

Entdeckung einer Mosaik-ähnlichen Biosynthesemaschinerie mit einem decarboxylierenden Entladungsmechanismus durch die Kombination von Genom-Mining und bildgebenden Verfahren

Mahsa Mir Mohseni[†], Thomas Höver[†], Lena Barra, Marcel Kaiser, Pieter C. Dorrestein, Jeroen S. Dickschat und Till F. Schäberle*

Abstract: Das Biosynthesegencluster für den antiplasmodisch wirksamen Naturstoff Siphonazol wurde durch eine Kombination aus Genom-Mining, bildgebenden Verfahren und Expressionsstudien identifiziert. Das Siphonazol-Grundgerüst besteht aus einer vom Shikimat-Stoffwechsel abgeleiteten ungewöhnlichen Startereinheit, Polyketidbausteinen und Aminosäuren. Die Domänen der daran beteiligten Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen haben unübliche Strukturen, darunter einige geteilte Module und eine Vielzahl duplizierter, als inaktiv vorhergesagter Domänen. Die Freisetzung des Produkts von der Biosynthesemaschinerie erfolgt über Wasserabspaltung und Decarboxylierung, unabhängig von der trans-stehenden Thioesterase SphJ, was das Dienmotiv von Siphonazol ergibt. Eine hohe Variation im GC-Gehalt des Clusters und die ungewöhnliche Domänenstruktur weisen auf eine phylogenetisch junge Entstehung hin.

Naturstoffe haben jahrzehntelang eine herausragende Rolle als biologisch aktive Moleküle, Inspiration für Chemiker und als wichtige Quelle für Therapeutika gespielt.^[1,2] Aktuell steht die Naturstoffforschung jedoch vor zwei Dilemmata. Einerseits werden viele Wirkstoffe aufgrund von Resistenzbildungen unbrauchbar; andererseits stockte zugleich die Entwicklung innovativer Wirkstoffe in den letzten zwei Jahrzehnten, da am Nutzen von Naturstoffen als Basis

neuer Leitstrukturen Zweifel bestanden. Dies hat unter anderem den Grund, dass in Bioaktivitäts-basierten Screening-Ansätzen häufig bekannte Strukturen erneut isoliert wurden. Einen auch heute noch vielversprechenden Ansatz stellen bisher kaum untersuchte Organismengruppen dar, z. B. Mikroorganismen, die mit Insekten assoziiert sind oder aus marinen Habitaten stammen, oder auch die diverse Gruppe gleitender Bakterien, die normalerweise komplexe Lebenszyklen durchlaufen und ein großes Potenzial zur Produktion biologischer aktiver Komponenten aufweisen.^[3–7] Hier beschreiben wir die Entdeckung des Biosynthesegenclusters für Siphonazol in *Herpetosiphon* sp. B060, einem Stamm, den wir aus einer Umweltprobe des Gezeitenbereichs isoliert haben. Das Gencluster wurde durch eine Kombination von Genom-Mining, Expressionsanalyse und massenspektrometrischer Bildgebung (IMS) identifiziert und weist eine Mosaik-ähnliche Struktur auf. Es vereint Teile des Shikimat-Stoffwechsels, der Synthese von Polyketiden und nichtribosomal synthetisierter Peptide.^[8] Außerdem scheint die Biosynthese durch einen ungewöhnlichen Terminationsmechanismus gekennzeichnet zu sein, den wir im Detail erforscht haben.

Vor einem Jahrzehnt wurde Siphonazol aus *Herpetosiphon* sp. B060 isoliert, seine Struktur aufgeklärt^[8] und Strategien zur vollständigen Synthese entwickelt.^[9,10] Aber Einzelheiten zur Biosynthese einschließlich des zeitlichen Ablaufs und des zugehörigen Genclusters waren bisher unbekannt. Neben der Expressionsanalyse stellt IMS eine interessante und schnelle Methode dar, um die Produktion eines Naturstoffs nachzuverfolgen. Dieses Verfahren kann direkt an Kulturen auf Agarplatten angewendet werden. Die IMS-Analyse wurde eingesetzt, um den zeitlichen Verlauf der Siphonazol-Produktion zu untersuchen, was Rückschlüsse zur Identifizierung des zugehörigen Genclusters ermöglichte (Abbildung 1 a). Die Produktion des Naturstoffs wurde spezifisch am äußeren Rand schwärmender Kolonien festgestellt, d. h., nur in jungen Zellen. In Kombination mit der Genexpression betrachtet, kann IMS erfolgreich zur Untersuchung von Stämmen verwendet werden, für die keine genetischen Verfahren existieren.

Die Genomdaten von *Herpetosiphon* sp. B060 wurden auf das Vorhandensein von PKS- und NRPS-Sequenzen hin untersucht. So wurden zwei Contigs identifiziert, auf denen jeweils Gencluster lokalisiert sind, die gemischte PKS/NRPS kodieren. Einer dieser Gencluster zeigte hohe Ähnlichkeit zu einem Stoffwechselweg, der ebenfalls in dem verwandten Stamm *Herpetosiphon aurantiacus* zu finden ist, allerdings produziert letzterer kein Siphonazol. Des Weiteren wies die

[*] Dr. M. Mir Mohseni,^[‡] Dr. T. Höver,^[‡] Dr. T. F. Schäberle
Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Bonn, 53115 Bonn (Deutschland)
E-Mail: till.schaeberle@uni-bonn.de

L. Barra, Prof. J. S. Dickschat
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn, 53121 Bonn (Deutschland)

M. Kaiser
Schweizerisches Tropen- und Public-Health-Institut (Swiss TPH)
Basel CH-4002 (Schweiz)

M. Kaiser
Universität Basel, CH-4003 Basel (Schweiz)

Prof. P. C. Dorrestein
Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center
Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences
University of California at San Diego, La Jolla, CA (USA)

[†] Die Autoren trugen gleichwertig bei.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zum Biosynthesegencluster, Analyse der Enzyme und experimentelle Einzelheiten) sind unter: <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606655> zu finden. Zugangsnummer des Siphonazol-Biosynthesegenclusters: KX765816.

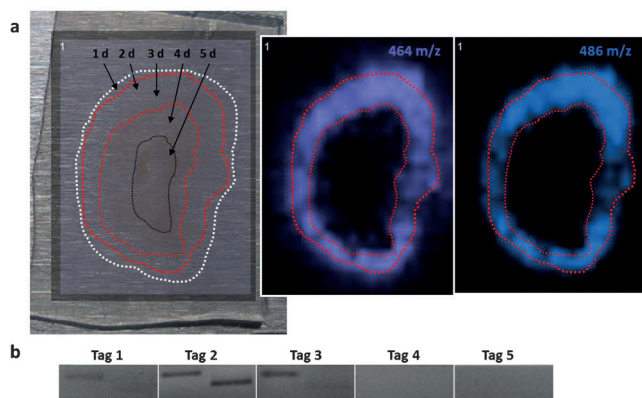
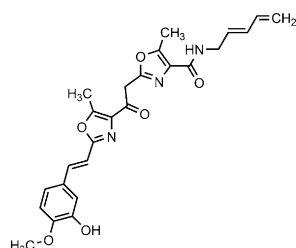


Abbildung 1. a) IMS-Analyse einer aktiv wachsenden Agarplattenkultur von *Herpetosiphon* sp. B060. Die detektierten Ionen m/z 464 und m/z 486 entsprechen Siphonazol $[M+H]^+$ und dem Natriumaddukt $[M+Na]^+$. Die Kultur wurde in dem mit der schwarzen Umrandung gekennzeichneten Bereich inokuliert. Die rote Umrandung kennzeichnet den Bereich der schwärmenden Kolonien, in denen die Zellen 2–3 Tage alt sind. b) Zeitlicher Verlauf des Expressionsprofils der Siphonazol-Biosynthesegene *sphA* und *sphB*.

bioinformatische Analyse der Substratspezifität der Adenylierungs(A)-Domänen dieses Clusters darauf hin, dass Ornithin, Asparagin und Leucin inkorporiert werden. Aber keine dieser Aminosäuren ist in der Siphonazol-Struktur zu erkennen (Schema 1), die aus der Startereinheit methyliertes



Schema 1. Siphonazol-Struktur.

3,4-Dihydroxybenzoat, einem Glycin, zwei Threoninen, drei intakten Acetateinheiten und dem C2 eines vierten Acetats aufgebaut ist (Abbildung S1).^[8] Das zweite potenzielle PKS/NRPS-Gencluster enthält A-Domänen, für welche die bioinformatische Vorhersage die Aktivierung von Glycin und Threonin vorhersagte, wie es für den Siphonazol-Aufbau zu erwarten ist. Des Weiteren wurden in den NRPS-Einheiten Oxidationsdomänen identifiziert, die für die Oxazolinringbildung vonnöten sind. Eine Analyse des Expressionsniveaus der Gene *sphA* und *sphB* zeigte eine starke Expression in jungen Zellen, wobei das Maximum an Tag zwei zu beobachten ist (Abbildung 1b). Dies spiegelt die Ergebnisse der IMS-Untersuchung wider.

Aus der genomischen DNS von *Herpetosiphon* sp. B060 wurde eine Fosmid-Bibliothek hergestellt und mit Primern, die für spezifische Teile des Clusters abgeleitet wurden, untersucht. Dadurch gelang es drei Fosmide, die Teilsequenzen des Clusters tragen, zu identifizieren. Durch die Sequenzierung aller drei Fosmide konnten weite Sequenzbereiche des

Clusters gewonnen werden, und durch PCR mit genomischer DNS als Vorlage wurden die Lücken geschlossen. Dies ermöglichte es, das vermutete Gencluster für die Siphonazol-Biosynthese aufzuklären (Abbildung 2). Es handelt sich um ein aus zehn Genen (*sphA* bis *sphJ*) bestehendes, gemischtes NRPS/*trans*-AT-PKS-Cluster mit einer Länge von 50 kb (Tabelle S1). Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass *sphA* und *sphB* sowie der Bereich von *sphC* bis *sphJ* transkriptionell gekoppelte Einheiten bilden (Abbildung S2).

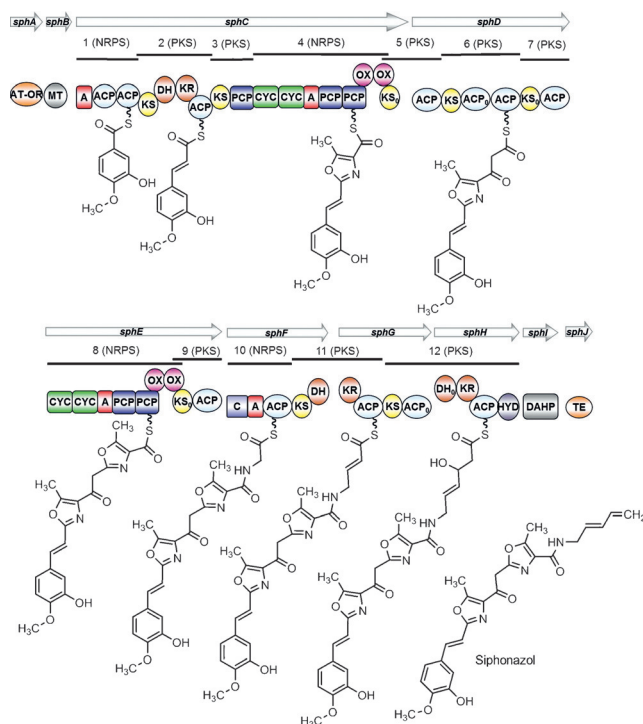
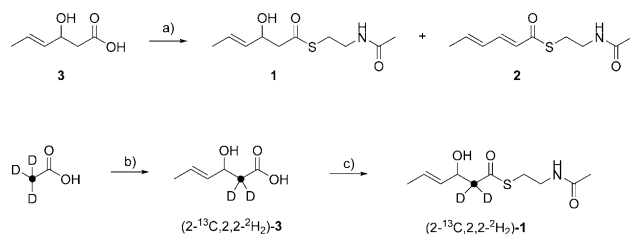


Abbildung 2. Siphonazol-Gencluster und Modell der Biosynthese. A: Adenylierungsdomäne, ACP: Acylträgerprotein, AT-OR: Acyltransferase-Oxidoreduktase, C: Kondensationsdomäne, CYC: Cyclisierungsdomäne, DAHP: 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-Phosphatsynthese, DH: Dehydratase, HYD: Hydrolase, KR: Ketoreduktase, KS: Ketosynthese, MT: Methyltransferase, OX: Oxidationsdomäne, PCP: Peptidträgerprotein, TE: Thioesterase. Domänen die laut bioinformatischer Analyse inaktiv sind, tragen den Index 0.

Das Kernstück des Siphonazol-Biosynthesegenclusters besteht aus zwölf Modulen, vier NRPS und acht *trans*-AT-PKS-Modulen. Weitere integrale Bestandteile sind die O-Methyltransferase SphB, eine C-terminale Hydrolasedomäne aus SphH und die Aldolase SphI (Abbildung 2). Die katalytischen Aktivitäten dieser Enzyme/Enzymdomänen ebenso wie die Aktivierung der Startereinheit wurden im Detail untersucht (siehe die Hintergrundinformationen).

Fütterungsstudien mit (1^{13} C)Acetat zeigten die Decarboxylierung der letzten Acetateinheit nach deren Einbau.^[8] Eine Besonderheit des Siphonazol-Clusters ist, dass das letzte Modul die ungewöhnliche Zusammensetzung $KS-ACP_0-DH_0-KR-ACP-HYD$ mit einer C-terminalen Hydrolase aufweist. Eine bioinformatische Analyse der diskreten Thioesterase (TE) SphJ wies darauf hin, dass dieses Enzym eine Korrekturfunktion erfüllt, um Substrate von falsch beladenen ACPs

wieder freizusetzen, und somit nicht für die katalytische Abspaltung des fertigen Siphonazols zuständig ist. Um experimentell zu untersuchen, wie die Domänen des letzten Moduls am Ein- und Umbau der vierten inkorporierten Malonyl-CoA-Einheit beteiligt sind und welche Domänen im Besonderen die Abspaltung des Produkts bewirken – letzteres unter Umständen in konzentrierter Weise mit der diskreten TE SphJ –, wurden der C-terminale Teil von SphH (ACP-HYD, im weiteren SphH_{Cterm} genannt) und SphJ heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Abbildungen S21, S22). Da das natürliche Substrat, welches an das ACP von SphH_{Cterm} gebunden vorliegt, schwer zu erzeugen ist, wurden kurze Substratanaloga zur Untersuchung der Enzymaktivität verwendet. Diese wurden ausgehend von 3-Hydroxyhex-4-ensäure (**3**) synthetisiert.^[11] Die Säure wurde zum entsprechenden *N*-Acetylcystamin-Thioester (SNAC-Ester) **1** mittels EDC als Kupplungsreagenz umgesetzt (Schema 2). Als Nebenprodukt dieser Reaktion wurde der SNAC-Ester der Sorbinsäure (**2**) isoliert. Des Weiteren wurde, um den Enzymmechanismus genauer zu untersuchen, der isotoopenmarkierte Stoff (2-¹³C,2,2-²H₂)-**1** durch Aldoladdition von (2-¹³C,2,2-²H₃)Essigsäure zu (*E*)-Crotonaldehyd und Umsetzung in den entsprechenden SNAC-Ester synthetisiert.



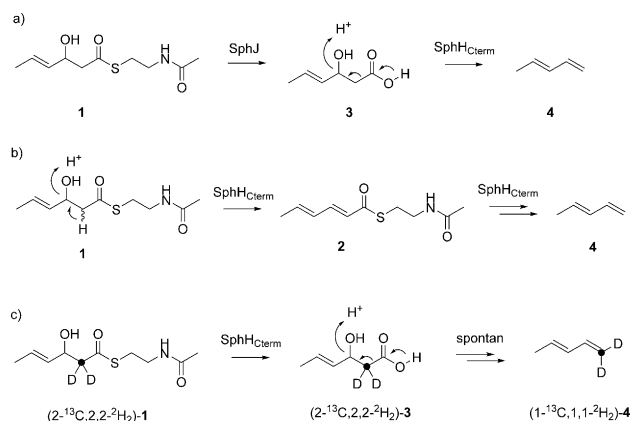
Schema 2. Synthese der Substratanaloga **1–3**, welche für die In-vitro-Experimente verwendet wurden. a) EDC, DMAP, HSNAC, 70% **1** und 4% **2**; b) *n*BuLi (1 Äquiv.), LDA (1 Äquiv.), dann (*E*)-Crotonaldehyd, 85%; c) DCC, DMAP, HSNAC, 47%. EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, HSNAC = *N*-Acetylcystamin, LDA = Lithiumdiisopropylamid, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid.

Die synthetischen Substratanaloga wurden mit unterschiedlichen Enzympräparationen inkubiert und die daraus resultierende Entstehung von Pentadien, das analog zum Naturstoff Siphonazol gebildet wird, wurde gemessen. Dies war durch eine Anreicherung der bei der Reaktion entstehenden flüchtigen Substanzen an einer Festphasenmikroextraktions(SPME)-Faser mit anschließender GC/MS-Analyse möglich.^[12] Inkubation von **1** mit SphH_{Cterm} und SphJ hatte eine starke Produktion von Pentadien (**4**) zur Folge (Tabelle 1 und Abbildung S14), was in Übereinstimmung mit einem Mechanismus ist, bei dem durch SphJ zunächst der Thioester **1** zur Säure **3** hydrolysiert wird und dann eine Decarboxylierung und Dehydratisierung durch SphH erfolgt (Schema 3a). Aber durch dieses Experiment konnte die Beteiligung eines der beiden Enzyme nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu ermöglichen, wurde der Thioester **1** jeweils auch mit SphJ und SphH_{Cterm} alleine inkubiert. Tatsächlich resultierte die Inkubation von **1** mit SphJ alleine nicht

Tabelle 1: Ergebnis der Inkubationsexperimente mit den Substraten **1–3**, (2-¹³C,2,2-²H₂)-**1** und unterschiedlichen Enzymkombinationen.

Substrat	SphH _{Cterm} + SphJ	SphJ	SphH _{Cterm}	Kontrolle
1	+	–	+	–
(2- ¹³ C,2,2- ² H ₂)- 1	n.b.	n.b.	+	–
2	–	–	–	–
3	n.b.	n.b.	+	+

+: Pentadienproduktion, –: keine Pentadienproduktion, n.b.: nicht bestimmt.



Schema 3. Mögliche Mechanismen der Produktfreisetzung in der Siphonazol-Biosynthese. a) Hydrolyse des Thioesters durch SphJ und Dehydratisierung-Decarboxylierung durch SphH_{Cterm}. b) Zunächst Dehydratisierung durch SphH_{Cterm}, gefolgt von der Hydrolyse des Thioesters und Decarboxylierung durch das gleiche Enzym. c) Hydrolyse des Thioesters durch SphH_{Cterm}, gefolgt von spontaner/konzertierter Dehydratisierung und Decarboxylierung.

in der Produktion von **4** (nur Spuren, wie auch im Kontrollexperiment ohne Enzym, konnten detektiert werden), während bei der Inkubation mit SphH_{Cterm} alleine **4** in gleichen Mengen, wie zuvor bei der Inkubation mit beiden Enzymen beobachtet, gebildet wurde. Diese Ergebnisse stellen die Beteiligung der TE SphJ im Terminationsmechanismus der Siphonazol-Biosynthese in Frage und stützen die vorhergesagte Korrekturfunktion. Stattdessen werden Produktfreisetzung, Decarboxylierung und Dehydratisierung durch SphH_{Cterm} katalysiert.

Die Frage, welche dieser drei Reaktionen als erste stattfindet, wurde durch Experimente mit den Substraten (2-¹³C,2,2-²H₂)-**1**, **2** und **3** aufgeklärt. Wenn die Hydrolyse des Thioesters als erstes stattfinden würde, dann würden die folgende Dehydratisierung und die Decarboxylierung einen konzentrierten Prozess darstellen (Schema 3b). Die Verwendung des isotoopenmarkierten Substrats (2-¹³C,2,2-²H₂)-**1** ermöglichte diese Untersuchung, da dieses zunächst zur freien Säure (2-¹³C,2,2-²H₂)-**3** hydrolysiert. Protonierung der Hydroxyfunktion in (2-¹³C,2,2-²H₂)-**3** und Eliminierung von Wasser könnten dann eine spontane Decarboxylierung induzieren. Über diesen Mechanismus sollten beide Deuteriumatome und die ¹³C-Markierung im Produkt (1-¹³C,1,1-²H₂)-**4** erhalten bleiben. Dies war der Fall, wie im Inkubationsexperiment mit SphH_{Cterm} und (2-¹³C,2,2-²H₂)-**1** gezeigt wurde (Abbildung S15; Massenspektrum des entstandenen

($1\text{-}^{13}\text{C}, 1, 1\text{-}^2\text{H}_2$)-**4** in Abbildung S16). Dieses Ergebnis des Markierungsexperiments spricht auch gegen einen Mechanismus bei dem die Dehydratisierung von **1** zu **2** den ersten Schritt darstellt, da dies den Verlust eines Deuteriums am C_α nach sich ziehen würde. Ebenso resultierte weder die Inkubation von **2** mit $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$, noch mit SphJ , oder beiden zusammen in der Produktion von **4** (Tabelle 1 und Abbildung S17) – all das ist in Übereinstimmung mit der Korrekturfunktion der TE SphJ . Falls die Hydrolyse des Esters der erste Schritt wäre, dann sollte Substrat **3** durch $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$ zu **4** umgesetzt werden, wie dies auch experimentell beobachtet wurde (Tabelle 1 und Abbildung S18). Jedoch wurden ähnliche Mengen von **4** auch im Kontrollexperiment ohne Enzym gefunden, was nahelegt, dass $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$ lediglich die Hydrolyse des Thioesters katalysiert, während die Decarboxylierung-Dehydratisierung von **3** zu **4** vermutlich eine spontane Reaktion in Wasser ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die katalytische Aktivität von $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$ für die Umsetzung des natürlichen Substrats vonnöten ist.

Bei der Testung der biologischen Aktivität des Siphonazols wurde Zytotoxizität festgestellt, aber dieser Effekt (durchschnittlicher IC_{50} -Wert gegen eine Testreihe von 36 Krebszelllinien war $5.90\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $12.74\text{ }\mu\text{M}$) war zu gering für eine weitere Untersuchung als Antikrebsmittel. Ebenso wurde in nicht-zytotoxischen Konzentrationen keine antivirale Aktivität festgestellt (getestet wurden: Coxsackie-Virus B3, Influenza-Virus A, Herpes-simplex-Virus Typ 1). Antibakterielle oder antifungale Effekte wurden nicht beobachtet. Stattdessen zeigte Siphonazol Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* (IC_{50} : $0.59\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $1.27\text{ }\mu\text{M}$; Tabelle S2).

Der Aufbau des Siphonazol-Biosynthesegenclusters zeigt mehrere Eigenheiten, was bei *trans*-AT-PKSn häufig vorkommt und als ein Hinweis auf horizontalen Gentransfer zu werten ist. Bisher blieben die meisten Versuche, ein Gencluster zielgerichtet zu verändern, ineffektiv. Das hier untersuchte Cluster aus *Herpetosiphon* sp. B060 ist ein Beispiel, bei dem die Natur erst jüngst rekombinatorische Biosynthese betrieben hat und ein biologisch aktiver Naturstoff entstanden ist – ein gewünschtes Resultat für viele Ansätze der synthetischen Biologie. Durch zukünftige Untersuchungen des Siphonazol-Clusters könnten neue Erkenntnisse gewonnen werden um „nicht-natürliche Naturstoffe“ zu erzeugen. Des Weiteren sind aus Sicht der synthetischen Biologie neue funktionale Bausteine wünschenswert. Die hier untersuchte Hydrolyse eines Thioesters durch $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$ stellt solch eine Funktionalität für PKS-Systeme dar und ist eine Vorbedingung für die anschließende, vermutlich spontane Decarboxylierung-Dehydratisierung des freigesetzten Moleküls. Ein ähnlicher terminaler Alkenrest wurde auch in der Biosynthese des Antikrebsmittels Curacin A beobachtet.^[13] Allerdings wird in der Curacin-A-Biosynthese zunächst eine Sulfonatgruppe auf die β -Hydroxyfunktion übertragen, was diese zu einer besseren Abgangsgruppe macht. Die darauffolgende decarboxylierende Eliminierung ist dann durch die TE katalysiert. In der Siphonazol-Biosynthese hingegen ist $\text{SphH}_{\text{Cterm}}$ ausreichend, und das hier verwendete vereinfachte Substratanalogon weist auf eine Promiskuität des Enzyms hin, die auch für weitere Umsetzungen genutzt werden

könnte. Die vielversprechende antiplasmodische Aktivität des Siphonazols wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, da zusätzliche, erschwingliche Behandlungsoptionen benötigt werden, um eine Eindämmung der von *Plasmodium falciparum* ausgelösten Malaria zu erreichen.^[14]

In dieser Arbeit wurde ein Arbeitsablauf vorgestellt, der es ermöglicht, Biosynthesegencluster und den zu untersuchenden Metaboliten direkt zu verknüpfen. Solche Ansätze sind notwendig, um die Identifizierung von Genclustern zu beschleunigen, auch wenn lediglich unvollständige Genomdaten zur Verfügung stehen; im Besonderen wenn mit Organismen gearbeitet wird, die genetisch nicht zugänglich sind. Um das zugehörige Gencluster einem Metaboliten zuordnen zu können, wurde IMS verwendet. Diese bildgebende Methode ermöglicht es, das Metabolom einzelner und verschiedener Organismen direkt auf Agarplatten zu verfolgen^[15,16] und erleichtert die Identifizierung des zu einem Naturstoff gehörigen Genclusters. Durch die Zunahme verfügbarer Sequenzdaten wurde die Diskrepanz zwischen bioinformatisch identifizierten Biosynthesegenclustern und tatsächlich bekannten Metaboliten deutlich – eine große Ressource die genutzt werden sollte. Daher müssen neue Mikroorganismen, am besten von bisher wenig untersuchten ökologischen Nischen, kultivierbar gemacht werden, wie das kürzlich für den Teixobactin-Produzenten gelang.^[17] Ebenso sollten metagenomische Ansätze verstärkt werden, um eine Basis zur Auffindung neuer Gencluster für zukünftige Leitstrukturen zu bilden. Dann kann eine Massenspektrometrie-basierte Analyse in Kombination mit Expressionsprofilen zu einer schnellen Verknüpfung von Genen und Metaboliten führen.

Danksagung

M.M.M. wurde von der NRW International Graduate Research School BIOTECH-PHARMA unterstützt. Arbeiten im Labor von T.F.S. waren durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert. Dem Boehringer Ingelheim Fonds sei für Reisegelder an T.F.S. gedankt.

Stichwörter: Biosynthese · Genom-Mining · Massenspektrometrische Bildgebung (IMS) · Naturstoffe · Siphonazol

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13611–13614
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13809–13813

- [1] C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469–2493.
- [2] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
- [3] T. F. Schäberle, F. Lohr, A. Schmitz, G. M. König, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 953–972.
- [4] S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12*, 220–230.
- [5] C. Beemelmanns, H. Guo, M. Rischer, M. Poulsen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 314–327.
- [6] A. Dávila-Céspedes, P. Hufendiek, M. Crüsemann, T. F. Schäberle, G. M. König, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 969–984.
- [7] J. Korp, M. S. V. Gurovic, M. Nett, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 594–607.

- [8] M. Nett, O. Erol, S. Kehraus, M. Köck, A. Krick, E. Eguereva, E. Neu, G. M. König, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3863–3867; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3947–3951.
- [9] J. Linder, C. J. Moody, *Chem. Commun.* **2007**, 1508–1509.
- [10] J. Zhang, M. A. Ciufolini, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2389–2392.
- [11] B. D. Ames, C. Nguyen, J. Bruegger, P. Smith, W. Xu, S. Ma, E. Wong, S. Wong, X. Xie, J. W. Li, J. C. Vederas, Y. Tang, S. C. Tsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11144–11149.
- [12] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 838–861.
- [13] L. Gu, B. Wang, A. Kulkarni, J. J. Gehret, K. R. Lloyd, L. Gerwick, W. H. Gerwick, P. Wipf, K. Håkansson, J. L. Smith, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16033–16035.
- [14] P. G. Walker, J. T. Griffin, N. M. Ferguson, A. C. Ghani, *Lancet Glob. Health.* **2016**, Jun 3. pii: S2214-109X(16)30073-0.
- [15] Y. L. Yang, Y. Xu, P. Straight, P. C. Dorrestein, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 885–887.
- [16] a) Y. L. Yang, Y. Xu, R. D. Kersten, W. T. Liu, M. J. Meehan, B. S. Moore, N. Bandeira, P. C. Dorrestein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5839–5842; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5961–5964.
- [17] L. L. Ling, T. Schneider, A. J. Peoples, A. L. Spoering, I. Engels, B. P. Conlon, A. Mueller, T. F. Schäberle, D. E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V. A. Steadman, D. R. Cohen, C. R. Felix, K. A. Fetterman, W. P. Millett, A. G. Nitti, A. M. Zullo, C. Chen, K. Lewis, *Nature* **2015**, *517*, 455–459.

Eingegangen am 12. Juli 2016,
veränderte Fassung am 29. August 2016
Online veröffentlicht am 26. September 2016