

Aurachin-Biosynthese im Gram-negativen Bakterium *Stigmatella aurantiaca*: Beteiligung einer Typ-II-Polyketidsynthase**

Axel Sandmann, Jeroen Dickschat, Holger Jenke-Kodama, Brigitte Kunze, Elke Dittmann und Rolf Müller*

Professor Thomas Hartmann zum 70. Geburtstag gewidmet

Myxobakterien haben sich in Studien der letzten zwei Jahrzehnte als vielseitige Produzenten unterschiedlichster Sekundärmetabolite (SMs) mit zum Teil hoher biologischer Aktivität erwiesen.^[1] Viele dieser Verbindungen enthalten Strukturelemente, die selten in SMs anderer Produzenten-Gruppen auftreten.^[2] Unter den Myxobakterien sind diverse SM-Multiproduzenten bekannt; unter anderem *Stigmatella aurantiaca* Sga15, aus dem die Aurachine,^[3] Myxocheline,^[4] Myxalamide und Stigmatelline^[5,6] isoliert wurden. Während die molekularbiologischen Details der Myxochelin-, Myxalamid- und Stigmatellin-Biosynthesen weitgehend aufgeklärt worden sind, sind entsprechende Informationen über die Biosynthese der Aurachine bis heute nicht verfügbar.^[7]

Die Aurachine sind ungewöhnliche Chinolin-Alkaloide, die eine Isoprenoid-Seitenkette enthalten. Infolge ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Vitamin K hemmen sie den Elektronentransport in der Atmungskette.^[2] Die verwandten isoprenylierten Chinolin-Antibiotika wirken als starke Wachstumsinhibitoren von *Helicobacter pylori*,^[8] während die alkylierten Chinolinderivate 3,4-Dihydroxy-2-heptylchinolin^[9] und 4-Hydroxy-2-heptylchinolin als Signalmoleküle in der Zell-Zell-Kommunikation von *Pseudomonas aeruginosa* dienen.^[10]

Die Biosynthese dieser 4-Hydroxy-2-alkylchinoline erfolgt durch eine Kopf-Kopf-Kondensation von Anthranilsäure (**1**) mit β -Keto-Fettsäuren.^[11] In Fütterungsexperimenten wurde nachgewiesen, dass Anthranilat, das in *S. aurantiaca* erstaunlicherweise durch eine vielmehr für Pflanzen als für Bakterien typische 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphatsynthase (DAHP-Synthase) gebildet wird, auch in der Aurachin-Biosynthese als Startereinheit fungiert.^[12] Aufgrund dieser Experimente wurde postuliert, dass **1** während der Aurachin-Biosynthese durch Acetoacetat verlängert und anschließend in das frühe Intermediat 4-Hydroxy-2-methylchinolin (**3**) überführt wird (Schema 1 a).^[13] Alternativ könnte das Intermediat **3** durch Verlängerung von aktiviertem Anthranilat mit zwei Einheiten Malonyl-CoA unter Katalyse einer Typ-III-Polyketidsynthase (PKS) entstehen. Gemäß dieser Hypothese wird bei der Biosynthese der Akridone (**9**) aktivierte und N-methylierte Anthranilsäure (**8**) mit drei Einheiten Malonyl-CoA mithilfe einer pflanzlichen Typ-III-PKS (Akridon-Synthase) verlängert (Schema 1 b). Ursprünglich wurde angenommen, dass das Vorkommen derartiger Typ-III-PKSs, die auch als Chalconsynthasen (CHSs) bezeichnet werden, auf Pflanzen beschränkt ist.^[14] Kürzlich wurden solche Enzyme auch in einigen Bakterien entdeckt.^[15,16]

Anfängliche Versuche, einen Genabschnitt einer Typ-III-PKS durch Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von genomischer DNA von *S. aurantiaca* zu amplifizieren, lieferten kein entsprechendes Produkt. Daher wurde eine *mariner*-Transposonmutantenbank von *S. aurantiaca* Sga15 erstellt, um die Aurachin-Biosynthesegene zu identifizieren. Die Analyse der Extrakte von 4096 in Mikrotiterplatten kultivierten Klonen durch HPLC-MS (Hintergrundinformationen),^[17–19] führte zur Identifizierung einer Mutante (4.59), die Aurachine in nur signifikant geringeren Mengen (Abbildung 1 b) als der Wildtyp bildet (Abbildung 1 a). Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse von Extrakten größerer Kulturen (50 mL) der Mutante und des Wildtyps von *S. aurantiaca* Sga15 bestätigt. Durch Transposon-Recovery wurden sowohl das transposable Element als auch die angrenzenden Sequenzbereiche aus dem Genom der Mutante 4.59 isoliert^[17] und der Aurachin-Biosynthesegencluster identifiziert (Tabelle 1). Das Transposon-Plasmid p4.59/NotI umfasst einen Sequenzbereich von 11 191 bp aus dem Chromosom von *S. aurantiaca* Sga15, in dem insgesamt elf ORFs kodiert sind. Der durchschnittliche Guanin + Cytosin-Gehalt beträgt 66.66 % und ist typisch für diese Bakterienart (unveröffentlichte Ergebnisse; die Sequenz des Genclusters ist in

[*] Dr. A. Sandmann, Dr. J. Dickschat,^[†] Prof. Dr. R. Müller
Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-5473
E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de
Homepage: <http://www.myxo.uni-saarland.de>

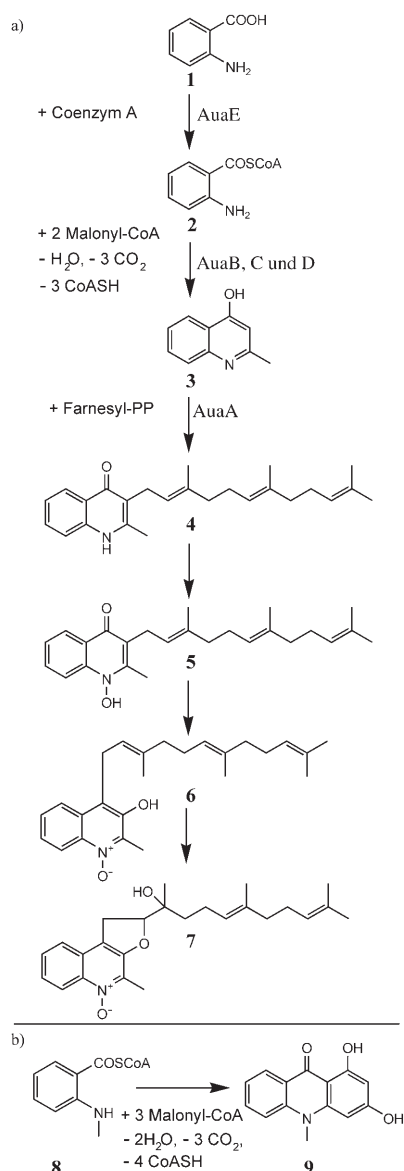
Dipl.-Biol. H. Jenke-Kodama, Prof. Dr. E. Dittmann
Institut für Biologie, Humboldt-Universität
Invalidenstraße 43, 10115 Berlin (Deutschland)

Dr. B. Kunze
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)

[†] Derzeitige Adresse:
Department of Biochemistry, University of Cambridge
80 Tennis Court Road, Cambridge CB21 9GA (Großbritannien)

[**] Die Autoren danken Dr. K. Weissman und Dr. H. B. Bode für Anmerkungen zum Manuskript. Diese Arbeit wurde von der DFG unterstützt (Schwerpunktprogramm 1152, „Evolution metabolischer Diversität“).

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



Schema 1. a) Postulierter Biosyntheseweg für die Bildung der Aurachine D–A (**4**: Aurachin D, **5**: Aurachin C, **6**: Aurachin B, **7**: Aurachin A). Gezeigt sind die katalysierten Biosyntheseschritte der Genprodukte (AuaA–E) des Aurachin-Core-Genclusters. Die intramolekulare 1,2-Umlagerung des Farnesylrests bei der Transformation von **5** zu **6** wird vom Verlust des ^{18}O -markierten Carbonyl-Sauerstoffs begleitet. Dies ist im Einklang mit einer möglichen Wagner-Meerwein-Umlagerung (G. Höfle, persönliche Mitteilung und Lit. [13]). b) Zum Vergleich die Biosynthese des in Pflanzen synthetisierten Acridons.

der EMBL-Datenbank unter der Zugangs-Nr. AM404078 hinterlegt).

Gemäß der Sequenzanalyse liegt die Transpositionsstelle in Mutante 4.59 in *orf1*, dessen Genprodukt jedoch Ähnlichkeiten zu Hydrolasen zeigt und daher wahrscheinlich nicht an der Aurachin-Biosynthese beteiligt ist. Strangaufwärts von *orf1* konnten weitere *orfs* identifiziert werden. Diese Gene kodieren für Proteine mit signifikanten Ähnlichkeiten zu einer Benzoat-CoA-Ligase (AuaE), einen für Typ-II-PKS-Systeme typischen Satz von Proteinen

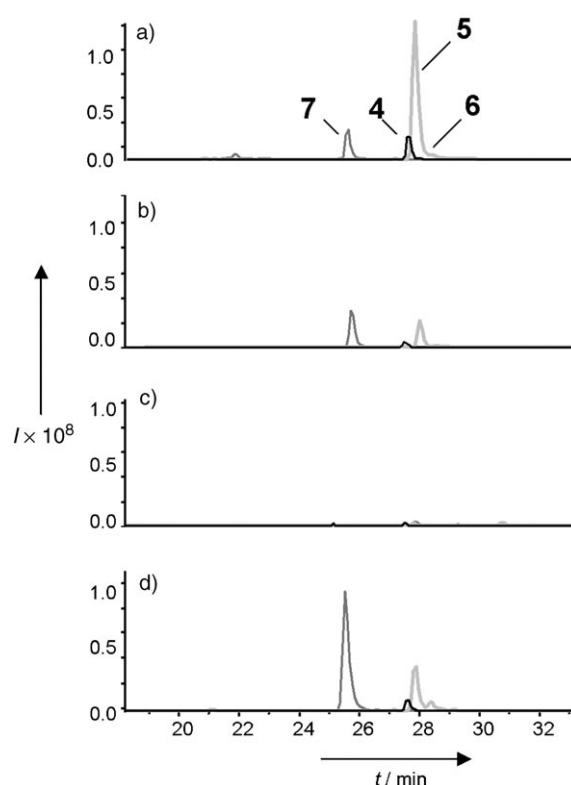


Abbildung 1. HPLC-MS-Chromatogramme von Extrakten des Wildtyps von *S. aurantiaca* Sga15 und von *aua*-Knockout-Mutanten: a) Wildtyp; b) Mutante 4.59; c) Mutante Sga-D_AS (die Ionenspuren (EICs; extracted-ion chromatograms) der Mutanten Sga-A_AS und Sga-E_AS sind ähnlich); d) Sga-D_AS nach Komplementation mit **3**. Dargestellt sind die Ionenspuren der Aurachinderivate von unterschiedlichen Kulturextrakten. **4**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 364; **5**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 380; **6**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 380; **7**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 396.

(AuaDCB) und eine Prenyltransferase (AuaA; Tabelle 1). Typ-II-PKSs sind Multienzymkomplexe, die aus iterativ verwendeten Enzymen bestehen. Bis heute wurde das Vorkommen dieser Enzyme ausschließlich in Aktinomyceten beschrieben, wo sie an der Biosynthese von polycyclischen aromatischen Verbindungen wie dem Actinorhodin beteiligt sind.^[20,21] Sämtliche Typ-II-PKSs sind charakterisiert durch eine „minimale“ Zusammensetzung aus einem Acyl-Carrier-Protein (ACP; AuaB) und einem Heterodimer aus einer Ketosynthase (KS α ; AuaC) und dem Kettenlängenfaktor (CLF („chain length factor“ oder KS β ; AuaD). Die KS α -Untereinheit ist für die iterative Kondensation der Malonyl-CoA-Einheiten zuständig, wogegen KS β die Decarboxylierung der Startereinheit katalysiert und die Länge der aufzubauenenden Polyketidkette festlegt. AuaB und AuaC zeigen insgesamt nur geringe Homologien zu ihren jeweiligen Enzymfamilien (Tabelle 1), weisen aber die konservierten Aminosäuren in den aktiven Zentren auf. In dem zu bekannten CLFs homologen AuaD ist der normalerweise im aktiven Zentrum aufzufindende Glutamin- oder Glutamatrest jedoch gegen Threonin ersetzt.^[15,21]

Weiterhin befindet sich im Gencluster ein Prenyltransferasegen, dessen Genprodukt (AuaA; Abbildung 2) Ähnlichkeiten zur 4-Hydroxybenzoat:Polyprenyldiphosphat-3-poly-

Tabelle 1: Kodierte Proteine des sequenzierten genomischen Bereichs einschließlich des Core-Genclusters der Aurachin-Biosynthese und deren mögliche Funktionen.

Protein (Gen)	Größe (in Da, bp)	mögliches Homologes, Herkunft (Identität [%], Ähnlichkeit [%]; Zugangs-Nr.)
AuaA (<i>auaA</i>)	36 605, 981	UbiA-Prenyltransferase-Familie, <i>Flavobacterium bacterium</i> BBFL7 (28, 44; EAS21036)
AuaB (<i>auaB</i>)	9572, 255	Acyl-Carrier-Protein, <i>Enterococcus faecalis</i> (34, 60; AAO 82791)
AuaC (<i>auaC</i>)	42 842, 1221	β -Ketoacylsynthase, <i>Desulfotobacterium hafniense</i> (40, 59; YP_518890)
AuaD (<i>auaD</i>)	41 891, 1242	3-Oxoacyl-ACP-Synthase II, <i>Streptomyces avermitilis</i> (31, 45; NP_824120)
AuaE (<i>auaE</i>)	53 329, 1494	Familie der Benzoat-CoA-Ligasen, <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (37, 52; YP_568017)
ORF1 (<i>orf1</i>)	24 354, 675	Carboxymethylenbutenolidase, <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (45, 56; NP_946545)
ORF2 (<i>orf2</i>)	24 958, 663	hypothetisches Protein, <i>Flavobacterium johnsoniae</i> (41, 59; ZP_01247630)
ORF3 (<i>orf3</i>)	28 683, 813	sekretierte Hydrolase, <i>Streptomyces coelicolor</i> (56, 70; CAC16457)
ORF4 (<i>orf4</i>)	20 379, 543	transkriptionsregulatorisches Protein, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (40, 62; BAC47519)
ORF5 (<i>orf5</i>)	45 410, 1286	Protein mit unbekannter Funktion, <i>Deltaproteobacterium MLMS-1</i> (28, 49; EAT04615)
ORF6 (<i>orf6</i>)	47 699, 1335	Protein mit unbekannter Funktion, <i>Deltaproteobacterium MLMS-1</i> (28, 49; EAT04615)

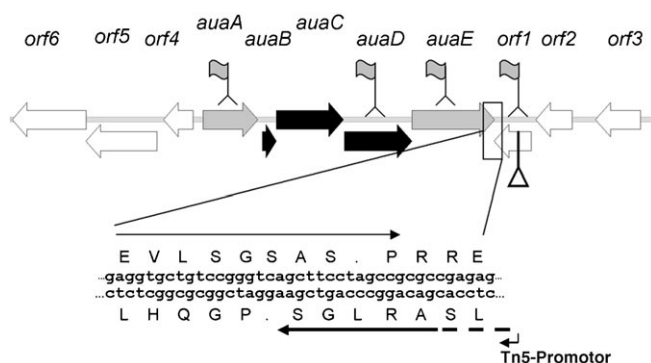


Abbildung 2. Oben: Genetische Organisation des Aurachin-Biosynthese-genclusters. Die Position und Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Fähnchen kennzeichnen die Sequenzregionen, die für die Plasmidinsertionen der in dieser Arbeit erzeugten Knockout-Mutanten verwendet wurden (Hintergrundinformationen). Das Dreieck markiert die Integrationsstelle des Transposons *magellan4* in der Mutante 4.59. Unten: stark vergrößerter Ausschnitt, der die transkriptionale Überlappung zwischen *orf1* und *auaE* darstellt. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung des Aurachin-Operons und der zusätzlichen *orfs* strangaufwärts und strangabwärts des Aurachin-Biosynthese-genclusters. Die minimale PKS ist durch schwarze Pfeile, die verbleibenden Gene des Core-Genclusters sind durch graue Pfeile dargestellt. Weiße Pfeile symbolisieren Gene, die für Produkte mit unbekannter Funktion kodieren. Weiterhin gezeigt ist die Integrationsstelle des Tn5-Promotors in Mutante 4.59, der wahrscheinlich die Transkription des 3'-Fragments von *orf1* aktiviert.

prenyltransferase UbiA aus *E. coli* zeigt,^[22] welche die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoat mit Farnesylidiphosphat katalysiert. Das Programm Sosui (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui>) zeigt für AuaA zehn mögliche Transmembranhelices auf. Das Protein AuaE zeigt große Ähnlichkeiten mit der Benzoat-CoA-Ligase EncN, die Teil des Typ-II-PKS-Systems ist, das die Enterocin-Biosynthese steuert.^[23,24]

Um die Beteiligung des *aua*-Genclusters an der Aurachin-Biosynthese zu beweisen, wurden Geninaktivierungsexperimente durchgeführt (Hintergrundinformationen).^[25] Eine HPLC-MS-Analyse ergab, dass die Inaktivierung von *auaA*, *auaD* und *auaE* zu einem Verlust der Aurachinproduktion führt (Abbildung 1 c), wodurch die für die Aurachin-Biosynthese essenzielle Rolle des *aua*-Operons belegt wird. Nichts-

destotrotz kann ein polarer Effekt durch die Plasmidinsertionen auf die strangabwärts folgenden Gene nicht ausgeschlossen werden. Für Myxobakterien sind keine replizierenden Plasmide verfügbar, die Komplementierungsexperimente ermöglichen würden. Außerdem sind Versuche zur Erzeugung von Doppelcrossover-Mutanten in *S. aurantiaca* Sga15 bisher ohne Erfolg geblieben (unveröffentlichte Ergebnisse).

Soweit uns bekannt ist, wurde hiermit erstmals eine Typ-II-PKS in einem Gram-negativen Bakterium identifiziert. Eine Zuordnung der vermuteten Reaktionsschritte in der Biosynthese der Aurachine zu den Genprodukten des Genclusters führte zur Aufstellung eines möglichen Biosyntheseschemas (Schema 1). Die Aktivierung von **1** zum Anthraniloyl-CoA (**2**) durch AuaE und der Transfer zum Acyl-Carrier-Protein AuaB führen zur Bildung von Anthraniloyl-S-AuaE. Die minimale PKS (bestehend aus beladenem AuaB zusammen mit AuaC und D) katalysiert anschließend die Bildung von **3** durch eine Verlängerung von **2** mit zwei Malonyl-CoA-Einheiten. Dieser Schritt umfasst außerdem eine Cyclisierung, die Freisetzung der Carbonsäure und eine Decarboxylierung. Die anschließende Prenylierung mit Farnesylidiphosphat durch AuaA führt zur Bildung von Aurachin D (**4**). Weitere Gene, die an der Transformation von Aurachin D zu den Aurachinen C (**5**), B (**6**) und A (**7**) beteiligt sind, konnten nicht identifiziert werden und müssen daher an anderen Stellen im Genom von *S. aurantiaca* Sga15 lokalisiert sein. Obwohl Gencluster mit einer gesplitteten Organisation der beteiligten Gene bekannt sind,^[17,26] wird diese Anordnung noch als ungewöhnlich angesehen.^[27]

Neben der Typ-II-PKS des Aurachin-Genclusters nutzen einige bakterielle aromatische PKSs einen anderen Starter als Acetyl- oder Malonyl-CoA.^[28] Zum Beispiel verwenden die Doxorubicin- und Daunorubicin-PKSs Propionyl-CoA als Starter,^[29] wogegen die Frenolicin-Biosynthese mit Butyryl-CoA beginnt.^[30] Die Typ-II-PKS des Enterocin-Genclusters aus *S. maritimus* nutzt Benzoyl-CoA als Startereinheit, das in einer ATP-abhängigen Reaktion von EncN aus Benzoat gebildet wird.^[31] Vor dieser Arbeit war dies die einzige bekannte Typ-II-PKS, die einen aromatischen Starter verwendet. Um den postulierten Biosyntheseweg zu den Aurachinen zu beweisen, wurde das hypothetische Intermediat **3** synthetisiert (Hintergrundinformationen) und an Kulturen der Mutanten

präsentiert somit einen neuen Typus von Typ-II-PKS-CLF. Im Regelfall enthält das aktive Zentrum des CLF ein Glutamin (Abbildung 3), das direkt an der Decarboxylierung während des Kettenstarts beteiligt ist.^[32,33] WhiE aus *Streptomyces coelicolor* ist das einzige bekannte Beispiel, bei dem dieses Glutamin durch ein Glutamat ausgetauscht ist. In AuaD ersetzt ein Threonin das Glutamin im aktiven Zentrum, sodass AuaD möglicherweise inaktiv und nicht an der Aurachin-Biosynthese beteiligt ist. Ein vermuteter polarer Effekt in der Inaktivierungsmutante von AuaD könnte daher die Aurachin-Bildung in der Mutante Sga-D_AS verhindern. Alternativ könnte das Glutamin im aktiven Zentrum nicht an der Steuerung der Kettenlänge beteiligt sein, sodass AuaD möglicherweise nur zur Stabilisierung des aktiven Komplexes aus den beiden Proteinuntereinheiten beiträgt.^[34] Dennoch kann AuaD in der Aurachin-Biosynthese als Kettenverlängerungsfaktor beteiligt sein, was auf Grundlage der Kristallstruktur von KS α /KS β diskutiert wurde.^[34] Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aurachin-PKS zu einer neuen Gruppe von PKSs gehört, die einen evolutionären Übergang von Typ-II-PKS zu Typ-III-PKS und/oder FABs bzw. umgekehrt bilden. Gegenwärtig arbeiten wir an Experimenten, die diese Hypothese verifizieren und den postulierten Aurachin-Biosyntheseweg weiter stützen sollen.

Eingegangen am 28. August 2006,
veränderte Fassung am 13. November 2006
Online veröffentlicht am 5. März 2007

Stichwörter: Alkaloide · Biosynthese · Myxobakterien ·
Naturstoffe · Polyketide

- [1] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233.
- [2] H. Reichenbach, G. Höfle in *Drug Discovery from Nature* (Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Berlin, **1999**, S. 149.
- [3] B. Kunze, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 258.
- [4] B. Kunze, N. Bedorf, W. Kohl, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 14.
- [5] K. Gerth, R. Jansen, G. Reifensahl, G. Höfle, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Thierbach, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1150.
- [6] B. Kunze, T. Kemmer, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 454.
- [7] H. B. Bode, R. Müller, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 577.
- [8] K. A. Dekker, T. Inagaki, T. D. Gootz, L. H. Huang, Y. Kojima, W. E. Kohlbrenner, Y. Matsunaga, P. R. McGuirk, E. Nomura, T. Sakakibara, S. Sakemi, Y. Suzuki, Y. Yamauchi, N. Kojima, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 145.
- [9] E. C. Pesci, J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, B. H. Iglewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11229.
- [10] E. Deziel, F. Lepine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins, L. G. Rahme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1339.
- [11] F. Bredenbruch, M. Nimtz, V. Wray, M. Morr, R. Müller, S. Häussler, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3630.
- [12] B. Silakowski, B. Kunze, R. Müller, *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 403.
- [13] G. Höfle, H. Reichenbach in *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen* (Hrsg.: W. Kuhn, H. P. Fiedler), Attempo, Tübingen, **1995**, S. 61.
- [14] K. T. Junghanns, R. E. Kneusel, A. Baumert, W. Maier, D. Gröger, U. Matern, *Plant Mol. Biol.* **1995**, *27*, 681.
- [15] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79.
- [16] F. Gross, N. Luniak, O. Perlova, N. Gaitatzis, H. Jenke-Kodama, K. Gerth, D. Gottschalk, E. Dittmann, R. Müller, *Arch. Microbiol.* **2006**, *185*, 28.
- [17] A. Sandmann, F. Sasse, R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1071.
- [18] M. Kopp, H. Irschik, F. Gross, O. Perlova, A. Sandmann, K. Gerth, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2004**, *107*, 29.
- [19] M. Kopp, H. Irschik, S. Pradella, R. Müller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1277.
- [20] B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 425.
- [21] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
- [22] M. Melzer, L. Heide, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1212*, 93.
- [23] C. Hertweck, B. S. Moore, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9115.
- [24] J. Piel, C. Hertweck, P. R. Shipley, D. M. Hunt, M. S. Newman, B. S. Moore, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 943.
- [25] S. Beyer, B. Kunze, B. Silakowski, R. Müller, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1445*, 185.
- [26] T. W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7968.
- [27] S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 447.
- [28] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70.
- [29] C. R. Hutchinson, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2525.
- [30] M. J. Bibb, D. H. Sherman, S. Omura, D. A. Hopwood, *Gene* **1994**, *142*, 31.
- [31] M. Izumikawa, Q. Cheng, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1428.
- [32] J. Dreier, C. Khosla, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2088.
- [33] C. Bisang, P. F. Long, J. Cortés, J. Westcott, J. Crosby, A.-L. Matharu, R. J. Cox, T. J. Simpson, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Nature* **1999**, *401*, 502.
- [34] A. T. Keatinge-Clay, D. A. Maltby, K. F. Medzihradszky, C. Khosla, R. M. Stroud, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 888.