

Kombinatorische Biosynthese

DOI: 10.1002/ange.200603176

**Über das Acceptorsubstrat der C-Glycosyltransferase UrdGT2: drei Prejadomycin-C-glycoside aus einer konstruierten Mutante von *Streptomyces globisporus* 1912  $\Delta$ IndE(urdGT2)\*\***

*Irfan Baig, Madan Kharel, Anton Kobylansky, Lili Zhu, Yuriy Rebets, Bohdan Ostash, Andriy Luzhetskyy, Andreas Bechthold, Victor A. Fedorenko\* und Jürgen Rohr\**

Die Landomycine **1–4** aus *Streptomyces cyanogenus* S-136 und *S. globisporus* 1912 sind Angucyclin-Antibiotika mit guter Wirkung gegen eine Reihe von Krebszelllinien, insbesondere Prostatakrebszelllinien.<sup>[1–6]</sup> Die Landomycine sind

[\*] A. Kobylansky,<sup>[+]</sup> Dr. Y. Rebets, Dr. B. Ostash, Prof. Dr. V. A. Fedorenko  
L'viv National University  
Department of Genetic and Biotechnology  
Grushevskyy St. 4, 79005 L'viv (Ukraine)  
E-Mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua  
Dr. I. Baig,<sup>[+]</sup> Dr. M. Kharel,<sup>[+]</sup> Dr. L. Zhu,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. J. Rohr  
University of Kentucky  
Department of Pharmaceutical Sciences  
College of Pharmacy  
725 Rose Street, Lexington, KY 40536-0082 (USA)  
Fax: (+1) 859-257-7564  
E-Mail: jrohr2@email.uky.edu  
A. Luzhetskyy, Prof. Dr. A. Bechthold  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Pharmazeutische Biologie  
Stefan-Meier-Straße 19, 79104 Freiburg (Deutschland)  
E-Mail: andreas.bechthold@pharmazie.uni-freiburg.de

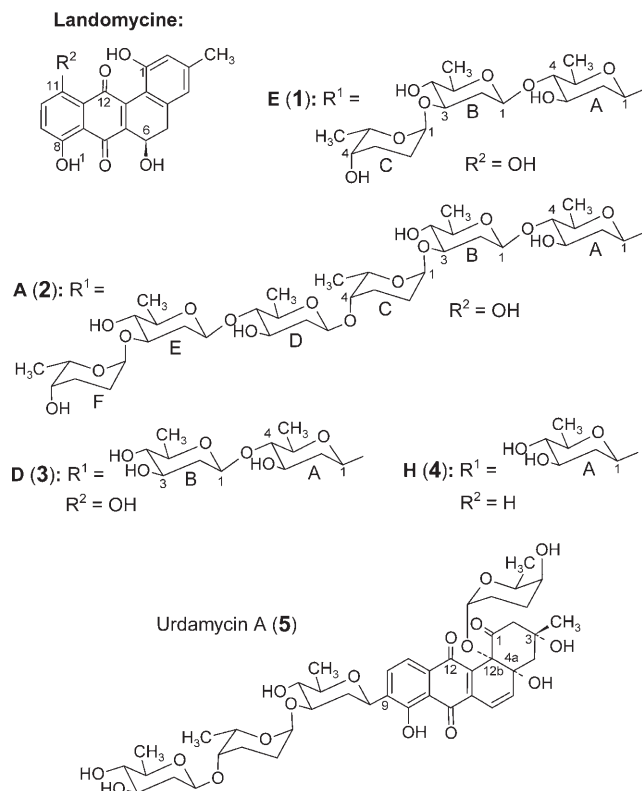
[+] Diese Autoren trugen in gleichen Anteilen zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die US National Institutes of Health (NIH grant CA 102102 an J.R.) sowie durch ein DAAD-Stipendium (DAAD A/05/28943, an Y.R.). Dank gebührt auch der Kernresonanz- und der Massenspektrometrie-Abteilung der University of Kentucky.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

eng verwandt mit den Urdamycinen (z.B. Urdamycin A (5)).<sup>[7–9]</sup> Beide Antibiotikagruppen bestehen aus einem durch den Polyketidweg aufgebauten Angucyclinon-Zentrum sowie D-Olivo- und L-Rhodinose-Zuckerbausteinen. Größere



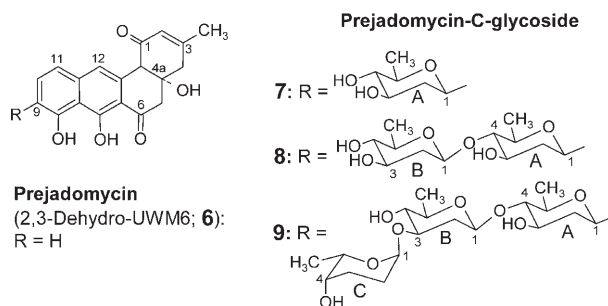
Strukturunterschiede gibt es bezüglich der Verknüpfung der Zucker und des Sauerstoffsstitutionsmusters des Polyketidzentrums.<sup>[1,4,5,10–12]</sup> Durch Klonieren der Biosynthese-Gencluster der Urdamycine und Landomycine gelang die Zuordnung von Genen, die Biosynthese-Enzyme codieren, welche die charakteristischen Strukturelemente beider Verbindungen einführen<sup>[7,13–17]</sup> und letztlich auch die signifikanten Variationen der biologischen Aktivitäten in dieser Gruppe von Antikrebs-Antibiotika bedingen.<sup>[18]</sup> Die ähnlichen Strukturen und Biosynthesewege der beiden eng verwandten Antibiotika ermöglichten außerdem erfolgreiche kombinatorisch-biosynthetische Genkombinationen, die zu neuen Hybridmolekülen führten.<sup>[5,6,15,19–24]</sup>

Einer der auffälligsten Strukturunterschiede besteht darin, dass die Urdamycine eine C-glycosidisch an C9 gebundene Trisaccharidkette enthalten, während die Oligosaccharidketten aller Landomycine O-glycosidisch gebunden in 8-Position vorliegen. Die Enzyme, die den ersten Glycosyltransferschritt beim Aufbau der Glycosidketten katalysieren – die Glycosyltransferasen (GTs) UrdGT2 und LanGT2/LndGT2 – sind eng miteinander verwandt (53 % Aminosäureidentität (68 % Sequenzähnlichkeit) für LndGT2 und UrdGT2). Die Acceptorsubstrate dieser beiden GTs sind jedoch überraschend unterschiedlich, nicht nur bezüglich der Acceptorsubstrat-Position (C-GT an C9 und O-GT an 8-O), sondern auch bezüglich des Zeitpunktes des ersten GT-

Schrittes in den Biosynthesen. In der Landomycin-Biosynthese scheinen fast alle Oxygenierungsschritte der Aglyconbildung – mit nur einer Ausnahme – vor dem ersten GT-Schritt stattzufinden,<sup>[5]</sup> während die Abfolge der Urdamycin-Biosyntheseschritte umstritten war (Sauerstoffeinführung in 12- und 12b-Position durch UrdE bzw. UrdM vor oder nach der C-Glycosylierung), sodass die Struktur des Acceptorsubstrats der C-Glycosyltransferase UrdGT2 unklar blieb.<sup>[8,11]</sup>

Hier beschreiben wir unsere Versuche, die Frage nach dem Acceptorsubstrat von UrdGT2 zu beantworten, und möglicherweise gleichzeitig C-glycosidische Landomycin-Derivate durch heterologe Expression des entsprechenden Gens *urdGT2* herzustellen. Diese Arbeiten ergaben, dass der C-Glycosylierungsschritt der Urdamycin-Biosynthese vor der Einführung der beiden Sauerstoffatome durch die Oxygenasen UrdE und UrdM stattfindet, und dass das frühe Angucyclinon-Intermediat UWM6 als Acceptorsubstrat für UrdGT2 dient.

Bezüglich der Oxygenasen der Landomycin-Biosynthese wurde herausgefunden, dass die Oxygenase Lan/LndZ5 die 11-Hydroxylierung<sup>[5]</sup> und Lan/LndM2 die 6-Hydroxylierung bewirkt,<sup>[12]</sup> während Lan/LndE höchstwahrscheinlich die 12-Oxygenierung (unter Chinonbildung) katalysiert, die den ersten Oxygenierungsschritt der Landomycin-Biosynthese darstellen soll. Alle Oxygenierungsschritte mit Ausnahme der 11-Hydroxylierung finden statt, bevor Lan/LndGT2 den ersten Zuckerbaustein einbringt. Wir wollten daher zunächst unsere Schlussfolgerungen bezüglich der Oxygenierungssequenz in der Landomycin-Biosynthese bestätigen. Zu diesem Zweck wurde *lndE* inaktiviert, was zur frühen Blockmutante *S. globisporus*  $\Delta$ *lndE* führte. Diese Mutante des Landomycin-E-Produzenten akkumuliert Prejadomycin (2,3-Dehydro-UWM6; 6), eine frühe Zwischenstufe verschiedener Angu-



cycline und Angucyclin-Derivate, das zuerst bei Studien zur Jadomycin-Biosynthese entdeckt, kürzlich aber auch in Blockmutanten von Gilvocarcin-V- und Oviedomycin-Produzenten gefunden wurde. Die Mutante *S. globisporus*  $\Delta$ *lndE* wurde durch direkte Disruption des *lndE*-Gens im Chromosom von *S. globisporus* Smu622 hergestellt, d.h. durch Insertion der Hygromycin-Resistenzkassette. Die Anreicherung von 6 deutet an, dass LndE auf dem Landomycin-Weg als erste Oxygenase agiert. Darüber hinaus erschien die Mutante *S. globisporus*  $\Delta$ *lndE* als ein idealer Wirt für die heterologe Expression von *urdGT2* – das Gen also, das die C-GT der Urdamycin-Biosynthese codiert –, denn diese Mutante liefert sowohl Prejadomycin (6), eine Verbindung die fast identisch

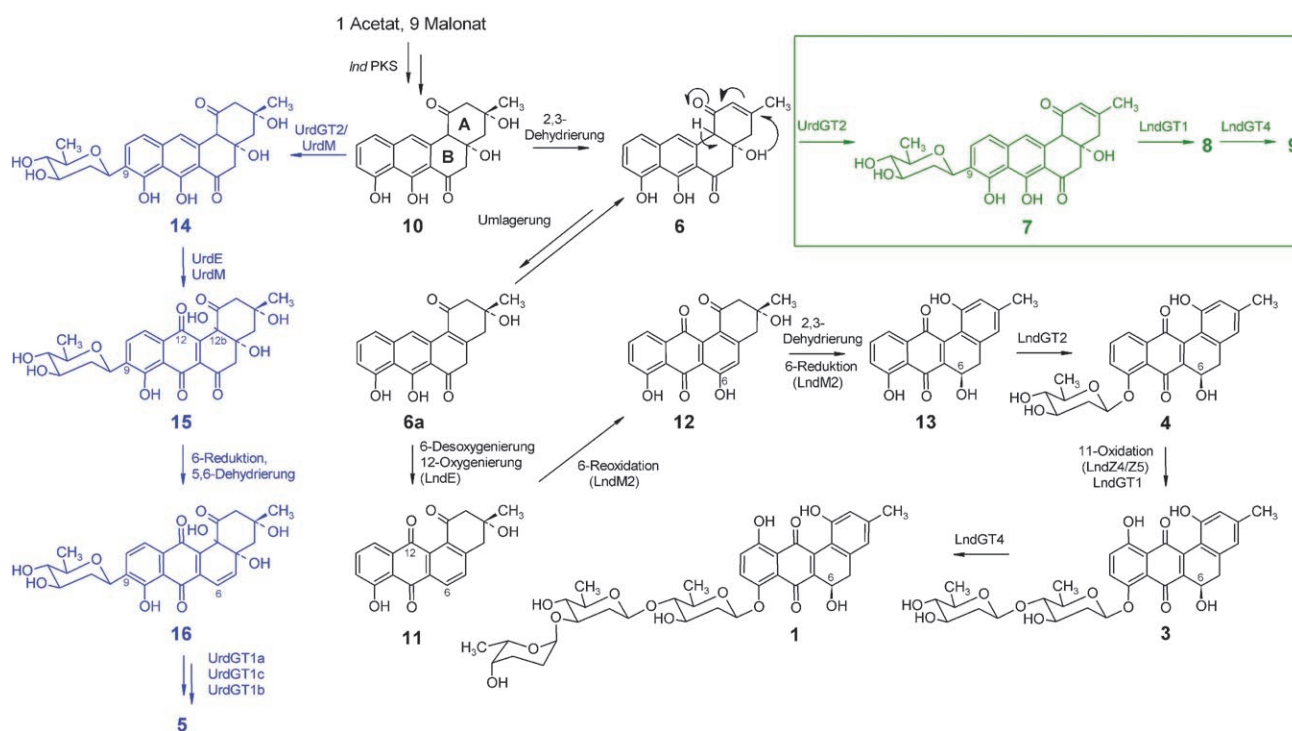
ist mit UWM6 (**10**), das kürzlich als potenzielles Acceptorsubstrat von UrdGT2 vorgeschlagen wurde,<sup>[19]</sup> als auch NDP-aktivierte D-Olucose, das Donorsubstrat. Die Konstruktion einer *S. globisporus*- $\Delta$ lndE-(urdTGT2)-Mutanten versprach nicht nur die Identifizierung des Acceptorsubstrates von UrdGT2, sondern auch eine weitere Prüfung der Promiskuität der übrigen lnd/lan-Glycosyltransferasen; zwei dieser Enzyme – LndGT1 und LndGT4 – waren mit ihren NDP-aktivierten Zuckerdonorsubstraten im Konstrukt vorhanden. GTs, die eine Zuckereinheit in Di-, Tri- oder gar längere Saccharidketten umwandeln können, unabhängig davon, wo und wie der erste Zuckerrest angehängt wurde, sind wichtig für die Konstruktion von Sacchariden durch kombinatorische Biosynthese. Ein erstes solches Experiment war bereits für LanGT1, das mit LndGT1 eng verwandt ist, erfolgreich,<sup>[19]</sup> doch LndGT4/LanGT4 wurden noch nie mit nichtnatürlichen Acceptorsubstraten getestet.

Der rekombinante Stamm *S. globisporus*  $\Delta$ lndE (urdTGT2) wurde konstruiert, indem das Plasmid pUWLurdTGT2, das das Gen urdTGT2 unter Kontrolle des *PerME*-Promotors enthält, durch Konjugation in die  $\Delta$ lndE-Mutante inseriert wurde. Die Gegenwart des Plasmids wurde mithilfe von physikalischer Isolierung, Transfer in *E. coli* XL1-blue MRF, Restriktionsenzym-Kartierung und Southern-Blotting gegen urdTGT2 aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 überprüft, und schließlich auch noch durch Sequenzierung des PCR-Produkts, das aus dem Plasmid mit Primern für urdTGT2 gewonnen wurde. Das resultierende Konstrukt *S. globisporus*  $\Delta$ lndE (urdTGT2) wurde in 4 L eines Soja-Glucose-Mediums kultiviert. Drei neue Verbindungen konnten isoliert und mit NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Anhand der Massen- und UV-Spektren wurde der Polyketid-Chromophor aller neuen Verbindungen als Prejadomycin identifiziert.<sup>[25–27]</sup> Typisch für diesen Chromophor sind die Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 405$  nm und 266 nm. Darüber hinaus verriet charakteristische Fragmentierungsmuster in den Massenspektren, dass die drei neuen Verbindungen einen, zwei bzw. drei Zuckerrest(e) enthielten ([M–115] = M–Rhodiose für das Monosaccharid, [M–115–130] = M–Rhodiose–Olivose für das Disaccharid und [M–115–130–130] = M–Rhodiose–Olivose–Olivose für das Trisaccharid). Der Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten mit Werten für Prejadomycin und bekannte Landomycine<sup>[5]</sup> ergab, dass es sich bei den drei Verbindungen um 9-C- $\beta$ -D-Olivosylprejadomycin (**7**, 3 mg), 9-C- $\beta$ -D-Olivosyl-1,4- $\beta$ -D-olivosylprejadomycin (**8**, 9 mg) und 9-C- $\alpha$ -L-Rhodosyl-1,3- $\beta$ -D-olivosyl-1,4- $\beta$ -D-olivosylprejadomycin (**9**, 4.5 mg) handelt. Die Konformation und die Konnektivitäten der Zuckerbausteine untereinander und mit dem Polyketidkern wurde durch 2D-NMR-Experimente abgesichert (NOESY und CIGAR-HMBC<sup>[28,29]</sup>). Beispielsweise zeigt das anomere 1A-H der C-glycosidisch gebundenen D-Olivose-Einheit NOE-Kopplungen mit 10-H, 2A-H<sub>e</sub>, 3A-H und 5A-H, und <sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>-Kopplungen konnten im CIGAR-HMBC zwischen 1A-H und C8, C10 und C3A neben einer schwächeren <sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>-Kopplung mit C9 beobachtet werden (siehe Tabellen 1–3 in den Hintergrundinformationen). Die Daten zeigen klar, dass dieser Zuckerbaustein in der für D-konfigurierte Zucker typischen <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-Konformation vorliegt,

dass er direkt mit C9 verknüpft ist und dass er eine  $\beta$ -glycosidische Bindung enthält, auf die aus der großen Kopplungskonstante <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10 Hz für 1A-H und 2A-H<sub>a</sub> geschlossen werden konnte.

Die heterologe Expression von Gen urdTGT2 in der lndE-minus-Mutante des Landomycin-E-Produzenten *S. globisporus* 1912 hat drei neuartige Prejadomycin-Analoga hervorgerufen, die sich bezüglich ihrer C-glycosidisch an C9 angeknüpften Zuckerreste unterscheiden. Der Zuckerrest und die Oligosaccharidketten waren dieselben, die zuvor in den Landomycinen H (**4**), D (**3**) und E (**1**) gefunden wurden. Diese sind jedoch hier C-glycosidisch mit C9, und nicht – wie für die Landomycine typisch – O-glycosidisch mit C8-O verknüpft; dieser Positionswechsel war wegen des Einsatzes von UrdGT2 zu erwarten. Der erste Glycosyltransferschritt findet bereits auf der Stufe des frühen Angucyclinon-Intermediates Prejadomycin (**6**) statt. Nur die heterolog exprimierte C-Glycosyltransferase UrdGT2 aus dem Urdamycin-Biosyntheseweg, nicht aber ihre natürliche Konkurrentin, die O-GT LndGT2, die ebenfalls vorhanden war, konnte die Zwischenstufe **6** glycosylieren und dadurch die Anknüpfung der Landomycin-Zuckerreste zur C9-Position dirigieren. Die Verlängerung zum Landomycin-E-Trisaccharid durch LndGT4 und LndGT1 gelang trotz der deutlich unterschiedlichen Struktur des Aglycons und obwohl der C-verknüpfte erste Zuckerbaustein in einer ungewohnten Position vorlag. Diese Ergebnisse können als starke Hinweise dafür gewertet werden, dass UrdGT2 mit Verbindung UWM6 (**10**, Schema 1) ein natürliches Acceptorsubstrat nutzt, das sich von Prejadomycin (**6**) nur hinsichtlich seiner 3-OH-Gruppe unterscheidet. Somit ist die lange herrschende Unsicherheit bezüglich des Acceptorsubstrates von UrdGT2 geklärt. Darüber hinaus zeigte sich, dass der C-GT-Schritt der Urdamycin-Biosynthese höchstwahrscheinlich vor den beiden Aglycon-Oxygenierungsschritten stattfindet, die durch UrdE und UrdM katalysiert werden (Schema 1).<sup>[8,19]</sup>

Ein Kreuzfütterungsexperiment sollte entscheiden, ob Prejadomycin (**6**) eine frühe Zwischenstufe der Landomycin-Biosynthese ist oder ein Intermediat eines abzweigenden Biosyntheseweges (Schema 1). Daher fütterten wir Prejadomycin (**6**, isoliert aus *Streptomyces globisporus*  $\Delta$ lndE) an die lndF-Mutante F133, eine frühe Blockmutante des Landomycin-Weges.<sup>[12]</sup> In dieser Mutante ist das Gen lndF inaktiviert, das die PKS-assoziierte Cyclase codiert, die den vierten Ring schließt. Die Mutante kann daher keine Polyketide für die Landomycin-E-Biosynthese produzieren, exprimiert aber alle notwendigen Enzyme, um die Synthese von Landomycin E abzuschließen, wenn man ein vollständig cyclisiertes Polyketid-Intermediat zufüttert. Der Stamm *S. globisporus* F133 wurde 24 h kultiviert, und 2 mg Prejadomycin (**6**) wurden einmal zugegeben. Die Reaktion wurde mit HPLC-MS verfolgt (Probenahme alle 12 h), und es zeigte sich, dass signifikante Mengen an Landomycin E produziert wurden. Dieses Resultat identifiziert Prejadomycin (**6**) als ein Intermediat des Landomycin-Weges, das aber offenbar von LndGT2 nicht glycosyliert werden kann, da diese GT spezifisch eine spätere Polyketid-Zwischenstufe als Acceptorsubstrat umsetzt, an der zwei der drei Oxygenierungsschritte bereits stattgefunden haben. Der Urdamycin-Weg unterscheidet sich also deutlich



**Schema 1.** Biosynthesewege für Landomycin (schwarz) und Urdamycin (blau) sowie der Hybridweg zu den C-glycosylierten Prejadomycinen 7–9 (grün). Der frühe Urdamycin-Biosyntheseweg (blau) verläuft über die hypothetischen Zwischenstufen 14 und 15.

vom Landomycin-Weg bezüglich des ersten Glycosylierungsschrittes. Für die Landomycin-Biosynthese gab es schon früher Hinweise, dass der erste Glycosylierungsschritt, die LndGT2-katalysierte O-Glycosylierung an 8-O mit D-Olivo-se, vor der LndZ4/Z5-katalysierten 11-Hydroxylierung stattfindet, aber erst nachdem die Sauerstoffatome in 12- und 6-Position durch LndE bzw. LndM2 eingeführt wurden.<sup>[5]</sup> Insbesondere wurde kürzlich gezeigt, dass die *lndF*-Mutante F133 die nichtglycosylierten Angucyclinone Tetrangomycin (**11**) und Rabelomycin (**12**) in Landomycin E (**1**) umwandeln kann, woraus geschlossen wurde, dass **11** und **12** Zwischenstufen der Landomycin-Biosynthese sind.<sup>[12]</sup> Die Resultate der hier beschriebenen Versuche bestätigen diese Schlussfolgerungen hinsichtlich eines – verglichen mit dem Urdamycin-Weg – späteren ersten Glycosylierungsschrittes. Da keines der neuen Prejadomycin-C-glycoside, auch nicht das Monoglycosid **7**, weiter durch die in *S. globisporus*  $\Delta$ *lndE* (*urdGT2*) vorhandenen Oxygenasen, z.B. LndM2 oder LndZ4/Z5, modifiziert wurde, können diese Oxygenasen nur nichtglycosylierte Substrate umsetzen. Der Befund, dass eine Verbindung ohne 3-OH-Gruppe, nämlich **6**, früher in der Landomycin-Biosynthese auftreten soll als zwei Verbindungen mit 3-OH-Gruppen, nämlich **11** und **12**, erscheint widersprüchlich. In Versuchen mit der überexprimierten Oxygenase JadH, die im Jadomycin-Weg die 12-Oxygenierung bewirkt,<sup>[25,26]</sup> wurde Prejadomycin (**6**) jedoch teilweise direkt in Rabelomycin (**12**) umgewandelt, was nur durch eine Umlagerung zu erklären ist, die mit einer Michael-Addition der 4a-OH-Gruppe an 3-Position beginnt.<sup>[31]</sup> Eine solche Umlagerung wurde schon von Hutchinson et al. beobachtet, aber nicht erklärt.<sup>[30]</sup> Schema 1 zeigt diese Umlagerung, illustriert

die wahrscheinlichsten Sequenzen des Urdamycin- und Landomycin-Weges und enthält auch den Hybridweg zu den neuen Prejadomycin-C-glycosiden, der durch die heterolog exprimierte UrdGT2 eingeleitet wird.

Eingegangen am 4. August 2006

Online veröffentlicht am 24. Oktober 2006

**Stichwörter:** Biosynthese · Glycoside ·

Kombinatorische Biosynthese · Landomycine · Polyketide

- [1] S. Weber, C. Zolke, J. Rohr, J. M. Beale, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4211.
- [2] R. T. Crow, B. Rosenbaum, R. Smith III, Y. Guo, K. S. Ramos, G. A. Sulikowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1663.
- [3] H. Depenbrock, S. Bornschlegel, R. Peter, J. Rohr, P. Schmid, P. Schweighart, T. Block, J. Rastetter, A. R. Hanauske, *Ann. Hematol.* **1996**, 73(Suppl II.), A80/316.
- [4] S.-E. Wohler, A. Bechthold, C. Beninga, T. Henkel, M. Holzenkämpfer, A. Kirschning, C. Oelkers, M. Ries, S. Weber, U. Weissbach, L. Westrich, J. Rohr in *Bioorganic Chemistry* (Hrsg.: U. Diederichsen, T. K. Lindhorst, B. Westermann, L. A. Wessjohann), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 305.
- [5] B. Ostash, U. Rix, L. L. Remsing Rix, T. Liu, F. Lombo, A. Luzhetskyy, O. Gromyko, W. C. , A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, V. Fedorenko, J. Rohr, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 547.
- [6] A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, C. Durr, T. Taguchi, V. Novikov, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 725.
- [7] A. Trefzer, D. Hoffmeister, E. Künzel, S. Stockert, G. Weitnauer, L. Westrich, U. Rix, J. Fuchser, K. U. Bindseil, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 133.

- [8] E. Künzel, B. Faust, C. Oelkers, U. Weissbach, D. W. Bearden, G. Weitnauer, L. Westrich, A. Bechthold, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11058.
- [9] J. Rohr, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1151.
- [10] G. Udvarnoki, T. Henkel, R. Machinek, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1274.
- [11] U. Rix, L. L. Remsing, D. Hoffmeister, A. Bechthold, J. Rohr, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 109.
- [12] L. Zhu, B. Ostash, U. Rix, M. Nur-e-Alam, A. Mayers, A. Luzhetskyy, C. Méndez, J. A. Salas, A. Bechthold, V. Fedorenko, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 631.
- [13] H. Decker, S. Haag, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 6126.
- [14] D. Hoffmeister, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 557.
- [15] D. Hoffmeister, K. Ichinose, S. Domann, B. Faust, A. Trefzer, G. Dräger, A. Kirschning, C. Fischer, E. Künzel, D. W. Bearden, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 821.
- [16] L. Westrich, S. Domann, B. Faust, D. Bedford, D. A. Hopwood, A. Bechthold, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *170*, 381.
- [17] Y. Rebets, B. Ostash, A. Luzhetskyy, D. Hoffmeister, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, A. Bechthold, V. Fedorenko, *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *222*, 149.
- [18] K. Krohn, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 127.
- [19] A. Trefzer, G. Blanco, L. L. Remsing, E. Künzel, U. Rix, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, A. Bechthold, J. A. Salas, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6056.
- [20] A. Luzhetskyy, A. Vente, A. Bechthold, *Mol. Biosyst.* **2005**, 117.
- [21] A. Trefzer, C. Fischer, S. Stockert, L. Westrich, E. Künzel, U. Girreser, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1239.
- [22] A. Luzhetskyy, T. Liu, M. Fedoryshyn, B. Ostash, V. Fedorenko, J. Rohr, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1567.
- [23] A. Luzhetskyy, L. Zhu, M. Gibson, M. Fedoryshyn, C. Durr, C. Hofmann, D. Hoffmeister, B. Ostash, C. Mattingly, V. Adams, V. Fedorenko, J. Rohr, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 675.
- [24] D. Hoffmeister, B. Wilkinson, G. Foster, P. J. Sidebottom, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 287.
- [25] U. Rix, C. Wang, Y. Chen, F. M. Lipata, L. L. Remsing Rix, L. M. Greenwell, L. C. Vining, K. Yang, J. Rohr, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 838.
- [26] Y. H. Chen, C. C. Wang, L. Greenwell, U. Rix, D. Hoffmeister, L. C. Vining, J. Rohr, K. Q. Yang, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22508.
- [27] T. Liu, C. Fischer, C. Beninga, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12262.
- [28] V. V. Krishnamurthy, D. J. Russell, C. E. Hadden, G. E. Martin, *J. Magn. Reson.* **2000**, *146*, 232.
- [29] W. F. Reynolds, R. G. Enriquez, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 221.
- [30] K. Kulowski, E. Wendt-Pienkowski, L. Han, K. Q. Yang, L. C. Vining, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1786.
- [31] M. K. Kharel, C. Wang, J. Rohr, unveröffentlichte Ergebnisse.

---