelbindung zur Carbonsäure konnte in vier Stufen erreicht werden und nutzte als Schlüsselschritt die selektive Epoxidierung der terminalen Doppelbindung mithilfe des von Strukul et al. entwickelten Platinkatalysators (Schema 3).^[29] Die Kondensation mit dem entsprechenden Tripeptid wurde unter Standardbedingungen der Peptidsynthese erzielt und ergab die



Schema 3. Abschluss der Synthese von Haprolid (**1**). DEAD = Diethylazodicarboxylat, DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, HOBT = Hydroxybenzotriazol.

lineare Vorstufe **15**. Hydrolyse des Acetats und des Methylesters lieferte die Secosäure, die unter Verwendung der Mitsunobu-Vorschrift Haprolid in 55% Ausbeute ergab. Alle spektroskopischen Daten des synthetischen Materials stimmten mit denen einer authentischen Probe überein (Syntheseteil in den Hintergrundinformationen).

Die zytotoxische Aktivität von Haprolid (natürliches und synthetisches Material) gegen einige humane Krebszelllinien wurde getestet (Tabelle 1). Interessant war die hohe Aktivität

Tabelle 1: Zytotoxische Aktivität von Haprolid.

Zelllinie (Zugangsnr.)	IC_{50} [μM] 1 (aus <i>B. cruenta</i>)	IC_{50} [μM] 1 (synthetisch)
A-549 (ACC-107)	>100	>100
Hep2 (CCL-240)	0.0042 ± 0.0032	0.01
HL-60 (ACC-3)	0.10 ± 0.11	n.d.
Huh7.5 (APC49)	0.29 ± 0.23	0.37
KB-3.1 (ACC-16)	0.014 ± 0.002	n.d.
SK-OV-3 (HTB-77)	>100	>100
THP-1 (ACC-16)	0.025 ± 0.014	0.06
U-2 OS (ACC-785)	1.73 ± 0.64	n.d.

(IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich) von Haprolid gegen die Zervixkarzinom-Zelllinien Hep2 und KB-3.1 (HeLa-Derivate) sowie die Leukämie-Zelllinien THP-1 und HL-60. Die IC_{50} -Werte für Huh7.5-Leberkarzinom- und U-2-OS-Knochentumor-Zellen lagen im höheren nanomolaren Bereich. Im Unterschied dazu konnte keine Aktivität von Haprolid gegen A-549-Lungenkarzinom- und SK-OV-3-ovariale Adenokarzinom-Zellen detektiert werden. Der Grund für diese selektive Zytotoxizität sowie das molekulare Target von Haprolid sind bisher nicht bekannt. Wir konnten weder spezifische Wirkungen von Haprolid auf das Zytoskelett (Aktin, Tubulin) noch bestimmte Hinweise auf Apoptose (mitochondriale Membrandepolarisation, Funktionsstörung der Lysosomen und Zellkernfragmentierung) in KB-3.1-Zellen beobachten (Abbildung S15). Geplante biochemische Studien werden sich mit dem bisher unbekannten und interessanten Wirkmechanismus von Haprolid befassen.

Zusammenfassend konnten wir einen neuen Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien isolieren, die Biosynthese aufklären, damit eine Strukturvorhersage treffen und diese anschließend durch Totalsynthese bestätigen. Für die Biosynthese-gestützte Strukturaufklärung konnten bereits etablierte Vorschriften und statistische Methoden genutzt werden, die eine quantitative Beurteilung der getroffenen Strukturvorhersage ermöglichen. Die Syntheseroute zu Haprolid zeichnet sich durch die Anwendung selten genutzter Vorschriften für die Umwandlung von Epoxiden aus (Strukuls Katalysator und ein thermisch stabiles Iodmethylolithiumreagens). Letztlich bietet die be-

merkenswerte biologische Aktivität von Haprolid, in Kombination mit der kurzen und effizienten Totalsynthese (längste lineare Route: 12 Stufen), eine gute Voraussetzung für einen potenziellen Einsatz als Wirkstoff.

Stichwörter: Haprolid · Polyketid-(Bio)-Synthese · Retrosynthese · Strukturaufklärung · Zellspezifisches Zytotoxin

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10113–10117
Angew. Chem. **2016**, *128*, 10267–10271

- [1] a) H. Reichenbach, G. Höfle in *Drug Discovery from Nature* (Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Berlin, **1999**; b) K. J. Weissman, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1276–1295; c) T. F. Schäberle, F. Lohr, A. Schmitz, G. M. König, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 953–972; d) H. Steinmetz, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [2] I. Abe, S. Kuramoto, S. Musha, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1983**, *6*, 366–370.
- [3] a) P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657; b) P. Caffrey, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1060–1062; c) R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79; d) A. Kitsche, M. Kalesse, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851–861; e) online profile Hidden Markov Model analysis tool: https://akitsche.shinyapps.io/profileHMM_App.
- [4] a) S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1385–1407; b) O. Perlova, K. Gerth, O. Kaiser, A. Hans, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 174–191.
- [5] T. Weber et al., *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W237–43.
- [6] C. J. Wilkinson, E. J. Frost, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1197–1208.
- [7] S. Weinig, H.-J. Hecht, T. Mahmud, R. Müller, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 939–952.
- [8] K. Buntin, H. Irschik, K. J. Weissman, E. Luxenburger, H. Blöcker, R. Müller, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 342–356.
- [9] F. Surup, K. Viehrig, K. I. Mohr, J. Herrmann, R. Jansen, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13588–13591; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13806–13809.
- [10] G. Yadav, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 335–363.
- [11] L. Serre, E. C. Verbree, Z. Dauter, A. R. Stuitje, Z. S. Derewenda, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12961–12964.
- [12] S. F. Haydock, J. F. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, L. E. Khaw, A. König, A. F. Marsden, I. S. Galloway, J. Staunton, P. F. Leadlay, *FEBS Lett.* **1995**, *374*, 246–248.
- [13] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.
- [14] Andere Beispiele für eine Strukturvorhersage auf Basis der biosynthetischen Analyse: a) O. Hartmann, M. Kalesse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7335–7338; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7463–7466; b) C. Jahns, T. Hoffmann, S. Müller, K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Reichenbach, M. Kalesse, T. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5239–5243; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5330–5334; c) S. Essig, S. Bretzke, R. Müller, D. Menche, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19362–19365; d) T. Brodmann, D. Janssen, M. Kalesse, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13610–13611; e) M. Bock, K. Buntin, R. Müller, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2308–2311; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2341–2344; f) D. Menche, F. Arıkan, O. Perlova, N. Horstmann, W. Ahlbrecht, S. C. Wenzel, R. Jansen, H. Irschik, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14234–14243; g) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, M. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4898–4901; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4985–4988.
- [15] A. P. Siskos et al., *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1145–1153.
- [16] D. H. Kwan, F. Schulz, *Molecules* **2011**, *16*, 6092–6115.
- [17] C. Olano et al., *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 87–97.
- [18] X. H. Chen et al., *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4024–4036.
- [19] A. K. El-Sayed, J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 419–430.
- [20] I. Shiina, M. Kubota, H. Oshiumi, M. Hashizume, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1822–1830.
- [21] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [22] Verwendung von Terpenen in der Polyketidsynthese: a) J. Swatschek, L. Grothues, J. O. Bauer, C. Strohmann, M. Christmann, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 976–983; b) P. Winter, J. Swatschek, M. Willot, L. Radtke, T. Olbrisch, A. Schäfer, M. Christmann, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12200–12202.
- [23] G. Köbrich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1967**, *6*, 41–52; *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 15–27.
- [24] J. Germain, P. Deslongchamps, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5269–5278.
- [25] P. Winter, C. Vaxelaire, C. Heinz, M. Christmann, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 394–396.
- [26] J. M. Concellón, H. Cuervo, R. Fernández-Fano, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8983–8987.
- [27] J. Aubé, *Comprehensive Organic Synthesis* B. M. Trost, I. Fleming, Hrsg.: Pergamon: New York, **1999**, I, S. 260.
- [28] a) M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, E. N. Jacobsen, *Science* **1997**, *277*, 936; b) L. P. C. Nielsen, C. P. Stevenson, D. G. Blackmond, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1360–1362.
- [29] M. Colladon, A. Scarso, P. Sgarbossa, R. A. Michelin, G. Strukul, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14006–14007.

Eingegangen am 4. April 2016

Online veröffentlicht am 12. Juli 2016