

Maleidridbiosynthese

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201511882
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201511882

Heterologe Produktion pilzlicher Maleidride enthält die kryptische Cyclisierung in ihrer Biosynthese

Katherine Williams,* Agnieszka J. Szwalbe, Nicholas P. Mulholland, Jason L. Vincent, Andrew M. Bailey, Christine L. Willis, Thomas J. Simpson und Russell J. Cox*

Abstract: Die von Pilzen produzierten Maleidride sind eine wichtige Klasse bioaktiver Sekundärmetaboliten, die aus sieben-, acht- oder neungliedrigen Carbocyclen bestehen. Jeder Cyclus ist mit einem oder zwei anellierten Maleinsäureanhydridresten substituiert. Durch Gen-Knockouts und heterologe Expressionsexperimente wurde die Biosynthese von Byssochlaminsäure (ein Nonadrid) und Agnestadrid A (ein Heptadrid) untersucht. Unsere Experimente zeigen, dass der Vorläufer der Cyclisierung von einer iterativen, vollständig reduzierenden, pilzlichen Polyketidsynthese erzeugt wird, die durch eine Hydrolase und zwei Citrat-verarbeitende Enzyme unterstützt wird. Die ungewöhnliche Cyclisierung wird zum einen von zwei Proteinen katalysiert, die Homologien zu Ketosteroidisomerasen aufweisen, und zum anderen von zwei weiteren Proteinen mit Homologien zu Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteinen.

Maleidride sind bioaktive, carbocyclische Verbindungen mit einem oder zwei Maleinsäureanhydridresten, die von Pilzen produziert werden. Die in den 1930er Jahren von Raistrick und Smith entdeckte Byssochlaminsäure (**1**; Abbildung 1) ist eines der ersten entdeckten Maleidride; ihre Struktur konnte in den 1960ern aufgeklärt werden.^[1–4] Im selben Zeitraum wurden auch die Strukturen ihrer Isomere Glaucansäure (**2**)^[3] und Heveadrid (**3**)^[5] aufgeklärt. Aktuellere Beispiele sind unter anderem Phomoidrid A (**4**); ein

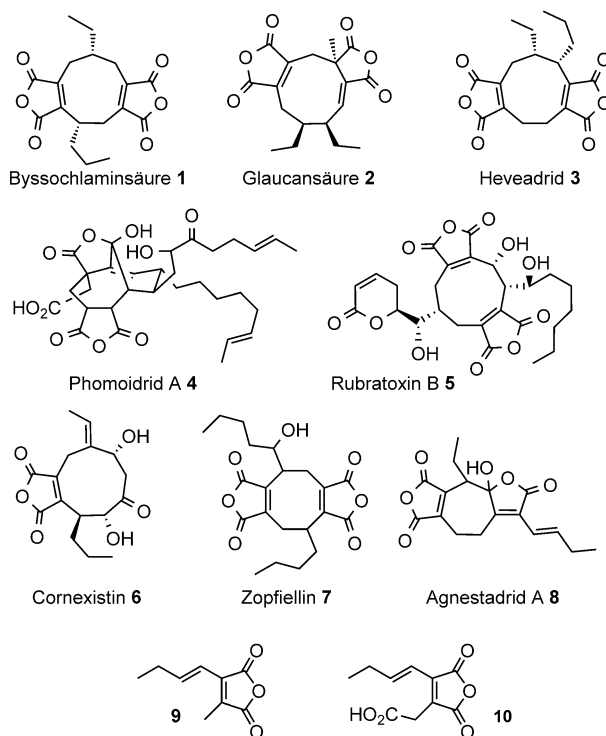


Abbildung 1. Beispiele von Maleidriden und die hypothetischen Vorläufer.

[*] Dr. K. Williams, Prof. R. J. Cox
Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 (Deutschland)
E-Mail: katherine.williams@oci.uni-hannover.de
russell.cox@oci.uni-hannover.de

A. J. Szwalbe, Prof. C. L. Willis, Prof. T. J. Simpson, Prof. R. J. Cox
School of Chemistry, University of Bristol, Cantock's Close, Bristol,
BS8 1TS (Großbritannien)

Dr. N. P. Mulholland, Dr. J. L. Vincent
Syngenta, Jealott's Hill
Bracknell, Berkshire, RG42 6EY (Großbritannien)

Dr. A. M. Bailey
School of Biological Sciences, Bristol Life Sciences Building
University of Bristol
24 Tyndall Ave, Bristol BS8 1TH (Großbritannien)

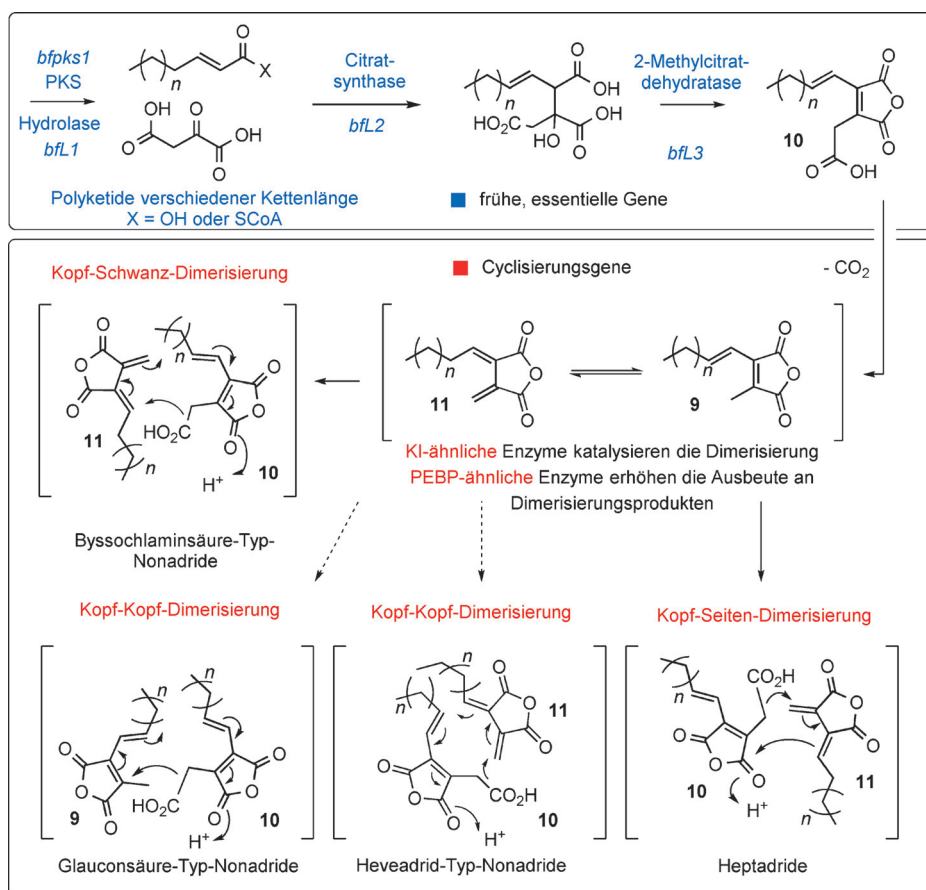
Hintergrundinformationen (experimenteller Teil) und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511882> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Inhibitor der Squalensynthese und der Ras-Farnesyltransferase),^[6] Rubratoxine wie **5** (Unterdrückung von Krebsmetastasen),^[7] Cornexistin (**6**; potentes und selektives Herbizid)^[8] und Zopfiellin (**7**).^[9] Weiterhin sind auch Heptadride bekannt, wie Agnestadrid A (**8**), das zusammen mit Byssochlaminsäure (**1**) aus *Byssochlamys fulva* isoliert wurde.^[10]

1965 postulierten Barton und Sutherland eine Biosynthese von **1**, **2** und **3**.^[3] Das C₉-Maleinsäureanhydrid-Monomer **9** wurde als Startbaustein der Biosynthese vorgeschlagen und die unterschiedliche Substitution durch entsprechende Kopf-Schwanz- oder Kopf-Kopf-Dimerisierung erklärt. Die molekulare Basis der Dimerisierung ist jedoch bisher nicht bekannt.

In einer weiteren Analyse der von *B. fulva* produzierten Metaboliten konnte das wahrscheinlich eigentliche Monomer **10** entdeckt werden, das zu **9** decarboxyliert. Es wird angenommen, dass das mutmaßliche *exo*-Methylenintermediat **11** (Schema 1)^[10] ebenfalls aus einer Decarboxylierung hervorgeht und dass durch Cyclisierung mit einem zweiten Molekül von **10** die Byssochlaminsäure (**1**) entsteht. Eine andere Form



Scheme 1. Vorgeschlagene allgemeine Biosynthese von Maleidriden.

der Dimerisierung von **10** (Kopf-Seiten-Dimerisierung) erklärt die Biosynthese von Agnestadrid A (**8**).^[10]

Barton und Sutherland postulierten darüber hinaus, dass das Monomer **9** ein modifiziertes Produkt des Citratzyklus ist, das aus einem polyketidischen Hexanoat und Oxalactetat entsteht.^[3] Gestützt wurde diese Hypothese durch Fütterungsstudien mit Isotopen-markierten Substraten.^[11] Darauf basierend sollte ein mögliches Maleidrid-Biosynthesecollier (Maleidrid-BGC) zusätzlich zum Gen einer vollständig reduzierenden Polyketidsynthase (hrPKS)^[12] auch ein Gen enthalten, das für ein Citratsynthase-ähnliches Enzym codiert.^[13]

Auf Grundlage dieser Hypothese haben wir das Genom von zwei *B. fulva*-Stämmen, IMI 40021 und IMI 58422, sequenziert, die mit dem von Raistrick und Smith ursprünglich untersuchten Stamm verwandt sind.^[1] Erstgenannter ist ein verlässlicher, guter Produzent von **1**, wohingegen **1** von *B. fulva* IMI 58422 nur unzuverlässig und schlecht produziert wird. Mithilfe einer BLAST-Analyse^[14] wurden die Genome beider Stämme auf potenzielle Maleidrid-BGCs untersucht, und es konnten zwei homologe mögliche Maleidrid-BGCs identifiziert werden (Abbildung 2). Jedes BGC enthält ein hrPKS, ein Citratsynthase-ähnliches Enzym und diverse andere interessante Gene, unter anderem eine Methylcitrat-Dehydratase. Eine Transkriptomanalyse von *B. fulva* IMI 40021 unter Byssochlaminsäure-produzierenden und

-nichtproduzierenden Bedingungen bestätigte, dass das putative BGC sehr differenziert exprimiert wird (Abbildung 2). Die beiden BGCs sind zu >97% identisch, unterscheiden sich jedoch in ihrer *bfr4*-Promotorregion, was die geringere Produktion des IMI-58422-Stammes erklären könnte (siehe Hintergrundinformationen).

Eine weitere BLAST-Suche^[14] mit der Sequenz von *bfpks1* und der Sequenz des Citratsynthase-ähnlichen Gens (*bfl2*) in den beim NCBI hinterlegten Genomen identifizierte weitere Maleidrid-ähnliche BGCs in verschiedenen Pilzen. In *Talaromyces stipitatus* wurden zwei BGCs gefunden. Es ist bekannt, dass viele *Talaromyces* sp. Glauconsäure (**2**) und das komplexere Rubratoxin B (**5**) produzieren.^[15] Ein drittes BGC wurde in *Cochliobolus* sp. gefunden. *Cochliobolus* sp. sind auch als *Helminthosporium* bekannt, die Heveadrid (**3**) produzieren.^[5,16]

Das *bfpks1*-Gen, das für die PKS codiert, wurde mithilfe der Bi-partite-Methode^[17] abgeschaltet. Es konnte gezeigt werden,

dass der daraus resultierende Stamm *B. fulva* *bΔpks1* weder **1** noch **8** produzieren konnte (Abbildung 3 A,B). Dieser Befund ist im Einklang mit der Annahme, dass das Heptadrid **8** aus dem gleichen Biosyntheseweg stammt wie **1**.

In jüngsten Untersuchungen von Oikawa et al. zur Biosynthese von Phomoidrid A (**4**) wurde ein BGC entdeckt, das, wie die beiden Maleidrid-Typ-BGCs aus *Talaromyces stipitatus*, eine hrPKS, ein Citratsynthase-ähnliches Enzym und eine Methylcitrat-Dehydratase enthält.^[18] Heterologe Expression der drei Gene aus einem der *T. stipitatus*-BGCs führte zur Isolierung eines länger-kettigen, decarboxylierten Monomers. Durch diese Experimente konnte der Polyketid/Oxaloacetat-Ursprung der Maleidridmonomere bestätigt werden.^[18] Allerdings ist weiterhin nicht bekannt, welche Proteine für die Schlüsselcyclisierung in der Maleidridbiosynthese verantwortlich sind.

Ein Vergleich der beiden *B. fulva*-BGCs mit den hier identifizierten BGCs resultierte in vier hochkonservierten Genen, die für die heterologen Expressionsexperimente in *Aspergillus oryzae* NSAR1 ausgewählt wurden:^[19,20] die hrPKS, *bfpks1*; das Citratsynthase-ähnliche Gen, *bfl2*; die Methylcitrat-Dehydratase, *bfl3*; und die Hydrolase 341, *bfl1*. Das letztgenannte Gen codiert für ein Protein, das homolog zu Typ-II-Thiolesterasen, wie RifR, ist^[21] und in der Ablösung von anomalen ACP-gebundenen Polyketidintermediaten während der modularen Polyketidbiosynthese eine

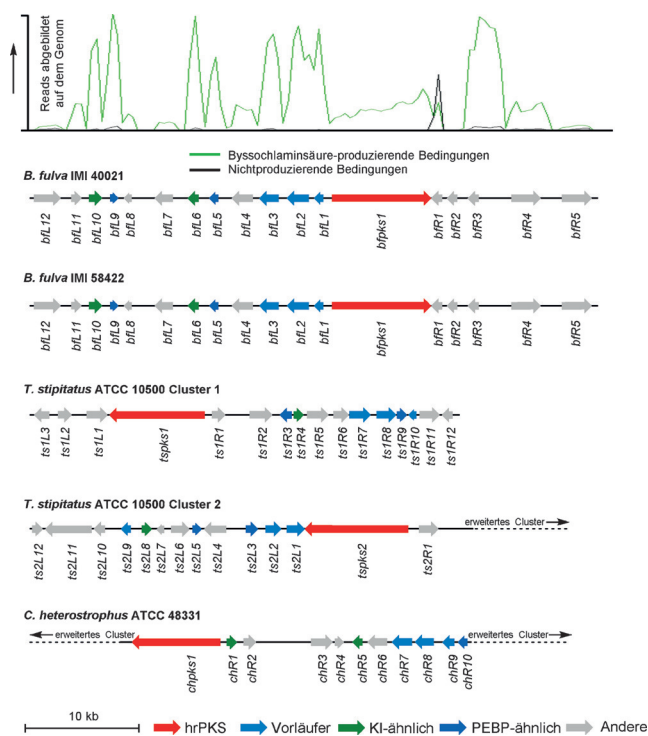


Abbildung 2. Oben: Transkriptomanalyse des Biosynthese-Genclusters von Byssochlaminsäure (**1**) in *B. fulva* IMI 40021 unter produzierenden (grün) und nichtproduzierenden Bedingungen (schwarz). Unten: vergleichende Genomanalyse anderer möglicher Maleidrid-BGCs.

Rolle spielt. Außerdem ist es homolog zu LovG, welches das Lovastatin-Nonaketid von seiner PKS löst.^[22]

Die Expression dieser vier essentiellen Gene in *A. oryzae* NSAR1 (Stämme AO-BF-PMCH 1–7) führte zur Produktion von **9** und **10** (Abbildung 3D). Es ist bereits bekannt, dass **9** das Produkt der Decarboxylierung des sehr instabilen **10** ist.^[10] Außerdem wurden noch *bfpks1*, *bfl2* und *bfl3* in Abwesenheit des Gens *bfl1*, das für die Hydrolase codiert, exprimiert. Unter diesen Bedingungen konnte keine Produktion von **9** oder **10** beobachtet werden (siehe Hintergrundinformationen), woraus sich schließen lässt, dass die Hydrolase essentiell für die Biosynthese von Byssochlaminsäure (**1**) ist.

Für die Biosynthese des von Oikawa et al. aus heterologen Expressionsstudien isolierten, länger-kettigen, decarboxylierten Monomers wurde die Beteiligung einer zusätzlichen nativen Decarboxylase vorgeschlagen.^[18] Durch den Vergleich der charakteristischen LCMS-Daten des in unseren Experimenten isolierten Naturstoffes **10** und einer entsprechenden synthetischen Referenzprobe konnte gezeigt werden, dass die Decarboxylierung von **10** zu **9** spontan verläuft. Demnach wird zumindest die Decarboxylierung von kurz-kettigen Maleinsäureanhydriden nicht enzymatisch katalysiert.^[10]

Um den Mechanismus der Dimerisierung aufzuklären, wurden weitere Gene heterolog exprimiert. In einer ersten Vergleichsstudie von BCGs verschiedener Organismen (Abbildung 2) wurden, außer den essentiellen Genen, noch zwei weitere Gene identifiziert, die in allen untersuchten BGCs

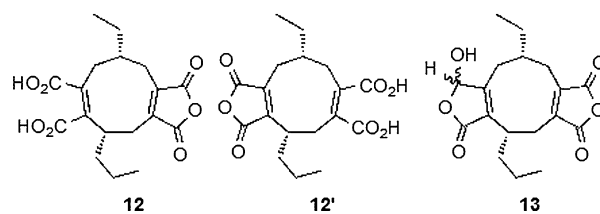
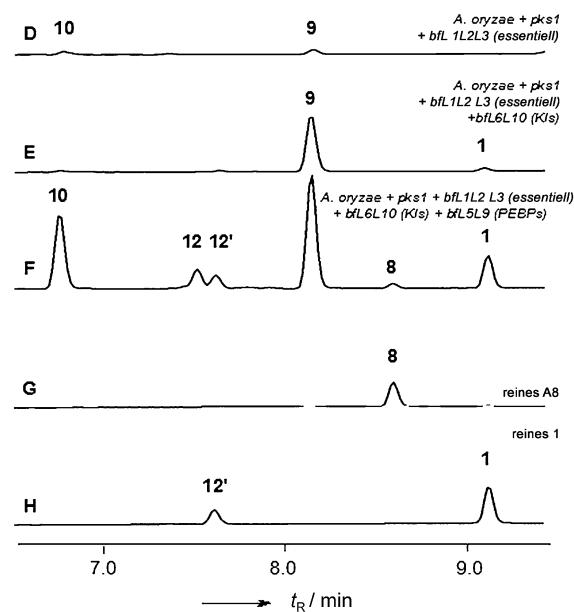
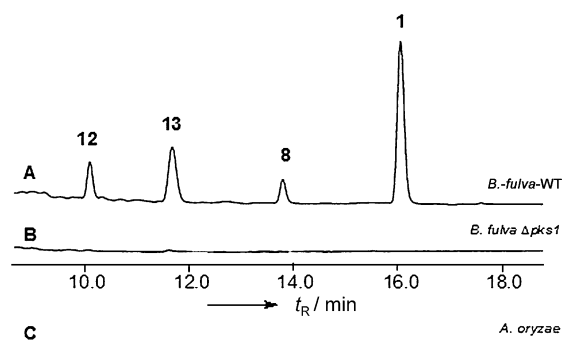


Abbildung 3. HPLC-Chromatogramme (DAD, 210–600 nm). A) Extrakt von *B. fulva*-WT; B) Extrakt von *B. fulva* $\Delta pks1$; C) Extrakt des nicht-transformierten Stammes *A. oryzae* NSAR1; D) Extrakt des *A. oryzae*-Transformanten BF-PMCH; E) Extrakt des *A. oryzae*-Transformanten BF-PMCH + KIs; F) Extrakt des *A. oryzae*-Transformanten BF-PMCH + KIs + PEBPs; G) gereinigtes **8**; H) gereinigtes **1**, **12**, **12'** und **13** sind Cometaboliten von **1** und wurden im Vorfeld identifiziert und charakterisiert.^[10]

vorhanden sind und jeweils in ein oder zwei Kopien vorliegen. Diese codieren für ein mutmaßliches Ketosteroidisomerase-ähnliches (KI-ähnliches) und ein mutmaßliches Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein (PEBP).

Heterologe Coexpression der beiden KI-ähnlichen (*bfl6* und *bfl10*) und der essentiellen Gene (*bfpks1*, *bfl1*, *bfl2* und *bfl3*) (Stämme AO-BF-PMCH + KIs 1–21) resultierten in der Produktion von **1** und des decarboxylierten Intermediats **9** in verschiedenen Transformanten (Abbildung 3E). In

geringen Konzentrationen wurden außerdem **8** und das Intermediat **10** detektiert (siehe Hintergrundinformationen). Dieser Befund zeigt, dass die Expression der vier essentiellen „Monomer“- und der KI-ähnlichen Gene in *A. oryzae* NSAR1 ausreichend ist, um sowohl Nonadride als auch Heptadride zu produzieren.

Um aufzuklären, ob beide KI-ähnlichen Gene für die Dimerisierung essentiell sind oder ob jedes KI-ähnliche Gen eine unterschiedliche Dimerisierung (Nonadrid/Heptadrid) kontrolliert, wurden die essentiellen „Monomer“-Gene jeweils mit KI1 (*bfl6*) oder KI2 (*bfl10*) coexprimiert (Stämme AO-BF-PMCH + KI1 1–7 und AO-BF-PMCH + KI2 1–7). Für beide Stämme konnte in unterschiedlichen Transformanten nur die Produktion von **9** und **10** gezeigt und kein Dimerisierungsprodukt detektiert werden (siehe Hintergrundinformationen). Die Genexpression von KI1 und KI2 in allen Experimenten wurde durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion bestätigt, was darauf schließen lässt, dass die essentiellen „Monomer“-Gene und KI1 oder KI2 in *A. oryzae* NSAR1 alleine nicht ausreichen, um die Dimerisierung zu katalysieren.

In der Vergleichsstudie von BCGs wurden weitere Gene identifiziert, die für PEBP-ähnliche Proteine codieren und sich in allen Maleidrid-BCGs wiederfinden (Abbildung 2). Diese beiden PEBP-Gene (*bfl5* und *bfl9*) wurden zusammen mit den essentiellen und den KI-ähnlichen Genen in *A. oryzae* NSAR1 coexprimiert (Stämme AO-BF-PMCH + KIs + PEBPs 1–8). In den Extrakten dieser Stämme konnten keine neuen Verbindungen identifiziert werden. Beim quantitativen Vergleich mit Stämmen ohne PEBP-Gene zeigten Stämme mit PEBP- und KI-Genen jedoch eine über 20-fache Zunahme der biosynthetischen Produktion von **1** (Abbildung 3F; bis zu 44 mg L⁻¹) sowie einen entsprechenden Anstieg der Produktion von Heptadrid **8**. Die in diesen Experimenten isolierte Byssochlaminsäure (**1**) war chromatographisch und spektroskopisch identisch zu **1** aus *B. fulva*-WT (WT = Wildtyp; siehe Hintergrundinformationen). Die beobachteten Verbindungen **12** und **12'** entstehen vermutlich in vitro durch unvollständige Hydrolyse von **1** im Extraktions- und Analyseprozess. Das reduzierte Produkt **13** dagegen wurde nicht in *A. oryzae* identifiziert, was darauf schließen lässt, dass an der Biosynthese von **13** in *B. fulva* ein weiteres Enzym beteiligt ist.

Folglich konnte die Biosynthese von Byssochlaminsäure (**1**) und Agnestadrid A (**8**) durch Genom- und Transkriptomsequenzierung sowie Gen-Knockouts und heterologe Genexpression vollständig aufgeklärt werden. Mutmaßliche Maleidrid-BCGs wurden in den Genomen der *Talaromyces* und *Cochliobolus* sp. identifiziert. Beide Gattungen sind als Nonadridproduzenten bekannt. Durch den Vergleich des Byssochlaminsäureclusters mit mutmaßlichen Maleidrid-BCGs konnte ein Set von Genen identifiziert werden, das in allen fünf Biosyntheseclustern enthalten ist. Die heterologe Expression von vier dieser Gene (*bfpks1*, *bfl1*, *bfl2* und *bfl3*) in *A. oryzae* NSAR1 resultierte in der Produktion des Monomers **10**, das spontan zu **9** decarboxyliert. Beide Verbindungen wurden bereits in Extrakten von *B. fulva*-WT detektiert.^[10] Es wurde gezeigt, dass für den Dimerisierungsprozess eine Coexpression der essentiellen „Monomer“- und

beider KI-ähnlichen Gene notwendig ist. Außerdem konnte durch Coexpression der essentiellen „Monomer“-Gene mit beiden KI-ähnlichen Genen und beiden PEBPs eine deutlich erhöhte Ausbeute an Dimerisierungsprodukten erhalten werden. Der Mechanismus der Dimerisierung ist unbekannt und muss durch nachfolgende In-vitro-Experimente aufgeklärt werden.

Die vorgeschlagene allgemeine Biosyntheseroute zu Maleidriden basiert auf vorangegangenen biosynthetischen Untersuchungen, unseren Ergebnissen zur Biosynthese von Byssochlaminsäure und der Forschung von Oikawa et al.^[18] (Schema 1). Auch wenn die ersten Schritte aller Maleidridbiosynthesen sehr ähnlich sind, können Polyketidketten unterschiedlicher Länge und Sättigung als Startbausteine fungieren. Zum Beispiel werden bei der Biosynthese von **1–3**, **6** und **8** Triketide, der von **5** Pentaketide und der von **4** Hexaketide als Startbausteine umgesetzt. Die Freisetzung des Polyketids von der PKS wird vermutlich durch die Hydrolase Bfl1 katalysiert, allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, ob das Polyketid als freie Säure oder CoA-Thioester vorliegt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit aktuellen Arbeiten von Oikawa et al., die zeigten, dass die Hydrolase im Falle einer *Talaromyces*-PKS nicht benötigt wird.^[18] Es ist bekannt, dass einige pilzliche, iterative PKS, z. B. die Squalstatin-Tetraketid-Synthase,^[23] Polyketide freisetzen können, ohne dabei eine definierte Thioesterase zu benötigen. Ein Citratsynthase-ähnliches Enzym katalysiert die Reaktion zwischen Polyketid und Oxalacetat. Die folgende Dehydratisierung wird durch eine Methylcitrat-Dehydratase katalysiert, die auch die weitere Synthese zu decarboxylierten Maleinsäureanhydrid-Monomeren **9** und **11** ermöglicht. Interessanterweise haben Pilze noch einen zweiten Biosyntheseweg, der in Maleinsäureanhydriden resultiert, entwickelt. Andere Organismen bauen das biologisch wichtige Strukturelement durch Oxidation von vicinalen, aromatischen Methylgruppen auf.^[24,25]

Die KI-ähnlichen Enzyme katalysieren im Anschluss die Reaktion von **10** mit **9** oder **11**. Diese Unterschiede und die Orientierung der reaktiven Spezies bestimmen die Größe, das Substitutionsmuster und die Konfiguration des zentralen Carbocyclus. Vorherige In-vitro-Studien von Baldwin et al.^[26] zeigten, dass solche Reaktionen chemisch möglich sind. Allerdings werden ohne Enzyme starke Basen benötigt, und es konnten nur geringe Ausbeuten erzielt werden. Unsere Befunde lassen darauf schließen, dass KI-ähnliche Proteine von *B. fulva* zusammen agieren, heterodimere Enzyme bilden und „unspezifisch“ sowohl Nonadride als auch Heptadride produzieren können. Unseres Wissens ist *B. fulva* IMI 40021 der erste bekannte Pilz, der Maleidride mit unterschiedlichen Carbocyclen (z. B. Nonadrid und Heptadrid) produziert. Die „Unspezifität“ könnte also ein besonderes Merkmal der Biosynthese von Byssochlaminsäure (**1**) und Agnestadrid A (**8**) sein. Andere bekannte Maleidridproduzenten scheinen nur eine Möglichkeit der Dimerisierung nutzen zu können. Es ist aber möglich, dass eine genauere Untersuchung der Metaboliten dieser Organismen zur Identifizierung von Nebenprodukten mit unterschiedlichen Dimerisierungsmodi führt.

Die PEBP-ähnlichen Enzyme scheinen auch in den Dimerisierungsprozess involviert zu sein, und auch wenn ihre

katalytische Rolle noch nicht aufgeklärt werden konnte, ist es denkbar, dass ihre Fähigkeit zur Anionenbindung maßgeblich daran beteiligt ist.^[27] Eine Aktivität zur Stabilisierung unstabiler Carboxylate, wie **10**, könnte eine vorzeitige Decarboxylierung bereits vor der Dimerisierung verhindern. Für ein besseres Verständnis der Aktivität von KI- und PEBP-Proteinen sollten In-vitro-Studien durchgeführt werden. Bisher wurden noch keine Gencluster, die für eine Biosynthese von Octadriden wie Zopfiellin (**7**) codieren, identifiziert; ausgehend von unseren Befunden ist es aber wahrscheinlich, dass verwandte KI-ähnliche und PEBP-ähnliche Proteine an ihrer Biosynthese beteiligt sind.

Zum ersten Mal konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass es möglich ist, die Maleidridbiosynthese in einem geeigneten, heterologen Organismus durchzuführen. Darauf aufbauend können in weiteren Studien durch Veränderung des Biosynthesewegs neue Verbindungen dieser Klasse mit interessanten und biologisch wertvollen Eigenschaften kreiert werden. In weiteren Experimenten arbeiten wir an der Aufklärung des Mechanismus und der Selektivität der ringbildenden Enzyme.

Danksagung

Wir danken dem BBSRC (KW, BB/J006289/1) und Syngenta (AS) für finanzielle Förderung. Die analytische und präparative LCMS wurden vom EPSRC (EP/F066104/1) und der DFG (INST 187/621) zur Verfügung gestellt. Ein 500-MHz-NMR-Spektrometer (EP/L011999/1) wurde vom EPSRC zur Verfügung gestellt. Wir danken Dr. Kate de Mattos-Shiple (BB/K002341/1) für Diskussionen und bioinformatische Hilfe mit Maleidridclustern. Wir danken Dr. Sian Deller, Jo Mattocks und Dr. Dianne Irwin von Syngenta für die Kultivierung von *B. fulva* und vorangegangene Untersuchungen zur Byssochlaminsäureproduktion sowie für die Probenvorbereitung für die Genom- und RNA-Sequenzierung. Des Weiteren danken wir Dr. John Clough und Dr. William Whittingham von Syngenta für Diskussionen. *B. fulva* IMI 58422 wurde sequenziert und assembliert von The Genome Analysis Centre (Norwich) unter Vertrag von Syngenta durch Genome Enterprises Ltd., und *B. fulva* IMI 40021 wurde sequenziert und assembliert von der University of Bristol Genomics Facility.

Stichwörter: Biosynthese · Cyclisierungen · Enzyme · Maleidride · Polyketide

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6784–6788
Angew. Chem. **2016**, *128*, 6896–6900

[1] H. Raistrick, G. Smith, *Biochem. J.* **1933**, *27*, 1814–1819.

[2] J. E. Baldwin, D. H. Barton, J. L. Bloomer, L. M. Jackman, L. Rodriguez-Hahn, J. K. Sutherland, *Experientia* **1962**, *18*, 345–352.

- [3] D. H. R. Barton, J. K. Sutherland, *J. Chem. Soc.* **1965**, 1769–1772.
- [4] J. E. Baldwin, D. H. R. Barton, J. K. Sutherland, *J. Chem. Soc.* **1965**, 1787–1798.
- [5] R. I. Crane, P. Hedden, J. Macmillan, W. B. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1973**, 194–200.
- [6] T. T. Dabrah, H. J. Harwood, L. H. Huang, N. D. Jankovich, T. Kaneko, J. C. Li, S. Lindsey, P. M. Moshier, T. A. Subashi, M. Therrien, P. C. Watts, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1–7.
- [7] S.-I. Wada, I. Usami, Y. Umezawa, H. Inoue, S.-I. Ohba, T. Someno, M. Kawada, D. Ikeda, *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 743–750.
- [8] M. Nakajima, K. Itoi, Y. Takamatsu, S. Sato, Y. Furukawa, K. Furuya, T. Honma, J. Kadotani, M. Kozasa, T. Haneishi, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1065–1072.
- [9] M. Futagawa, D. E. Wedge, F. E. Dayan, *Pestic. Biochem. Physiol.* **2002**, *73*, 87–93.
- [10] A. J. Szwalbe, K. Williams, D. E. O'Flynn, A. M. Bailey, N. P. Mulholland, J. L. Vincent, C. L. Willis, R. J. Cox, T. J. Simpson, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17088–17091.
- [11] J. L. Bloomer, C. E. Moppett, J. K. Sutherland, *J. Chem. Soc. C* **1968**, 588–591.
- [12] R. J. Cox, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2010–2026.
- [13] G. Wiegand, S. J. Remington, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1986**, *15*, 97–117.
- [14] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- [15] N. Yilmaz, C. M. Visagie, J. Houbraken, J. C. Frisvad, R. A. Samson, *Stud. Mycol.* **2014**, *78*, 175–341.
- [16] T. Hosoe, K. Fukushima, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Takizawa, K. I. Kawai, *Heterocycles* **2004**, *63*, 2581–2589.
- [17] M. L. Nielsen, L. Albertsen, G. Lettier, J. B. Nielsen, U. H. Mortensen, *Fungal Genet. Biol.* **2006**, *43*, 54–64.
- [18] R. Fujii, Y. Matsui, A. Minami, S. Nagamine, I. Takeuchi, K. Gomi, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5658–5661.
- [19] K. A. K. Pahirulzaman, K. Williams, C. M. Lazarus, *Methods Enzymol.* **2012**, *517*, 241–260.
- [20] F. H. Jin, J.-I. Maruyama, P. R. Juvvadi, M. Arioka, K. Kitamoto, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *239*, 79–85.
- [21] H. B. Claxton, D. L. Akey, M. K. Silver, S. J. Admiraal, J. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 5021–5029.
- [22] W. Xu, Y.-H. Chooi, J. W. Choi, S. Li, J. C. Vederas, N. A. Da Silva, Y. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6472–6475; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6600–6603.
- [23] R. J. Cox, F. Glod, D. Hurley, C. M. Lazarus, T. P. Nicholson, B. A. M. Rudd, T. J. Simpson, B. Wilkinson, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2004**, 2260–2261.
- [24] J. Davison, A. al Fahad, M. Cai, Z. Song, S. Y. Yehia, C. M. Lazarus, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7642–7647.
- [25] A. al Fahad, A. Abood, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7519–7523; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7649–7653.
- [26] J. E. Baldwin, A. Beyeler, R. J. Cox, C. Keats, G. J. Pritchard, R. M. Adlington, D. J. Watkin, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7363–7374.
- [27] L. Serre, B. Vallée, N. Bureaud, F. Schoentgen, C. Zelwer, *Structure* **1998**, *6*, 1255–1265.

Eingegangen am 23. Dezember 2015,
veränderte Fassung am 16. Februar 2016
Online veröffentlicht am 21. April 2016