

# $\beta$ -Lactone als privilegierte Strukturen für die Markierung des aktiven Zentrums vielfältiger bakterieller Enzymklassen\*\*

Thomas Böttcher und Stephan A. Sieber\*

Seit der Entwicklung multiresistenter Bakterienstämme geht von Infektionskrankheiten wieder eine zunehmende gesundheitliche Gefährdung aus. Da herkömmliche Antibiotika in der Regel nur gegen eine eingeschränkte Auswahl zellulärer Angriffsziele wirken, ist es notwendig, die Zahl und das Spektrum therapeutisch wirksamer Ziele zu vergrößern und zugleich tiefergehende Einblicke in die molekularen Mechanismen der Pathogenese zu erhalten.<sup>[1]</sup> Zu diesem Zweck wurde in der hier vorgestellten Arbeit die von Cravatt und Mitarbeitern entwickelte aktivitätsbasierte Proteinuntersuchung (activity based protein profiling, ABPP)<sup>[2]</sup> als chemisch-proteomische Strategie unter Verwendung von aktivitätsbasierten Enzymsonden direkt auf bakterielle Proteome angewendet. ABPP-Sonden bestehen aus mindestens zwei Elementen: 1) einer reaktiven Gruppe zur Bindung und kovalenten Modifizierung des aktiven Zentrums bestimmter Enzymklassen und 2) einem Linker für die Detektion, Anreicherung und Identifizierung von sondenmarkierten Proteinen.<sup>[3]</sup>

Diverse Elektrophile wurden bereits als reaktive Gruppen<sup>[2]</sup> für die ABPP eingesetzt, unter anderem Fluorophosphonate,<sup>[4]</sup> Sulfonate<sup>[5]</sup> und Epoxide,<sup>[6]</sup> die eine Präferenz für nucleophile Reste im aktiven Zentrum bestimmter Enzymklassen aufweisen. In der hier beschriebenen Arbeit wurde eine neue reaktive Gruppe auf Basis des von Naturstoffen abgeleiteten  $\beta$ -Lacton(2-Oxetanone)-Grundgerüstes für die ABPP mit Bakterien eingesetzt.  $\beta$ -Lactone sind vielversprechende biologisch aktive, privilegierte Strukturen, die kovalente Bindungen mit bestimmten aktiven Enzymzentren eingehen können.<sup>[7]</sup> Zwar weiß man, dass  $\beta$ -Lactone wie

Obafluorin<sup>[8]</sup> und Hymeglusin<sup>[9]</sup> antibiotische Aktivität aufweisen, ihre molekularen Angriffsziele sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Wir wendeten ABPP mit  $\beta$ -Lactonen auf Prokaryoten an, um die von ihnen angegriffenen Zielenzyme zu identifizieren. Ein besonderer Schwerpunkt soll hierbei auf jene Zielenzyme gelegt werden, die Bedeutung für die bakterielle Viabilität und Virulenz haben.

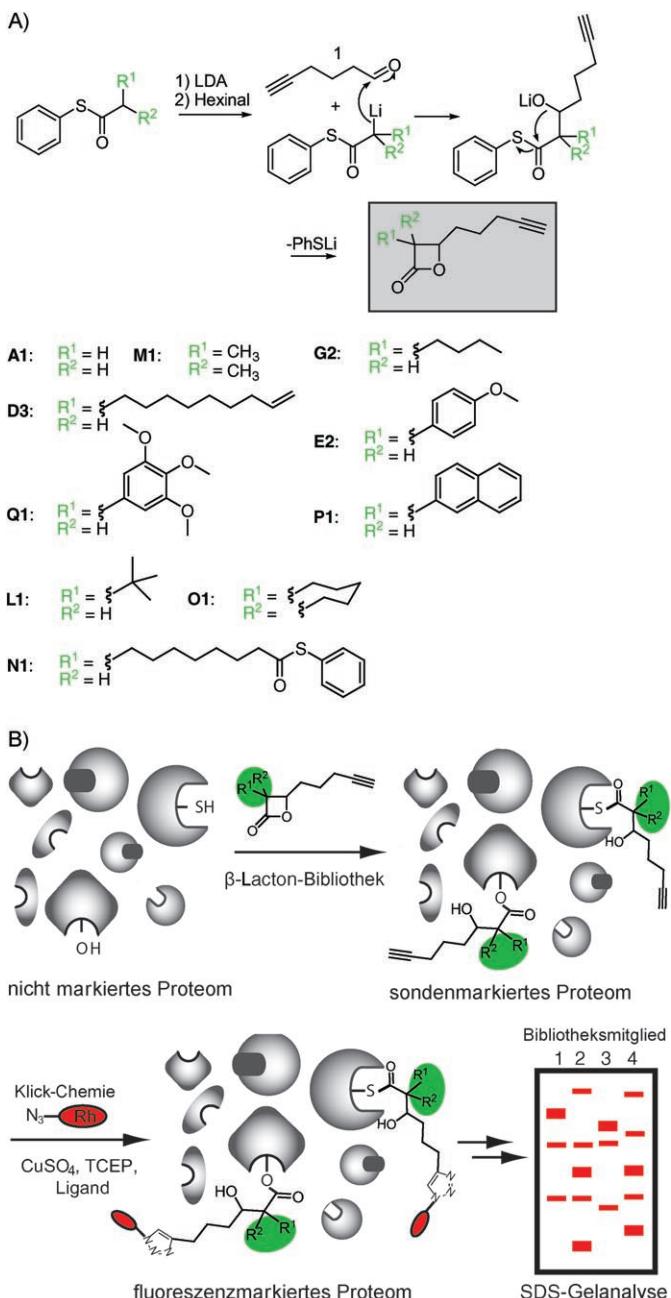
Eine kleine Sondenbibliothek mit einem Alkin-Linker in C-4-Position und Diversität in C-3-Position des 2-Oxetanon-Rings wurde synthetisiert, um eine maximale Zahl von Enzymmarkierungen zu erreichen (Abbildung 1A).<sup>[10]</sup> Die Modifizierung des Alkin-Linkers durch 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition (Klick-Chemie) ermöglicht es, nach der Proteommarkierung ein Fluorophor einzuführen und somit im SDS-Gel die entsprechenden Zielenzyme zu visualisieren,<sup>[11]</sup> wie bereits Cravatt und Mitarbeiter gezeigt hatten (Abbildung 1B).

Die meisten von Naturstoffen abgeleiteten  $\beta$ -Lactone sind in der *trans*-Konfiguration biologisch aktiv,<sup>[8,9,12]</sup> zeigen jedoch keine klare Präferenz für die absolute Konfiguration innerhalb der *trans*-Stereochemie.<sup>[13]</sup> Daher konzentrierte sich die hier verwendete Strategie auf die Synthese von *trans*- $\beta$ -Lactonen in racemischer Mischung, die, wie sich zeigte, ein ähnliches Markierungsprofil aufwiesen wie die entsprechenden *cis*-Isomere (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Die von natürlichen  $\beta$ -Lactonen abgeleitete biomimetische Bibliothek umfasste zehn Verbindungen mit aliphatischen und aromatischen Substituenten verschiedener Länge und Verzweigung. Um die Selektivität der Sonden für bestimmte Enzyme zu untersuchen, wurde die Bibliothek mit den Proteomen verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien – *Pseudomonas putida*, *Listeria welshimeri*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* – getestet, die eine phylogenetisch nahe Verwandtschaft mit pathogenen Stämmen aufweisen. Zusätzlich wurde das Cytosol von Mausleber als eukaryotische Referenz verwendet. Erste Markierungsexperimente wurden mit einer Sondenkonzentration von 50  $\mu$ M im Proteom durchgeführt, was sich als ausreichend für die vollständige Markierung der meisten Zielenzyme erwies. Die einzelnen Verbindungen der Sondenbibliothek zeigten interessanterweise äußerst unterschiedliche Reaktivitätsprofile mit allen untersuchten nativen Proteomen (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen), was darauf hinweist, dass die Substitution in C-3-Position in der Tat einen erheblichen Einfluss auf die Spezifität der Sonden-Protein-Wechselwirkung ausübt. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 2A und B die Markierung von *L.-welshimeri*-Cytosol- und Membranprotein sowie *B.-subtilis*-Cytosolprotein mit einer Auswahl der

[\*] T. Böttcher, Dr. S. A. Sieber  
Center for integrated Protein Science Munich, CiPS<sup>M</sup>  
Department für Chemie und Biochemie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-2180-77756  
E-Mail: stephan.sieber@cup.uni-muenchen.de

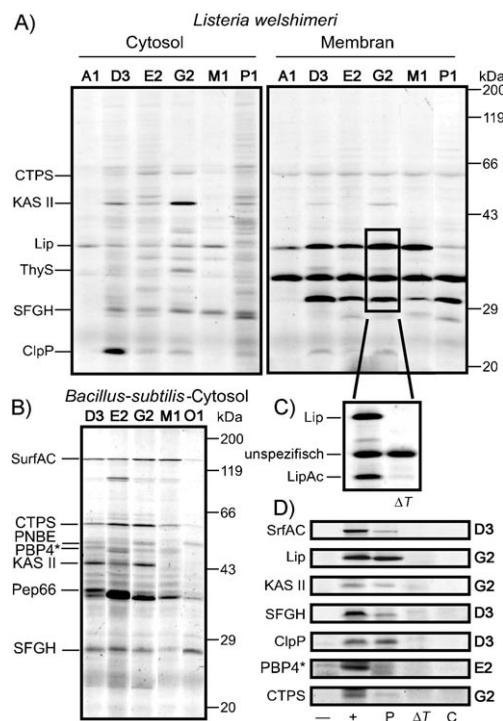
[\*\*] Wir danken Prof. Thomas Carell und seiner Gruppe für die großzügige Unterstützung und die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen. Weiterhin danken wir für die Unterstützung durch das Emmy Noether-Programm der DFG, den SFB 749 (DFG), ein Stipendium der Römer-Stiftung, den FCI und das CiPS<sup>M</sup>. T.B. wird durch ein Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert. Prof. Mohamed Marahiel und Alan Tanovic stellten uns freundlicherweise rekombinantes SrfAC Enzym zur Verfügung. Wir danken Kerstin Kurz für ihre hervorragende technische Assistenz und Maximilian Pitscheider für die Unterstützung bei der rekombinanten Expression.

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



**Abbildung 1.**  $\beta$ -Lactone als privilegierte Strukturen für bakterielle ABPP. A) Synthesestrategie und biomimetische Strukturen der  $\beta$ -Lacton-Bibliothek. LDA = Lithiumdiisopropylamid. B) Proteome werden zunächst mit Sonden der  $\beta$ -Lacton-Bibliothek inkubiert und diese anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff über Klick-Chemie modifiziert. Markierte Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluoreszenzanregung visualisiert.

komplementärsten Sonden gezeigt. Nur eine einzige unspezifische Bindung trat im durch Hitze denaturierten Kontrollproteom von *L. welshimeri* auf, was die Präferenz von  $\beta$ -Lactonen für native Proteine verdeutlicht (Abbildung 2C, Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Die meisten markierten Proteine waren von geringer Häufigkeit im Proteom, was ein direkter Vergleich der relativen Intensitäten von Coomassie-Färbung mit Fluoreszenzaufnahmen belegte (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen).



**Abbildung 2.** Markierungsprofile der  $\beta$ -Lacton-Bibliothek in bakteriellen Proteomen. A) Fluoreszenzgel von *L. welshimeri*-Cytosol- und Membranproteom nach der Behandlung mit ausgewählten Sonden der Bibliothek. Die Enzymidentitäten sind den jeweiligen Gelbändern zugeordnet (für die Abkürzungsliste siehe Tabelle 1). B) Ein Fluoreszenzgel von *B. subtilis*-Cytosolproteom zeigt die identifizierten Zielenzyme. C) Alle Reaktionen wurden mit einer Hitzekontrolle ( $\Delta T$ ) durchgeführt, um unspezifische Markierung zu erkennen. Als Beispiel ist Sonde G2 im Membranprotein von *L. welshimeri* gezeigt (Kasten). D) Beispiele für rekombinant exprimierte Enzyme (–: vor Induktion, +: nach Induktion, P: natives Protein,  $\Delta T$ : nach Induktion/Hitzekontrolle, C: nach Induktion/ohne Sonde).

Die anschließende Identifizierung der markierten Zielenzyme mittels LC/MS-Analyse (Hintergrundinformationen) ergab etwa 20 verschiedene Enzyme (Tabelle 1). Die MS-Resultate aller Haupttreffer wurden mithilfe rekombinanter Expression und anschließender Markierung durch die entsprechenden Sonden bestätigt (Abbildung 2D, Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen). Die identifizierten Enzyme umfassen vier Familien bestehend aus Ligasen, Oxidoreduktasen, Hydrolasen und Transferasen (Tabelle 2). Alle diese Familien erfordern für die Katalyse ein Nucleophil (Cys oder Ser) in ihrem aktiven Zentrum, das einen Angriff am elektrophilen  $\beta$ -Lactonring ermöglicht. Eine Vorinkubation verschiedener Proteine mit Phenylmethylsulfonylfuorid (PMSF) und Cerulenin, die als Inhibitoren der aktiven Zentren von Serin-Proteasen<sup>[14]</sup> bzw.  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthetasen (KAS)<sup>[15]</sup> bekannt sind, zeigte in der Tat, dass hierbei eine anschließende Markierung durch die Sonden unterbunden wurde (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen). Weiterhin konnte durch einen Substrat-Inhibitionstest mit S-Formylglutathion-Hydrolase (SFGH) die sondenabhängige Inhibition der Enzymaktivität gemessen werden ( $IC_{50}=5 \mu\text{M}$ ). Die Inhibition der Enzymaktivitäten und die breite Abdeckung unterschiedlicher En-

**Tabelle 1:** Identifizierte Enzyme (nach Funktion gruppiert).

Funktion	Enzym (Abkürzung)	Identifizierte Proteome
<b>Primärmetabolismus</b>		
	AcetylCoA-Hydrolase (ACoAH)	<i>P. putida</i>
	Aldehyd-Dehydrogenase B (ADB)	<i>E. coli</i>
	Formiat-C-Acetyltransferase (FCA)	<i>B. licheniformis</i>
	Lipase (Lip)	<i>L. welshimeri</i>
	Lipase/Acylhydrolase (LipAc)	<i>L. welshimeri</i>
	Lysophospholipase (LPL)	<i>Mus musculus</i>
	$\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase I (KAS I)	<i>E. coli, P. putida</i>
	$\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase II (KAS II)	<i>B. subtilis, B. licheniformis, E. coli, L. welshimeri</i>
	$\beta$ -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III (KAS III)	<i>B. licheniformis</i>
	$\beta$ -Ketothiolase (BKT)	<i>P. putida</i>
<b>Sekundärmetabolismus</b>		
	Surfactin-A-Synthetase-Untereinheit C (SrfAC)	<i>B. subtilis</i>
<b>Nucleotidsynthese</b>		
	CTP-Synthase (CTPS)	<i>B. subtilis, B. licheniformis, E. coli, L. welshimeri</i>
<b>Resistenz/Zellwand-Biosynthese</b>		
	Penicillin bindendes Protein 4* (PBP4*)	<i>B. subtilis</i>
<b>virulenzassoziiert</b>		
	ATP-abhängige Clp-Protease (ClpP)	<i>P. putida, L. welshimeri</i>
	Prolin-Iminopeptidase (PIP)	<i>P. putida</i>
<b>Entgiftung</b>		
	S-Formylglutathion-Hydrolase (SFGH)	<i>B. subtilis, E. coli, L. welshimeri, Mus musculus</i>
	Dienlacton-Hydrolase (DLH)	<i>P. putida</i>
<b>unbekannte Funktion</b>		
	AB-Hydrolase (ABH)	<i>Mus musculus</i>
	para-Nitrobenzyl-Esterase (PNBE)	<i>B. subtilis</i>
	Peptidase S66 (Pep66)	<i>B. subtilis</i>
	Putative ATP-abhängige Protease (PADP)	<i>P. putida</i>
	Putative Esterase (PutE)	<i>B. licheniformis</i>

zymklassen verdeutlichen das enorme Potenzial von  $\beta$ -Lactonen für die ABPP.

Mehrere identifizierte Enzyme sind in wichtige Zellfunktionen involviert, wie in Primär- (KAS I und II) und Sekundärmetabolismus (Surfactin-A-Synthetase C, SurfAC), Nucleotidsynthese (CTP-Synthase), Detoxifikation (SFGH),

Antibiotikaresistenz (Penicillin bindendes Protein 4\* (PBP4\*)) sowie Virulenz (ATP-abhängige caseinolytische Protease, ClpP). Mit Ausnahme von SFGH wurden keine Homologen dieser Enzyme im Mausleberproteom gefunden.

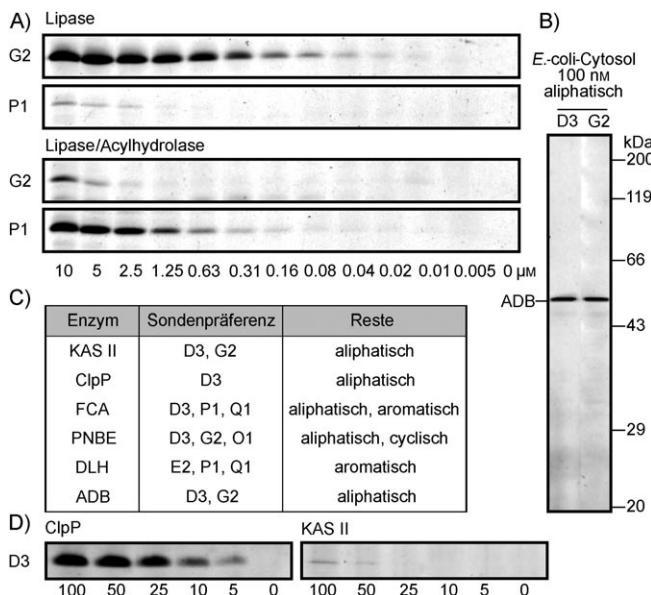
Einige Enzyme sind von besonderem medizinischem Interesse: KAS II, ein essenzieller Bestandteil der Fettsäurebiosynthese<sup>[16]</sup> ist unter Pathogenen hoch konserviert<sup>[17]</sup> und wurde durch die aliphatischen  $\beta$ -Lacton-Sonden **D3** und **G2** markiert (Abbildung 2 A und B). Weiterhin wurde PBP4\*, ein Enzym mit  $\beta$ -Lactamase-Aktivität<sup>[18]</sup> in *B. subtilis* markiert (Abbildung 2 B). Obwohl hier Proteome nichtpathogener Bakterien in den Experimenten verwendet wurden, konnten zwei virulenzassoziierte Enzyme, ClpP und Prolin-Iminopeptidase (PIP), die entscheidende Rollen in vielen pathogenen Stämmen spielen, in *L. welshimeri* und *P. putida* identifiziert werden. Besonders ClpP erweist sich wegen seiner fundamentalen Bedeutung für die Stresstoleranz und Virulenz in vielen pathogenen Bakterien wie *S. aureus*, *L. monocytogenes* und *P. aeruginosa* als interessantes Zielenzym.<sup>[19-21]</sup>

Um die Stärke der Sonden-Protein-Wechselwirkung beurteilen zu können, wurden die Reaktivitätsprofile ausgewählter  $\beta$ -Lactone über einen weiten Konzentrationsbereich von 10  $\mu$ M bis 5 nM untersucht. Einige Zielenzyme zeigten ein sehr robustes Markierungsverhalten. Zum Beispiel erwies sich das  $\beta$ -Lacton **G2** als sehr empfindliche Sonde für Lipase (Lip, bis zu 20 nM Sondenkonzentration), war jedoch kaum empfindlich für Lipase/Acylhydrolase (LipAc) in *L. welshimeri* (Abbildung 3 A). Das aromatische **P1** zeigte gegensätzliche Selektivität (bis zu 160 nM für LipAc), was die Empfindlichkeit und Zielenzymselektivität von **G2** und **P1** verdeutlicht. Im Cytosol von *E. coli* zeigte ADB bei einer Sondenkonzentration von 100 nM eine deutliche Präferenz für aliphatische  $\beta$ -Lactone (**D3**, **G2**; Abbildung 3 B). Einige andere Enzyme konnten auf ähnliche Weise basierend auf ihren bevorzugten Bindungspartnern gruppiert werden (Abbildung 3 C). Diese Information ist nützlich, um Einblicke in die nativen Substratpräferenzen von allen markierten Enzymen erhalten zu können, besonders von jenen, die weniger untersucht oder noch uncharakterisiert sind. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass das unsubstituierte **A1** Enzyme offensichtlich nur schlecht markiert. Sterisch anspruchsvolle Sonden wie **O1** und **L1** sind ebenfalls durch eine geringe Zahl spezifischer Markierungen gekennzeichnet. Daher sind  $\beta$ -Lactone mit aliphatischen und aromatischen Resten offensichtlich die potentesten Sonden; sie könnten die Basis für das zukünftige Design spezifischer Inhibitoren bilden.

Die Markierung im aktiven Zentrum essenzieller Enzyme wie KAS II wirft die Frage nach einem möglichen antibakteriellen Effekt auf. Einige Sonden wurden auf die Inhibition von Bakterienwachstum getestet, jedoch konnte keine antibiotische Aktivität beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in der begrenzten zellulären Aufnahme der Sonden durch lebende

**Tabelle 2:** Mit  $\beta$ -Lactonsonden markierte Enzymklassen.

Enzymklasse	EC	aktives Zentrum	Beispiel
Ligase	EC 6.3.4.	Cys, His, Glu	CTP-Synthase
Oxidoreduktasen	EC 1.2.1.	Cys, Glu	Aldehyd-Dehydrogenase B
Hydrolasen	EC 3.1.2.	Ser, Asp, His	S-Formylglutathion-Hydrolase
	EC 3.1.1.	Ser, Glu, His	para-Nitrobenzyl-Esterase
	EC 3.4.11.	Ser, Asp, His	Prolin-Iminopeptidase
	EC 3.4.21.	Ser, His	ATP-abhängige Clp-Protease
	EC 2.3.1.	Cys, His, Asn	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase II
Transferasen	EC 2.3.1.	Gly, Cys, Cys	Formiat-C-Acetyltransferase
	EC 2.3.1.	Cys, His, Cys	$\beta$ -Ketothiolase
	EC 2.1.1.	Cys	Thymidylat-Synthase



**Abbildung 3.** Empfindlichkeit und Spezifität der  $\beta$ -Lacton-Bibliothek gegenüber einzelnen Enzymen. A) Konzentrationsreihe ausgewählter Sonden im Proteom von *L. welshimeri*. B) Im Cytosol von *E. coli* wird ADB als einziges Enzym durch die Sonden **D3** und **G2** bei 100 nm markiert. C) Ausgewählte Enzyme mit ihren jeweiligen Sondenpräferenzen. D) In-vivo-Markierung von *L. welshimeri* mit **D3** in verschiedenen Konzentrationen.

Bakterien liegen. Um dies zu untersuchen, wurde *L. welshimeri* mit verschiedenen Sondenkonzentrationen in vivo behandelt. Diese Experimente ergaben, dass KAS II, das wichtigste Angriffsziel für die Viabilität, nur geringfügig bei den höchsten Konzentrationen (100  $\mu$ M) markiert wurde und daher vermutlich keine Absättigung für dessen vollständige Inhibition erreicht wurde. Im Gegenzug wurde jedoch eine starke Markierung des virulenzassoziierten Enzyms ClpP auch noch bei Sondenkonzentrationen von 5  $\mu$ M erhalten (Abbildung 3D). Die spezifische und selektive In-vivo-Markierung eines bekannten Virulenzfaktors, der nicht essenziell für die Viabilität, jedoch unabdingbar für die bakterielle Pathogenese ist, belegt, dass diese Sonden für In-vivo-Studien anwendbar sind; zugleich lässt sich auf ihnen eine vielversprechende zukünftige Strategie für die Inhibition neuer bakterieller Angriffsziele aufbauen. Inhibitoren virulenzassozierter Enzyme könnten erhebliche Vorteile gegenüber konventionellen Antibiotika bieten, wie die Bewahrung des wirtsendogenen Mikrobioms sowie einen verringerten Selektionsdruck, was durch verminderte Resistenzbildung zu Medikamenten führen könnte, die auch über einen längeren Zeitraum noch wirksam sind.<sup>[22]</sup>

Seitenkettenmodifizierte  $\beta$ -Lactone sind vielversprechende privilegierte Strukturen für das Design neuer ABPP-Sonden, die für vergleichende Untersuchungen von Enzymaktivitäten verschiedener bakterieller Proteome herangezogen werden können. In der hier präsentierten Arbeit ist es gelungen, vielfältige Zielenzyme zu identifizieren, die durch die Sondenmoleküle sowohl empfindlich markiert als auch inhibiert werden konnten. In Anbetracht der Markierung einiger wichtiger bakterieller Enzyme könnte dies ein vielversprechender Ausgangspunkt für die gleichzeitige Identifi-

zierung neuer antibakterieller Ziele zusammen mit ihren jeweiligen Inhibitoren sein.

## Experimentelles

Chemische Synthese, Vorbereitung und Markierung von Proteomen: Weitere Details zur Synthese und Charakterisierung der Sonden sowie zur Vorbereitung und Markierung der Proteome finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 17. Dezember 2007  
Online veröffentlicht am 28. März 2008

**Stichwörter:** Biomimetische Synthesen · Enzyme · Lactone · Medizinische Chemie · Proteomik

- [1] H. Brötz-Oesterhelt, J. E. Bandow, H. Labischinski, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 549.
- [2] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279.
- [3] S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chem. Commun.* **2006**, 2311.
- [4] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694.
- [5] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805.
- [6] D. Greenbaum, K. F. Medzihradsky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569.
- [7] D. H. Kim, J. I. Park, S. J. Chung, J. D. Park, N. K. Park, J. H. Han, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2553.
- [8] A. A. Tymak, C. A. Culver, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5491.
- [9] D. C. Aldridge, D. Giles, W. B. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1971**, *23*, 3888.
- [10] R. L. Danheiser, J. S. Nowick, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1176.
- [11] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274.
- [12] E. K. Weibel, P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, H. Lengsfeld, *J. Antimicrob.* **1987**, *40*, 1081.
- [13] H. Tomoda, H. Kumagai, Y. Ogawa, T. Sunazuka, H. Hashizume, H. Nagashima, S. Omura, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2161.
- [14] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639.
- [15] A. C. Price, K. H. Choi, R. J. Heath, Z. Li, S. W. White, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6551.
- [16] J. Wang, S. Kodali, S. H. Lee, A. Galgoci, R. Painter, K. Dorso, F. Racine, M. Motyl, L. Hernandez, E. Tinney, S. L. Colletti, K. Herath, R. Cummings, O. Salazar, I. Gonzalez, A. Basilio, F. Vicente, O. Genilloud, F. Pelaez, H. Jayasuriya, K. Young, D. F. Cully, S. B. Singh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7612.
- [17] J. Wang, S. M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y. S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, A. Basilio, J. R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S. H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L. L. Silver, J. D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J. W. Becker, D. Cully, S. B. Singh, *Nature* **2006**, *441*, 358.
- [18] D. L. Popham, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2917.
- [19] A. Michel, F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker, K. Ohlsen, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 5783.
- [20] Y. M. Ibrahim, A. R. Kerr, N. A. Silva, T. J. Mitchell, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 730.
- [21] O. Gaillot, E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, P. Berche, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1286.
- [22] A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 541.