



Paenilamicin – Struktur und Biosynthese eines hybriden Polyketid-/ nichtribosomalen Peptidantibiotikums des bienenpathogenen Bakteriums *Paenibacillus larvae***

Sebastian Müller, Eva Garcia-Gonzalez, Andi Mainz, Gillian Hertlein, Nina C. Heid,
Eva Mösker, Hans van den Elst, Herman S. Overkleeft, Elke Genersch und
Roderich D. Süssmuth*

Professor Eckhard Ottow gewidmet

Abstract: Das sporenbildende Bakterium *Paenibacillus larvae* ist der Erreger der Amerikanischen Faulbrut, einer weltweit auftretenden, hochpathogenen Bienenkrankheit. Wir konnten ein komplexes Hybrid-Gencluster aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und Polyketidsynthasen (PKS) im Genom von *P. larvae* aufklären. Hier präsentieren wir die Isolierung und die Strukturaufklärung der antibakteriellen und antifungalen Produkte dieses Genclusters, die Paenilamicine genannt wurden. Die einzigartigen Strukturen der Paenilamicine geben tiefe Einblicke in die zugrunde liegende, komplexe Biosynthese-Maschinerie. Bienenlarven-Koinfektionstests zeigten, dass die Paenilamicine von *P. larvae* für den Kampf um seine ökologische Nische benötigt werden und nicht direkt für das Sterben der Bienenlarven verantwortlich sind. Ihre antibakterielle und antimykotische Aktivität machen die Paenilamicine zu vielversprechenden Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung.

[*] S. Müller, Dr. A. Mainz, E. Mösker, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.biochemie.tu-berlin.de>
Dr. E. Garcia-Gonzalez, G. Hertlein, N. C. Heid,
Priv.-Doz. Dr. E. Genersch
Länderinstitut f. Bienenkunde
Abt. Diagnostik und Molekularbiologie
16540 Hohen Neuendorf (Deutschland)
H. van den Elst, Prof. Dr. H. S. Overkleeft
Dept. of Bio-organic Synthesis, Leiden University
Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden (Niederlande)
Priv.-Doz. Dr. E. Genersch
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Freie Universität Berlin
Robert-von-Ostertag-Straße 7–13, 14163 Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch den von der TU Berlin koordinierten Exzellenzcluster „Unifying Concepts in Catalysis“ von der DFG sowie durch Zuschüsse der Ministerien für Landwirtschaft der Länder Brandenburg und Sachsen-Anhalt (Deutschland) und durch das DFG Graduiertenkolleg 1121 gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte Beschreibung der Experimente und Analysetechniken, inklusive NMR-spektroskopischen Daten, GC-MS-Daten und bioinformatischen Daten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404572> zu finden.

Die Honigbiene (*Apis mellifera*) ist maßgeblich an der Bestäubung von Ökosystemen beteiligt und ist die wichtigste kultivierte Art, die in der Landwirtschaft zur Bestäubung von Nutzpflanzen dient. Unsere Nahrungsmittelversorgung ist stark von gesunden Honigbienenvölkern abhängig, und die wachsende Nachfrage in der Landwirtschaft in Verbindung mit dem Rückgang des weltweiten Bienenbestandes wird als Bedrohung für die menschliche Zivilisation wahrgenommen.^[1,2] Infektionen, die Krankheiten bei Honigbienen auslösen, sind deshalb in den Fokus geraten. Eine Reihe von Epidemien, die auf den landwirtschaftlichen Nutzflächen zu einem Bienensterben führen könnten, bedrohen Bienenvölker, was in den letzten Jahren große Besorgnis verursachte.^[3] Eines dieser Bienenpathogene ist das Bakterium *Paenibacillus larvae*, der Erreger der Amerikanischen Faulbrut (AFB),^[4] einer zerstörerischen mikrobiellen Erkrankung der Honigbiene. Trotz der enormen Auswirkungen der AFB sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weitgehend ungeklärt. Dieses fehlende Wissen um Mechanismen der Pathogenese macht AFB zu einer schwer zu bekämpfenden Tierseuche, und es ist daher unerlässlich, biologische Stoffwechselwege von *P. larvae* zu charakterisieren, um Ansatzpunkte für eine mögliche Bekämpfung zu entwickeln.

Eine vielversprechende Strategie, einen Einblick in die molekulare Physiologie von pathogenen Bakterien zu gewinnen, besteht darin, singuläre Stoffwechselwege der Erreger zu untersuchen. Oft sind dies Stoffwechselwege von Sekundärmetaboliten, die entweder für die Infektion oder für die Verteidigung gegen konkurrierende Mikroorganismen verantwortlich sind. Mit dieser Strategie können biochemische Stoffwechselwege charakterisiert werden, die möglicherweise essenziell für die Bakterien sind und damit für die Entwicklung von Pestiziden genutzt werden können. Das Genom von *Paenibacillus larvae* birgt Gencluster für die Synthese von Peptid-basierten Sekundärmetaboliten.^[5,6] So identifizierten wir ein komplexes Hybrid-Gencluster (*pam*) bestehend aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und Polyketidsynthasen (PKS) und konnten dieses Cluster mit einer antibakteriellen und antimykotischen Bioaktivität in Zusammenhang bringen.^[5] Wir präsentieren hier die Isolierung und Strukturaufklärung mittels HPLC-HR-Orbitrap-ESI-MS, GC-MS und NMR-Spektroskopie von vier bioaktiven NRP-Polyketid-Hybridverbindungen (NRP = nichtri-

bosomales Peptid), die diesem Biosynthesegencluster zugeordnet und im Folgenden Paenilamicine A1, A2, B1 und B2 genannt werden.

Mit dem Ziel, die Sekundärmetabolite des *pam*-Genclusters zu isolieren, wurde der Kulturüberstand des Bakterienstammes *P. larvae* DSM25430 über Amberlite-XAD-16-Harz fraktioniert, und die Fraktionen wurden auf ihre antibakterielle Wirksamkeit gegen *Bacillus megaterium* überprüft. Fraktionen mit Bioaktivität zeigten in der ESI-MS-Analytik [Tabelle S1 (S:Hintergrundinformationen)] dominante Molekülmassenpeaks bei m/z 1009.67285 $[M+H]^+$ (Paenilamicin A1) und 1037.68042 $[M+H]^+$ (Paenilamicin B1) sowie bei zwei in geringeren Mengen produzierten Derivaten m/z 995.65837 $[M+H]^+$ (Paenilamicin A2) und 1023.66402 $[M+H]^+$ (Paenilamicin B2). Anschließend wurden diese Verbindungen durch präparative Umkehrphasen(RP)-HPLC (siehe Hintergrundinformationen) isoliert und rein hergestellt. Die GC-MS-Analytik zeigte die Gegenwart von D-Ala, Gly, D-Lys/D-Orn und Spermidin an (Abbildungen S2–S4). Die Aufklärung der Konstitution der vier Derivate gelang schließlich durch multidimensionale NMR-Spektroskopie (Abbildung S1 und Tabelle S2). Die NMR-Spektren zeigen eine einzigartige Struktur der Kernbausteine bestehend aus: 2,3,5-Trihydroxypentansäure (Hpa), Ala, *N*-Methyldiaminopropionsäure (mDap), Galantinsäure (Gla), Gly und 4,3-Spermidin (Spe); siehe Abbildung 1. Die Struktur zeigt Ähnlichkeiten zum Galantin, einem Antibiotikum, das aus einem ungenau charakterisierten Bodenisolat der Familie der Bacillaceae isoliert wurde.^[7,8] Wir identifizierten zwei Positionen in der Struktur, in denen sich die vier Derivate unterscheiden. Das N-terminale Fragment wird entweder durch ein decarboxyliertes Lys (Cadaverin, Cad) oder durch ein decarboxyliertes Arg (Agmatin, Agm) besetzt, was zur Paenilamicin-A- bzw. Paenilamicin-B-Serie führt. Die zweite Position, in der sich die vier Derivate unterscheiden, ist ein internes Lys (Paenilamicin A1 und B1) bzw. Orn (Paenilamicin A2 und B2) (Abbildung 1). Der NMR-spektroskopische Nachweis für die unterschiedlichen Teilstrukturen der Paenilamicine resultiert aus charakteristischen ^1H - ^{13}C -Korrelationspektren (Abbildung 2A,B). Die Gegenwart der Agmatinreste in der Paenilamicin-B-Serie wurde zudem durch die Beobachtung einer Guanidin-Ne-He-Korrelation mit einer charakteristischen ^{15}N -chemischen Verschiebung von $\delta = 84.3$ ppm bestätigt (Abbildung 2D). Die N-Methylierung beider mDap-Reste in jedem der Paenilamicine wurde durch

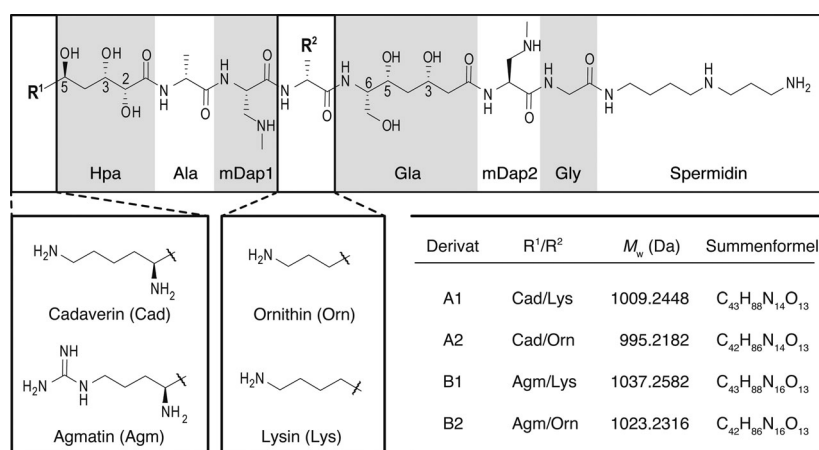


Abbildung 1. Strukturen der Paenilamicinderivate. Das Grundgerüst der Paenilamicine ist im oberen Teil mit den modulierten Fragmenten R¹ und R² gezeigt. Die Strukturen der entsprechenden Cadaverin-, Agmatin-, Ornithin- und Lysinreste sind unten links gezeigt. Die Kombinationen dieser Bausteine in den Paenilamicinen sind rechts unten, zusammen mit ihren jeweiligen Molekulmassen und -strukturen, zusammengefasst.

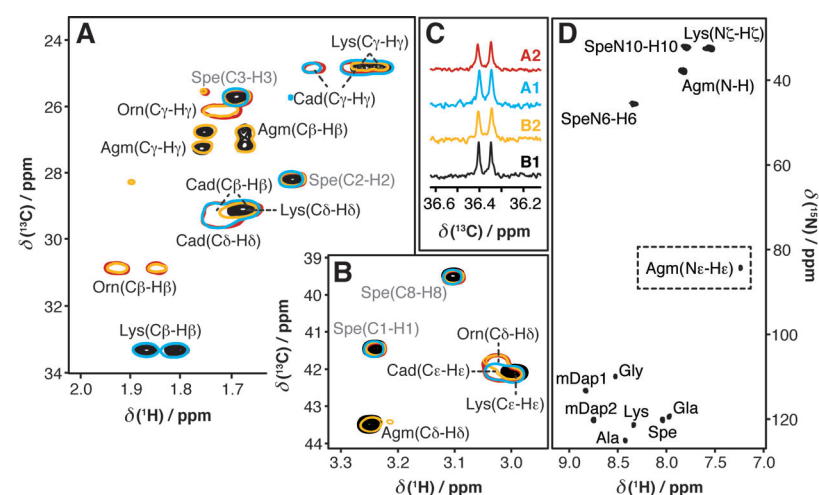


Abbildung 2. NMR-spektroskopische Zuordnung der strukturellen Unterschiede der vier Paenilamicinderivate. A), B) Ausschnitte der ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren, die Seitenkettensignale von Ornithin (Orn), Lysin (Lys), Cadaverin (Cad) und Agmatin (Agm) in Paenilamicin A1 (cyan), A2 (rot), B1 (schwarz) und B2 (gelb) zeigen. Restsignalintensität von Lysin-Kreuzsignalen in den Spektren von Paenilamicin A2 und B2 stammen von Spuren von Paenilamicin A1 bzw. B1. C) Ausschnitte der ^{13}C -DEPT-Spektren zeigen das Vorhandensein von zwei *N*-Methyl-Dap-Resten in jedem der vier Derivate [gleicher Farbcode wie in (A)]. D) ^1H - ^{15}N -HMOC-SOFAST-Spektrum von Paenilamicin B1 mit dem Ne-He-Korrelationssignal des Guanidins von Agmatin, hervorgehoben im gestrichelten Kasten. Signalzuordnungen für Rückgratamide [δ (^{15}N) > 100 ppm] und freie Aminogruppen [δ (^{15}N) < 50 ppm] sind ebenfalls angegeben.

den Nachweis von zwei aufgelösten *N*-Methyl-Signalen in den ^{13}C -DEPT-Spektren (Abbildung 2C) belegt.

Auf Grundlage jüngster Genomdaten und Geninaktivierungsexperimente^[5,6] werden alle vier Paenilamicine von der derselben NRPS/PKS-Biosynthesemaschinerie des *pam*-Genclusters synthetisiert (Abbildung 3). Durch die Strukturauflösung der Produkte des *pam*-Genclusters konnten wir den Paenilamicin-Biosyntheseweg rekonstruieren (Abbildung 3). Basierend auf den Strukturdaten von Paenilami-

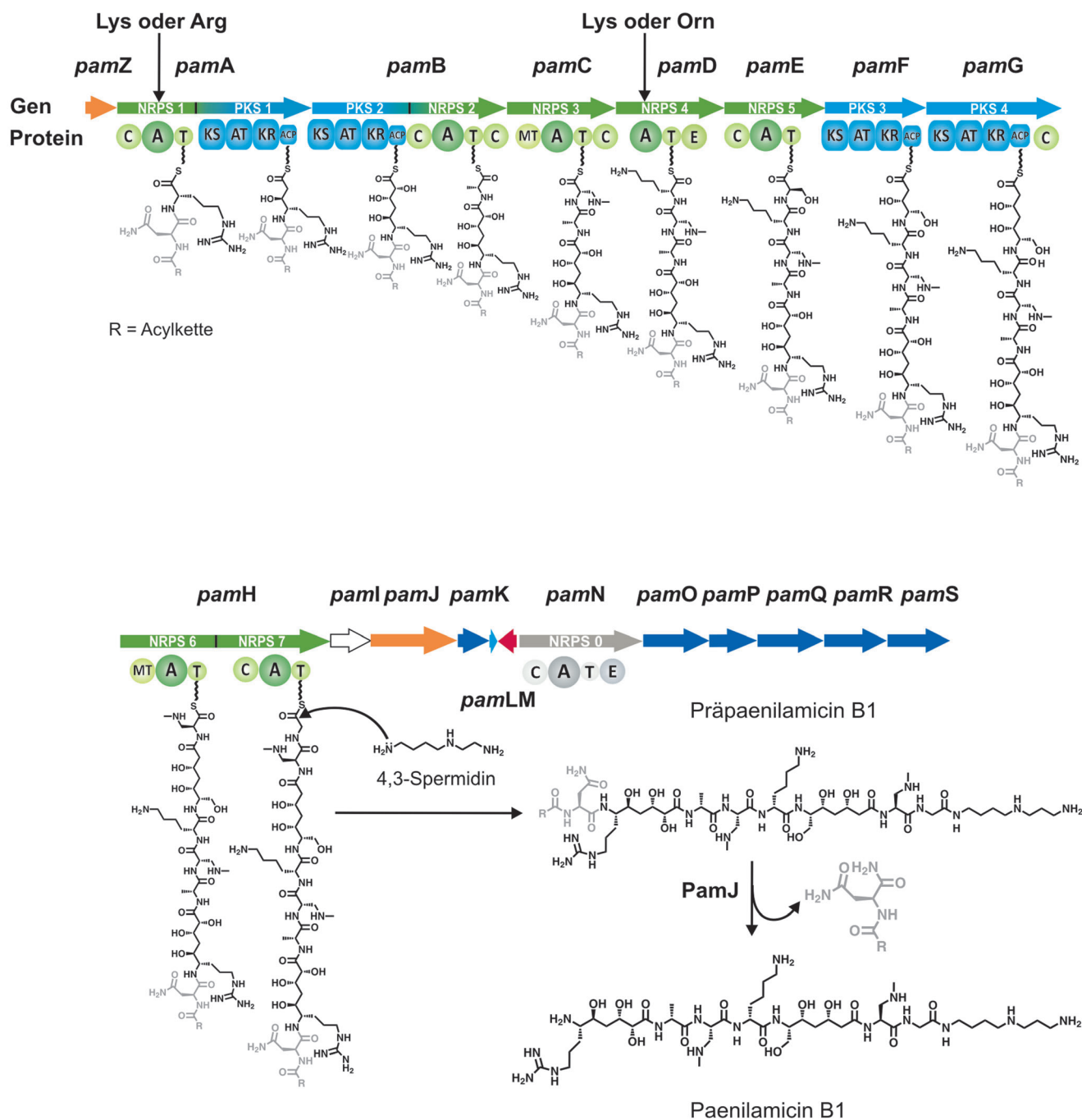


Abbildung 3. Das *pam*-Gencluster von *Paenibacillus larvae* DSM25430 und Biosynthese der Paenilamicine. Das Genom von *P. larvae* DSM25430 (NCBI-Referenzsequenz NC_023134.1) birgt ein NRPS/PKS-Hybrid-Gencluster, das für die Biosynthese des NRP/PK-Hybrids Paenilamicin verantwortlich ist. Vorgeschlagene Biosynthese des Polyketid-Peptid-Rückgrats von Präpaenilamicin B1 und dessen Aktivierung zu Paenilamicin B1: Die Biosynthese von Präpaenilamicin B1 beginnt mit der Synthese von Acyl-D-Asn (grau, R = Acylrest) durch NRPS0 (PamN). Präpaenilamicin B1 wird in einer TE-unabhängigen Weise durch die nukleophile Kondensation von 4,3-Spermidin an Gly von der NRPS abgespalten. Präpaenilamicin wird möglicherweise durch die Wirkung der D-Asn-spezifischen Transmembrantransporter/Peptidase PamJ zu Paenilamicin prozessiert. Pfeile über NRPS1 und NRPS4 zeigen Substratpromiskuität der entsprechenden A-Domänen an. Gene für die Vorstufen-Biosynthese: dunkelblau, Gene für Resistenz/Transport: orange, Gene für die Transkriptionsregulation: rot, Gene unbekannter Funktion/hypothetische Proteine: weiß. C: Kondensationsdomäne; A: Adenylierungsdomäne; T: Thiolierungsdomäne; TE: Thioesterasedomäne; E: Epimerisierungsdomäne; MT: Methylierungsdomäne; KS: Ketosynthasedomäne; AT: Acyl-Transferasedomäne; KR: Ketoreduktasedomäne; ACP: Acyl-Carrier-Protein.

cin A1 und B1 zeigt NRPS1 (PamA) eine relaxierte Substratspezifität und muss daher in der Lage sein, sowohl Lys (Paenilamicin-A-Serie), als auch Arg (Paenilamicin-B-Serie) zu aktivieren. Das Substrat wird anschließend weiter über

eine PKS1-vermittelte Claisen-Kondensation mit Malonyl-Coenzym A (Malonyl-CoA) und durch eine Ketoreduktase (KR)-induzierte Reduktion zum sekundären Alkohol weiter prozessiert. Das PamB-PKS/NRPS-Hybrid führt eine

weitere Claisen-Kondensation (PKS2) mit Hydroxymalonyl-CoA und anschließende Ketoreduktion durch. NMR-spektroskopische Analysen zeigten eine 2*R*,3*S*,5*S*-Konfiguration der 2,3,5-Trihydroxypentansäure. Der folgende Baustein ist D-Ala und wird durch NRPS2 kondensiert. Es konnte keine Epimerisierungsdomäne für die stereochemische Umwandlung von L-Ala in NRPS2 gefunden werden. Allerdings entdeckten wir eine Alanin-Racemase (YP_008966234.1) im Genom von *P. larvae*, die möglicherweise für die Generierung von D-Ala verantwortlich ist.^[6] Alanin-Racemasen katalysieren die Pyridoxalphosphat-abhängige Umwandlung von L-Ala zu D-Ala, einem wesentlichen Bestandteil des bakteriellen Peptidoglycans.^[9] Trotz der fehlenden Epimerisierungsdomäne in den Synthetasen von Cyclosporin^[10] und dem HC-Toxin^[11] enthalten diese nichtribosomal synthetisierten Peptide ebenfalls D-Ala, das von einer Alanin-Racemase zur Verfügung gestellt wird.^[12,13]

Die Biosynthese der Paenilamicine wird mit der Kondensation von L-mDap, D-Lys/D-Orn und L-Ser, katalysiert durch die NRPS3-5-Genprodukte PamC, PamD und PamE, fortgeführt. Der Einbau von L-mDap wird genetisch durch die Gegenwart von N-Methyltransferase(N-MT)-Domänen in NRPS3 (PamC) sowie in NRPS6 (PamH) unterstützt. Die N-Methylierung, als häufigster Methylierungsmechanismus in der nichtribosomalen Peptidsynthese,^[14] erfolgt jedoch in der Regel an der Peptidbindung. Eine seltene Ausnahme ist die Seitenketten-N-Methylierung von Pristinamycin IA oder IB, in dem die 4-Amino-L-phenylalanin-Seitenkette einfach oder zweifach methyliert vorliegen kann.^[15] Die A-Domäne von NRPS4 (PamD) zeigt eine reduzierte Substratspezifität und ist in der Lage, D-Lys (Paenilamicin A1 und B1) oder D-Orn (Paenilamicin A2 und B2) zu prozessieren.

Die nächsten Schritte der Biosynthese der Paenilamicine umfassen die Prozessierung durch die Polyketid-Synthasen PKS3 (PamF) und PKS4 (PamG), die zwei nachfolgende Claisen-Kondensationen mit Malonyl-CoA durchführen. Jedem Kondensationsschritt folgt eine Ketoreduktion, die NMR-spektroskopischen Daten zufolge in Position 5 *R*-selektiv und in Position 3 *S*-selektiv ist. Als nächstes bewirkt die bimodulare NRPS PamH die Kondensation einer zweiten mDap-Einheit (NRPS6), gefolgt von Gly (NRPS7). Die Gegenwart eines C-terminalen 4,3-Spermidinrestes (Abbildung S4 und S5) lässt einen Kettenabbruch durch nukleophile Abspaltung vom NRPS/PKS-Biosyntheseapparat vermuten. Das Protein PamI zeigt Homologien zur BtrH-Proteinfamilie (Tabelle S3). Interessanterweise fanden wir die gleiche Domäne am C-Terminus von PamH. Daher vermuten wir, dass diese Domäne an der Transpeptidierungsreaktion, die für den Transfer des Peptids von der T-Domäne zum Spermidin verantwortlich ist, beteiligt ist. Das BtrH-Protein wurde als eine Aminoglycosid-1-*N*-acyltransferase bei der Biosynthese von Butirosin beschrieben, wo es für die Ligation der Aminoglycosid-Seitenkette des Butirosins verantwortlich ist.^[16] Diese Beobachtung lässt auf einen neuen Peptid-Freisetzungsmechanismus bei Thioesterase(TE)-unabhängigen NRPS schließen, den wir derzeit untersuchen.

Der Einbau der (2*R*)-Hydroxymalonyl-Einheit durch PKS1 wird durch die Gegenwart der Gene *pamP*, *pamO*, *pamK* und *pamQ* gestützt, deren Translationsprodukte für

den Aufbau von 2*R*-Hydroxymalonyl-CoA aus 1,3-Bisphosphoglycerat (BPG) kodieren (Abbildung S6A). Des Weiteren kodieren die Gene *pamS* und *pamR* für Proteine, die für die Biosynthese von Dap aus *O*-Phospho-L-Ser und L-Glu verantwortlich sind (Abbildung S6B). Sequenzvergleiche zeigen, dass PamZ eine Acetyltransferase mit Homologie zu dem Zwittermicin-Resistenzprotein ZmaR ist.^[17]

Die zuvor beschriebene funktionelle Zuordnung der Gene hat die Rolle von PamN (NRPS0), einem einzelnen NRPS-Modul mit einer A-Domänenspezifität für Asn und einer E-Domäne für die Umwandlung in D-Asn, bewusst unerwähnt gelassen. Diese Anordnung erinnert stark an die Biosynthese des NRPS-Propharmakons der Xenocoumacine.^[18] Das Xenocoumacin-Gencluster birgt ein Gen, das für ein bifunktionelles Protein kodiert (XcnG, bestehend aus einer periplasmatischen Peptidase und drei Transmembran-Helices), das am Resistenzmechanismus beteiligt ist. Die Peptidase-Untereinheit ist für die spezifische Spaltung des acylierten D-Asn-Restes der Präxenocoumacine verantwortlich, wodurch die aktiven Xenocoumacine entstehen.^[18] Obwohl PamJ strukturelle Unterschiede zu XcnG zeigt, sind vergleichbare Biosynthesen und Propharmakon-Aktivierungsmechanismen wahrscheinlich (Abbildung 3).

Wir berichteten bereits, dass Paenilamicin am zeitlichen Verlauf der Infektion durch *P. larvae* beteiligt ist, was die Gesamtlarvensterblichkeit in vivo aber nicht beeinflusst.^[5] Diese Befunde führen zu der Annahme, dass die Funktion von Paenilamicin nicht das Abtöten der Bienenlarven zum Ziel hat. Wir entwickelten einen Koinfektionsassay mit *P. alvei*. Die Larven wurden mit *P. larvae* und *P. alvei* koinfiziert, und nach dem Tod der Larven wurden deren Überreste auf das Überleben von *P. alvei* untersucht. Die nichtinfizierte Kontrollgruppe zeigte die Robustheit des Assays (Mortalität < 20 %). Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus Larven, die nur mit *P. alvei* infiziert wurden. Diese Larven wiesen eine Wiederfindungsrate von *P. alvei* von (43.3 ± 20.8) % auf. Wenn Larven zusätzlich mit *P. larvae* DSM25430 wt (wt = Wildtyp) koinfiziert wurden, war die Wiederfindungsrate von *P. alvei* deutlich auf (10.9 ± 10.8) % (*p*-Wert = 0.042) gesunken. Interessant ist, dass Larven, die mit *P. alvei* und *P. larvae* DSM25430 Δ *pamA* koinfiziert wurden, eine höhere Wiederfindungsrate von *P. alvei* aufwiesen [(62.0 ± 10.9) %], was vergleichbar mit der Gruppe ist, die nur mit *P. alvei* infiziert wurde (nichtsignifikanter Unterschied, *p*-Wert > 0.05), aber deutlich höher als Werte für Larven, die mit *P. alvei* und *P. larvae* DSM25430 wt (*p*-Wert = 0.0006) infiziert waren. Diese Befunde verdeutlichen, dass die Paenilamicinsynthese durch *P. larvae* Auswirkungen auf potenziell konkurrierende Bakterien im Larvendarm hat (Abbildung 4).

Zusammenfassend haben wir die ungewöhnlichen Strukturen von vier Paenilamicinen aufgeklärt und Funktionen ihrer komplexen PKS/NRPS-Hybrid-Biosynthese zugeordnet. Die In-vivo-Funktion dieser Moleküle konnte durch Geninaktivierung in Verbindung mit Koinfektionsassays aufgeklärt werden, die Aufschluss über die Virulenzmechanismen von *P. larvae* und die Pathogenese der AFB geben. Den Bioaktivitätseigenschaften der Paenilamicine wird ein Potenzial für Human- und/oder Tierarzneimittel-Entwicklungsprogramme zugesprochen.

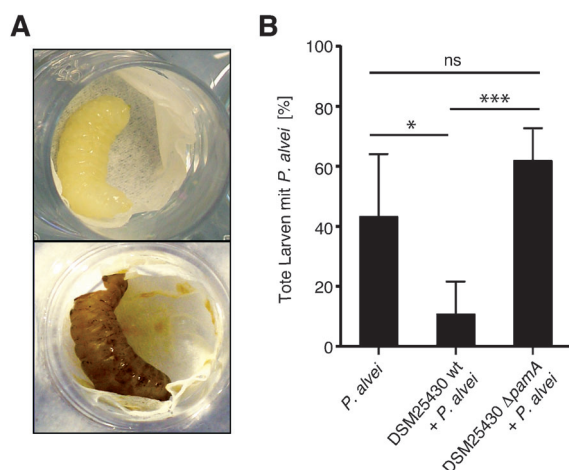


Abbildung 4. In-vivo-Effekte des Paenilamicins. A) Gesunde Larve (oben) und mit *P. larvae* infizierte Larve (unten). B) Die Larven wurden mit *P. larvae* und *P. alvei* koinfiziert, und das Überleben von *P. alvei* in toten Larven wurde experimentell erfasst. Das Wachstum von *P. alvei*, isoliert aus Larven, die mit DSM25430 wt infiziert wurden, war signifikant niedriger als von Larven, die mit DSM25430 Δ pamA infiziert wurden, was auf eine direkte Wirkung von Paenilamicin auf die Abtötung von *P. alvei* schließen lässt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) von drei Infektionstests mit je 30 Larven, die mit dem t-Test analysiert wurden; * *p*-Wert < 0.05 *** *p*-Wert < 0.001.

Eingegangen am 29. April 2014

Online veröffentlicht am 30. Juli 2014

Stichwörter: Antibakterielle Aktivität ·
Nichtribosomale Peptidsynthese · *Paenibacillus larvae* ·
Polyketidsynthese · Virulenzfaktor

- [1] M. A. Aizen, L. A. Garibaldi, S. A. Cunningham, A. M. Klein, *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1572–1575.
- [2] M. A. Aizen, L. D. Harder, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 915–918.
- [3] E. Genersch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 87–97.
- [4] E. Genersch, E. Forsgren, J. Pentikainen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski, I. Fries, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 501–511.
- [5] E. Garcia-Gonzalez, S. Müller, G. Hertlein, N. Heid, R. D. Süßmuth, E. Genersch, *Microbiologyopen*, DOI: 10.1002/mbo3.195.
- [6] M. Djukic, E. Brzuszkiewicz, A. Fünfhaus, J. Voss, K. Gollnow, L. Poppinga, H. Liesegang, E. Garcia-Gonzalez, E. Genersch, R. Daniel, *PLoS One* **2014**, *9*, e90914.
- [7] J. Shoji, R. Sakazaki, Y. Wakisaka, K. Koizumi, M. Mayama, S. Matsuura, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 122–125.
- [8] N. Sakai, Y. Ohfune, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 998–1010.
- [9] H. Hayashi, H. Wada, T. Yoshimura, N. Esaki, K. Soda, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 87–110.
- [10] G. Weber, K. Schorgendorfer, E. Schneider-Scherzer, E. Leitner, *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 120–125.
- [11] J. S. Scott-Craig, D. G. Panaccione, J. A. Pocard, J. D. Walton, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 26044–26049.
- [12] Y. Q. Cheng, J. D. Walton, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4906–4911.
- [13] K. Hoffmann, E. Schneider-Scherzer, H. Kleinkauf, R. Zocher, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12710–12714.
- [14] M. Z. Ansari, J. Sharma, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *BMC Bioinf.* **2008**, *9*:454, DOI: 10.1186/1471-2105-9-454.
- [15] V. de Crécy-Lagard, V. Blanc, P. Gil, L. Naudin, S. Lorenzon, A. Famechon, N. Bamas-Jacques, J. Crouzet, D. Thibaut, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 705–713.
- [16] N. M. Llewellyn, Y. Li, J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 379–386.
- [17] E. A. Stohl, S. F. Brady, J. Clardy, J. Handelsman, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5455–5460.
- [18] D. Reimer, K. M. Pos, M. Thines, P. Grün, H. B. Bode, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 888–890.