



Nowe związki poliketydowe o zaplanowanej strukturze wytwarzane przez promieniowce

Katarzyna Kuczek

Zakład Mikrobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. L. Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Wrocław

New, engineered polyketide compounds synthesized by actinomycetes

Summary

Polyketides constitute a structurally and functionally diverse group of secondary metabolites produced by bacteria, fungi and plants. Macrocylic polyketides are produced principally by actinomycetes using modular polyketide synthases which are giant multienzymes. These enzymes are potentially valuable for the biosynthesis of novel compounds. Engineered, hybrid polyketide synthases catalyse the formation of simple statin analogues, macrolactone ring analogues, and biologically active glycosylated compounds.

Key words:

polyketide synthase, macrolactone, polyketide libraries, genetic modifications, statin, analogues, desosamine, multiplasmid system, heterologous expression.

1. Poliketydy i enzymy, które je wytwarzają

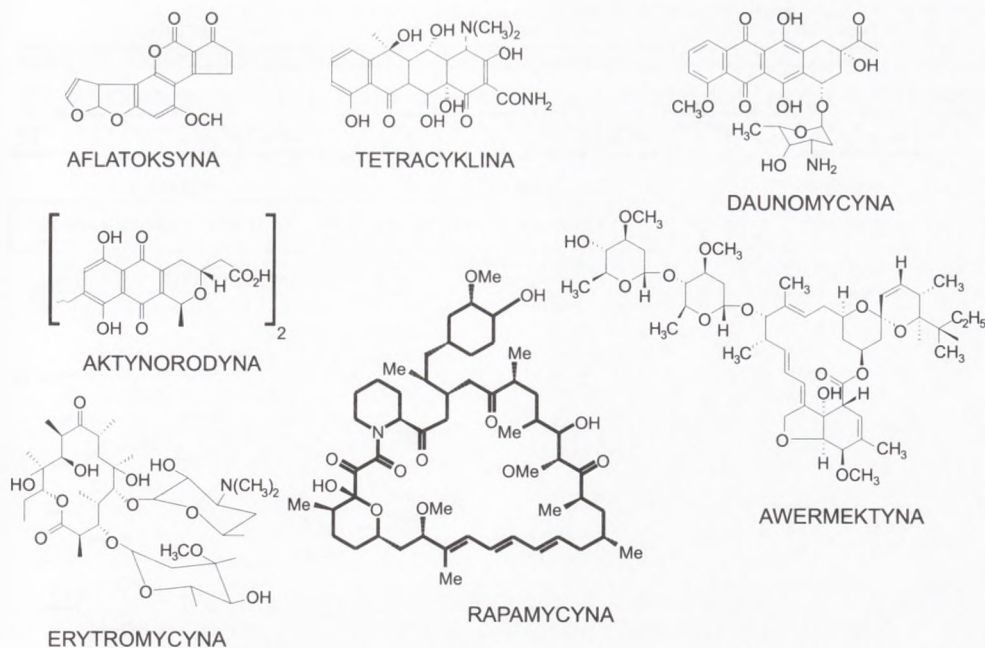
Poliketydy – produkty metabolizmu wtórnego bakterii, grzybów i roślin, stanowią zróżnicowaną strukturalnie grupę związków, charakteryzujących się szerokim zakresem aktywności biologicznych. Spośród nich najliczniej reprezentowane są antybiotyki: makrolidy, tetracykliny, polieny. Strukturę poliketydową mają również liczne związki przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze oraz immunomodulatory (1,2). Ze względu na właściwości układu enzymatycznego przeprowadzającego syntezę poliketydów, moż-

Adres do korespondencji

Katarzyna Kuczek,
Zakład Mikrobiologii,
Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej,
Polska Akademia Nauk,
ul. R. Weigla 12,
53-114 Wrocław.

biotechnologia

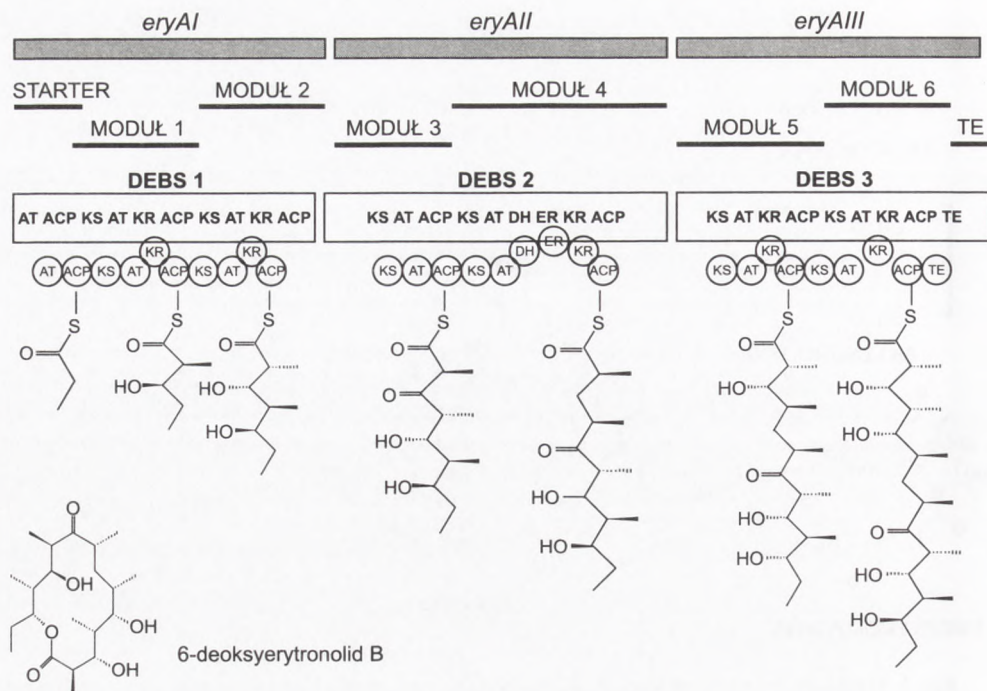
4 (59) 130–141 2002



Rys. 1. Przykłady związków poliketydowych. Awermektyna, erytromycyna, rapamycyna – poliketydy niearomatyczne.

na wpłynąć na przebieg tego procesu stosując metody **biosyntezy kombinatorycznej**. Celem tych zabiegów jest uzyskanie nowych związków poliketydowych o zaplanowanej strukturze i pożądanymi właściwościami terapeutycznymi (3-7).

Syntazy wytwarzające grupę poliketydów, które ogólnie można określić jako związki niearomatyczne (rys. 1), to kompleks wielkocząsteczkowych, wielofunkcyjnych białek (8-13). Każde z białek składa się z domen o funkcjach takich jak funkcje domen syntazy kwasów tłuszczowych (rys. 2). Domeny te katalizują również takie same reakcje jak w syntazie kwasów tłuszczowych. Są to uczestniczące w kondensacji domeny: ketosyntazowa (KS), acylotransferazowa (AT) i białko przenoszące reszty acylowe (ACP) oraz domeny uczestniczące w redukcji łańcucha poliketydowego: ketoreduktazowa (KR), dehydratazowa (DH) i enoiloreduktazowa (ER) (8). W syntazie poliketydowej, inaczej niż w syntazie kwasów tłuszczowych, każda z powtarzających się reakcji kondensacji reszt kwasowych oraz ich redukcji katalizowana jest przez odrębną domenę enzymatyczną. Suma reakcji w biosyntezie oraz ich kolejność mają zatem odzwierciedlenie w ułożeniu funkcjonalnych domen syntazy. Poszczególne cykle biosyntezy (kondensacja + redukcje) katalizowane są przez podjednostki – moduły. Moduły mogą różnić się rodzajem reszty kwasowej przyłączanej w celu kondensacji i stopniem redukcji; moduł może nie zawierać domen redukujących lub nie zawiera wszystkich domen, zapewniających pełną redukcję. Ta

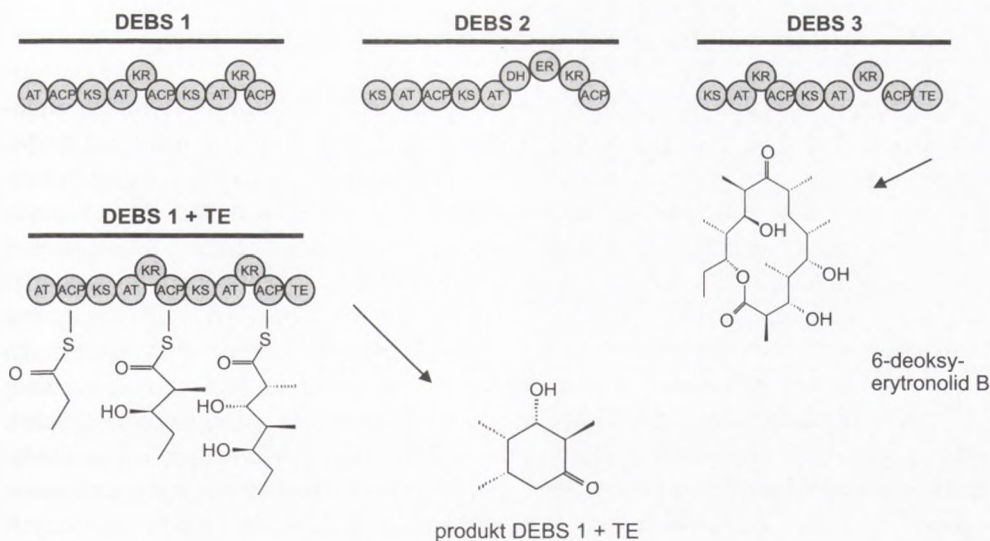


Rys. 2. Syntaza 6-deoksyerytronolidu B (DEBS) *Saccharopolyspora erythraea*, kodujące ją geny i poliketyd wytwarzany przez syntazę; *eryAI*, *eryAII*, *eryAIII* – geny białek syntazy; DEBS1-3 – wielofunkcyjne białka syntazy; KS, AT, DH, ER, KR, ACP – domeny enzymatyczne. Zaznaczono związane tioestrowo z ACP produkty pośrednie biosyntezy; 6-deoksyerytronolid B – makrolaktonowy produkt końcowy syntazy DEBS.

ostatnia właściwość syntaz powoduje, że związki poliketydowe, nawet jeśli składają się z takiej samej liczby atomów węgla, mogą znacznie różnić się pod względem struktury, właściwości chemicznych i biologicznych. Zróżnicowanie strukturalne poliketydów związane jest również z występowaniem centrów asymetrii i zostaje wzbogacone dzięki stereoselektywności niektórych domen syntazy (14-16). Reakcje modyfikacji zachodzące po zakończeniu syntezy podstawowego szkieletu poliketydowego dodatkowo zwiększają różnorodność struktur, a powszechnie występujące glikozylacje nadają związkowi poliketydowemu pełną aktywność biologiczną (17-18).

2. Modyfikacje układu enzymatycznego syntazy

W procedurach biosyntezy kombinatorycznej posłużono się układem modelowym jaki stanowi pierwszy zbadany i dobrze poznany pod względem struktury, funkcji i mechanizmów regulacji, układ syntazy DEBS (6-deoksyerytronolidu B, ang.

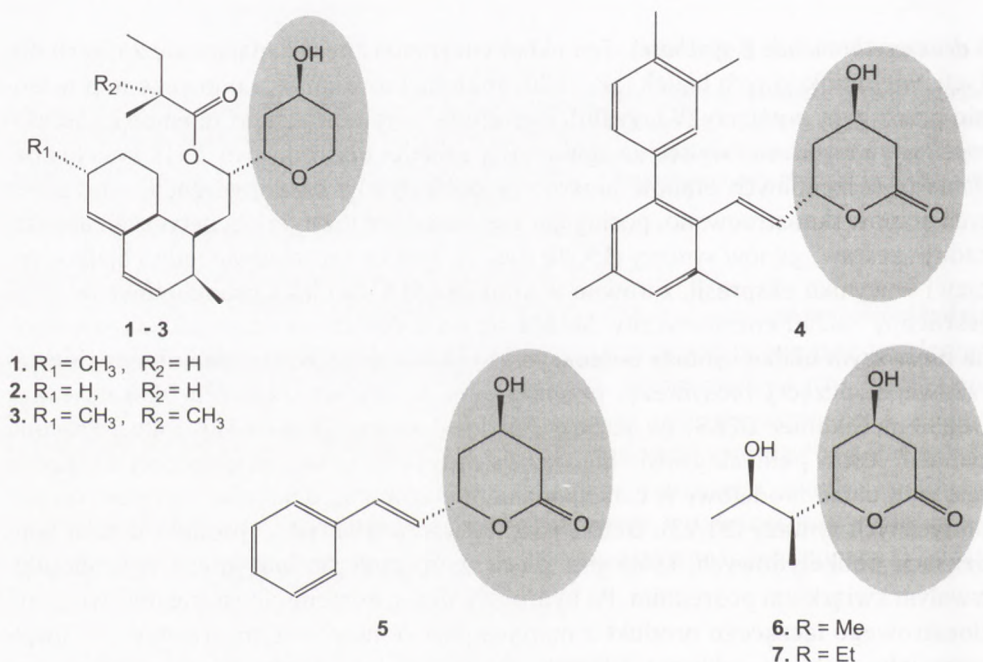


Rys. 3. Syntaza DEBS, skrócona syntaza DEBS1 + TE wytwarzany przez nią triketydowy lakton.

6-deoxyerythronolide B synthase). Ten układ enzymatyczny, składający się z trzech dużych, wielofunkcyjnych białek (ok. 3500 aminokwasów każde, kodowane odpowiednio przez geny *eryAI*, *eryAII* i *eryAIII*), występuje w komórkach promieniowca *Saccharopolyspora erythraea* i wytwarza aglikonowy szkielet erytromycyny A (1). W celu zbadania poszczególnych etapów biosyntezy poliketydów oraz ingerencji w przebieg tych etapów skonstruowano, posługując się metodami inżynierii genetycznej, uproszczony „zestaw” genów syntazy (19,20) (rys. 3). Koduje on zaledwie jedno białko syntazy i w wyniku ekspresji, zarówno w komórkach *E. coli* jak i promieniowców, daje „skrócony” układ enzymatyczny. Składa się on z dwóch modułów zlokalizowanych na pierwszym białku syntazy 6-deoksyerytronolidu B (DEBS1) oraz domeny tioesterazowej kończącej biosyntezę, przeniesionej z C-końca trzeciego białka syntazy DEBS3 na C-koniec DEBS1 (w skrócie układ jest zwany DEBS1+TE). Taka „skrócona syntaza” jest w pełni aktywnym białkiem, o dużej wydajności katalitycznej. Posłużyła ona jako układ modelowy w celu zbadania mechanizmu działania i parametrów katalitycznych syntazy (21-23). DEBS1+TE wytwarza triketyd – produkt dwóch kondensacji poliketydowych, który jest pierwszym, podczas biosyntezy erytronolidu, trwałym związkiem pośrednim. Po hydrolizie przez domenę tioesterazową wiązania tioestrowego łączącego produkt z matrycą jaką stanowi enzym, triketyd jest uwalniany jako stabilny, cykliczny δ -lakton. Przeprowadzając wymianę w obrębie genu DEBS1+TE, DNA kodującego domeny AT o specyficzności substratowej innej niż naturalna, uzyskano układ enzymatyczny wytwarzający triketydy o zmienionych podstawnikach (24,25). Układ ten stał się punktem wyjścia do dalszych manipulacji mających na celu otrzymanie większych cząsteczek związków poliketydowych.

3. Układ syntazy poliketydowej może wytwarzać analogi statyn

Statyny, do których należą: lowastatyna, symwastatyna i fluwastatyna, są metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez szczepy *Aspergillus terreus* i *A. nidulans* (26-29). Poliketydy te są naturalnymi inhibitorami enzymu katalizującego redukcję hydroksymetylo-glutarylo-CoA (HMG-CoA) do mewalonianu – podstawowego etapu biosyntezy cholesterolu przez kręgowce. Statyny są lekami powszechnie stosowanymi w chorobach, którym towarzyszy hipercholesterolemia. Biosynteza statyn zachodzi przy udziale skomplikowanego systemu, w którym współdziałają dwa układy syntaz poliketydowych oraz dodatkowe enzymy niezależne od układów enzymatycznych syntaz (30). Zaobserwowano, że syntetyczne analogi statyn mogą stanowić bardziej efektywne inhibitory reduktazy HMG-CoA niż ich naturalne odpowiedniki (28,29). Warunkiem jest występowanie pierścienia δ -laktonowego w cząsteczce inhibitora, natomiast ogólna struktura inhibitora, w porównaniu z naturalnymi statynami może być uproszczona. Wspomniano już, że δ -lakton jest produktem dwóch pierwszych kondensacji syntazy DEBS. Jego struktura może być rozbudowana w wyniku kolej-



Rys. 4. Struktura chemiczna naturalnych statyn i ich analogów; 1-3 naturalne statyny wytwarzane przez *Aspergillus*; 4,5 syntetyczne analogi o aktywności statyn; 6,7 – potencjalne produkty biosyntezy, strukturalne analogi statyn. W zacieniowanym polu zaznaczono występowanie struktury triketidowego laktonu.

nej kondensacji poliketydowej, dając związek o strukturze zbliżonej do inhibitora reduktazy HMG-CoA (rys. 4). Rozumując w ten sposób, utworzono układ genetyczny, w którym fragment DNA kodujący moduł 2 DEBS zastąpiono fragmentem DNA kodującym dwa sąsiednie moduły (11,12) syntazy poliketydu rapamycyny (31). Układ ten, ekspresjonowany w komórkach *S. erythraea* wydajnie wytwarzał oczekiwany związek tetraketydowy (produkt trzech kondensacji). Otrzymany tetraketyd nie stanowi jeszcze gotowego leku. Będąc analogiem statyny posłużył on jako związek wyjściowy do dalszych modyfikacji, a także w badaniach nad aktywnością inhibicyjną tetraketydu oraz nad wydajnością hybrydowego układu enzymatycznego. Podczas „konstrukcji” tego układu enzymatycznego uzyskano cenne informacje dotyczące roli struktury regionów białek, które odgraniczają domeny sąsiadujące w układzie, lecz pochodzące z innych naturalnych białek syntazy (32). Optymalizacja wydajności układu enzymatycznego, który w gruncie rzeczy jest układem sztucznym, a jednocześnie jest zdolny do przeprowadzania biosyntezy w komórkach promieniowca, nadal jest wyzwaniem.

4. Kombinatoryczne biblioteki poliketydów

Organizacja genetyczna syntaz poliketydowych dokładnie odpowiada kolejności ułożenia domen w wielofunkcyjnym białku oraz kolejności, w jakiej poszczególne domeny są aktywne podczas biosyntezy. Biorąc pod uwagę fakt, że sekwencja aminokwasowa domen spełniających podobną funkcję w różnych syntazach jest bardzo podobna (33,34), można zaproponować zmiany w jednostkowych reakcjach i przeprowadzić wymianę analogicznych domen, a nawet całych modułów na ich odpowiedniki z syntaz aktywnych u innych mikroorganizmów. Moduły mogą mieć różny zestaw domen, a domeny mogą różnić się specyficznością substratową, z czego wynika duża liczba możliwych kombinacji. Mówiąc o wymianach domen, mamy oczywiście na myśli zmiany w strukturze kodujących je genów.

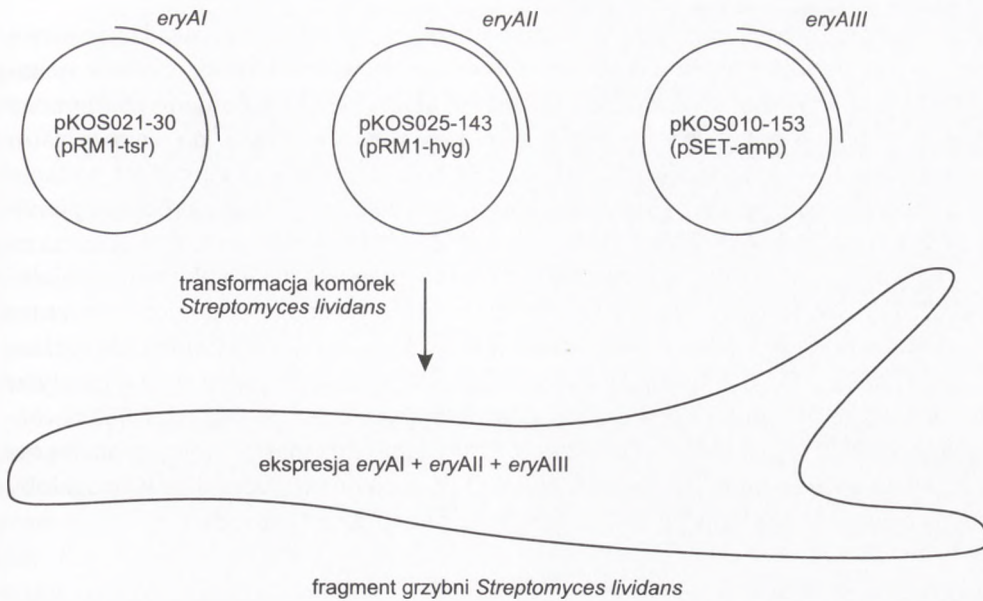
W ostatnich latach przybywa coraz więcej informacji dotyczących sekwencji pełnych zespołów genów kodujących syntazy poliketydowe, enzymy modyfikujące je, białka regulujące ekspresję syntazy i białka transportujące gotowe związki poza komórkę (4,17,35,36). Wśród mikroorganizmów, większość układów znanych syntaz kodowana jest przez genomowy DNA promieniowców.

Obecnie poznano około 7000 struktur naturalnych poliketydów. Stanowi to niewielką część struktur teoretycznych powstających w wyniku kombinacji domen o różnych aktywnościach (37). Na przykład posługując się układem syntazy DEBS, można teoretycznie połączyć w sześciu modułach syntazy domeny AT o dwóch różnych specyficznościach substratowych z pięcioma pozostałymi domenami wpływającymi na kondensację i redukcję poliketydu, otrzymując 10^7 możliwych kombinacji. Jeszcze większą liczbę kombinacji (10^{14}) otrzymamy łącząc domeny 14-modułowej syntazy rapamycyny (38,39).

W kilku ośrodkach farmaceutycznych podjęto zadanie uzyskania na drodze biosyntezy, na podstawie struktury makrolidu jakim jest 6-deokserytronolid B, możliwie bogatego zestawu nowych poliketydów. Związki te mogłyby same stanowić leki, bądź dostarczać szkieletu makrolaktonowego do otrzymania półsyntetycznych analogów. Uzyskano w ten sposób **kombinatoryczne biblioteki związków** (40). Robert McDaniel i wsp. (Kosan Biosciences, Inc.) poddali ekspresji w komórkach promieniowców – *Streptomyces coelicolor* i *S. lividans* geny syntazy DEBS, w których wymieniano domeny AT i domeny biorące udział w redukcji na odpowiednie regiony z syntazy rapamycyny (RAPS) z *Streptomyces hygroscopicus* (39). Wymienione domeny AT wprowadzały inny niż AT z DEBS, substrat do kondensacji. Domenę KR z DEBS wymieniono na domenę o innej stereospecyficzności albo układ dwóch (DH + KR) lub trzech (DH + ER + KR) domen redukcyjnych, bądź spowodowano całkowite usunięcie domeny KR przez wprowadzenie na jej miejsce regionu łącznikowego pomiędzy domenami AT i ACP. Wymieniane fragmenty DNA były wprowadzane jako produkty reakcji PCR, zaopatrzone na końcach w dogodnie miejsca restrykcyjne. Powodowało to powiększenie syntazy o dodatkowe aminokwasy, które nie wpływały jednak ujemnie na aktywność kompleksu enzymatycznego. Nowy zestaw domen nie zawsze jednak powodował powstanie funkcjonalnego białka wytwarzającego analog erytronolidu. Analizowano wydajność wytwarzania poliketydu przez rekombinanty i w kolejnym etapie wprowadzano w układzie zmiany wielokrotne: domen AT i KR w tym samym module, albo podwójne lub potrójne podstawienia w różnych modułach. Łączeniu poddawano zawsze te kombinacje, w wyniku których powstawały rekombinanty najbardziej wydajnie wytwarzające poliketyd. W wyniku zastosowania produktywnych kombinacji uzyskano bibliotekę obejmującą 61 nowych związków poliketydowych, analogów erytronolidu.

5. Zastosowanie kombinacji wektorów do konstrukcji bibliotek związków poliketydowych

Opisane w poprzednim rozdziale biblioteki poliketydów uzyskano dzięki łączeniu pojedynczych, a następnie wielokrotnych mutacji w obrębie DNA kodującego domeny i moduły syntazy. Otrzymanie każdego z tych rekombinantów wymaga osobnej konstrukcji wektora ekspresyjnego, zawierającego cały zestaw genów zmienionej syntazy. Na przykład, jeśli chcemy uzyskać X mutacji genu *eryAI* syntazy DEBS, Y mutacji genu *eryAII* i Z mutacji genu *eryAIII*, należy przeprowadzić X + Y + Z eksperymentów, otrzymując w wyniku eksperymentu taką samą liczbę nowych związków. Przy zastosowaniu tej strategii otrzymanie dużych bibliotek kombinatorycznych może okazać się niezwykle pracochłonnym zadaniem. Aby ułatwić tworzenie bibliotek związków poliketydowych opracowano strategię klonowania mutantów, w których każdy gen syntazy został sklonowany na osobnym plazmidzie (37). Komórki odpowiedniego gospodarza są transformowane kilkoma kompatybilnymi pla-



Rys. 5. Zastosowanie trzech wektorów pKOS, z których każdy zawiera sklonowany pojedynczy gen syntazy DEBS (*eryAI*, *eryAll*, *eryAIII*) do jednoczesnej ekspresji pełnego zestawu tych genów w komórce *Streptomyces lividans*.

zmidami. Funkcjonalny układ enzymatyczny może powstać w wyniku niezależnej, równoczesnej ekspresji genów syntazy zlokalizowanych na kilku plazmidach (41-43). Posługując się podanym przykładem mutantów syntazy DEBS, która składa się z trzech białek zawierających po dwa moduły każde, można sobie wyobrazić osiem teoretycznych modyfikacji w każdym module (dwie domeny AT współpracujące z czterema innymi domenami), co daje $8 \times 8 = 64$ kombinacje przypadające na jedno białko syntazy. W wyniku jednoczesnej transformacji komórek trzema plazmidami, z których każdy niesie 64 warianty otrzymuje się $64^3 = 262\ 144$ teoretycznie możliwych kombinacji. Natomiast w wyniku transformacji komórek jednym plazmidem zawierającym określoną kombinację genów można otrzymać zaledwie $3 \times 64 = 192$ możliwe kombinacje.

Opisane podejście eksperymentalne zostało zbadane na modelowym układzie syntazy DEBS w komórkach *S. lividans* (37). Otrzymano funkcjonalne białka syntazy jako produkt translacji trzech różnych mRNA (rys. 5). Syntaza wytwarzała makrolidy z wydajnością podobną do wydajności układu ulegającego ekspresji z pojedynczego plazmidu, a wprowadzone wektory nie podlegały dalszej rekombinacji nawet po wielu podziałach.

Podstawową zaletą utworzonego systemu jest to, że posiadając zbiór funkcjonalnych (tzn. wydajnie wytwarzających poliketyd o zaplanowanej strukturze) mutant-

tów czyli bibliotekę, można ją w szybki sposób wzbogacić, wprowadzając nowe zmiany. Na przykład, jedną z możliwych zmian w omawianym układzie białek syntazy DEBS jest wprowadzenie mutacji unieczynniającej pierwszą domenę KS (domena kondensująca). Nieaktywna domena uniemożliwia wprowadzenie do syntezy naturalnej, starterowej reszty kwasu karboksylowego. Możliwe jest natomiast podanie egzogenego, syntetycznego substratu, którym jest diketyd – analog produktu pierwszej kondensacji poliketydowej (44). Podając diketydy o zróżnicowanej strukturze można wpłynąć na strukturę makrolidu w sposób znaczący dla ich aktywności biologicznej (45). W 14-członowym laktonie jakim jest erytronolid zmieniona struktura diketydu wpływa na podstawniki w pozycji 12 i 13, modulując aktywność antybakteryjną związku (45). W omawianym doświadczeniu podawano jeden rodzaj diketydu do medium fermentacyjnego szczepów zawierających mutacje syntazy DEBS w różnych modułach z wyjątkiem pierwszego. Otrzymano kilkanaście nowych analogów (37). To samo doświadczenie w systemie mutacji na jednym plazmidzie wymagałoby przeprowadzenia kilkunastu odrębnych manipulacji genetycznych.

6. Biblioteki glikozylowanych poliketydów

Wszystkie naturalne związki makrolidowe wyposażone są w reszty deoksy- i aminopochodnych cukrów prostych. Są to cukry nietypowe tzn. nie występujące w połączeniu z innymi związkami w komórce. Ich biosynteza jest skomplikowanym, wieloetapowym procesem, katalizowanym przez kilka enzymów uczestniczących w syntezie szkieletu podstawowego i jego modyfikacji (14,46). Połączenie makrolidów z resztami cukrowymi warunkuje lub wzmacnia ich aktywność biologiczną. Erytromycyna A zawiera dwie reszty cukrowe – kładynozę i dezozaminę. Pozbawienie cząsteczki jednej z nich obniża aktywność antybiotyczną związku (47). W wyniku pewnych modyfikacji chemicznych erytronolidu powstają co prawda związki, których aktywność kompensuje brak kładynozy, jednakże obecność dezozaminy, jak się okazało, była niezbędna do tego, aby związek wykazywał działanie antybiotyku (48,49). Dezozamina występuje również w innych antybiotykach makrolidowych, takich jak oleandomycyna czy megalomycyna (50,47). W antybiotykach: pikromycynie, metymycynie oraz w półsyntetycznych pochodnych erytromycyny, dezozamina jest jedyną resztą cukrową odpowiedzialną za aktywność antybiotyczną (15,16).

Mając na uwadze tak duże znaczenie dezozaminy podjęto próbę utworzenia bibliotek poliketydów, w których do wytwarzania związków zostały włączone enzymy biosyntezy cukru i postpoliketydowej modyfikacji makrolidu (50). We wcześniej przeprowadzonych doświadczeniach nad biokonwersją modyfikowanych aglikonów makrolidowych wskazano, że glikozylotransferazy wykazują dużą tolerancję względem substratów innych niż naturalne (1,51,52). Procesy te przebiegały jednak w komórkach szczepów, w których trudności sprawiają modyfikacje genetyczne oraz szczepów nie przystosowanych do testowania bibliotek.

Utworzono system, w którym skonstruowano wektor plazmidowy niosący sześć genów uczestniczących w biosyntezie dezozaminy oraz gen glikozylotransferazy. Pochodziły one z zespołu genów kodujących białka uczestniczące w biosyntezie pikromycyny. Geny te, zlokalizowane na chromosomie *Streptomyces venezuelae*, sąsiadują ze sobą i funkcja każdego z nich została potwierdzona eksperymentalnie (53). Glikozylotransferaza z układu biosyntezy pikromycyny przyłącza cukier bezpośrednio do narbonolidu (aglikonowa część pikromycyny), podczas gdy w innych znanych układach dezozamina jest kolejnym cukrem przyłączanym do aglikonu (50). Podejrzewano, że glikozylotransferaza narbonolidu nie będzie wykazywała ścisłej selektywności wobec zmodyfikowanego substratu. Jest to cecha pożądana przy wykorzystaniu enzymu do glikozylacji różnych wariantów strukturalnych makrolidu.

Do komórek szczepu *Streptomyces lividans* wprowadzono plazmid podlegający integracji z chromosomem i zawierający pełny zestaw genów białek uczestniczących w biosyntezie dezozaminy. Geny te znajdowały się pod kontrolą konstytutywnego promotora (genów biosyntezy innego poliketydu) i aktywatora transkrypcyjnego (54). Do komórek tego szczepu wprowadzono jednocześnie plazmid zawierający różne warianty zestawu genów biosyntezy makrolidów: metymycyny, pikromycyny, 6-deokserytronolidu B i zmodyfikowanych pochodnych erytronolidu. Utworzono bibliotekę składającą się z przeszło pięćdziesięciu zrekombinowanych wektorów ekspresyjnych. W komórkach *S. lividans* zachodziła jednoczesna ekspresja dwóch, wprowadzonych w wyniku manipulacji, szlaków metabolicznych: biosyntezy poliketydu i dezozaminy, w wyniku czego wytwarzane były dezozaminowe pochodne makrolidów. We wszystkich przypadkach *S. lividans* nie stanowił naturalnego gospodarza, w komórkach którego zachodzi ekspresja wymienionych makrolidów. Przeszło 20 spośród wytwarzanych związków wykazywało aktywność antybakteryjną (testowaną wobec *Bacillus subtilis*). Uzyskane struktury nowych związków potwierdzają zarówno dużą tolerancję glikozylotransferazy względem zmienionych substratów, jak i duże znaczenie reszty cukrowej dla aktywności antybakteryjnej zróżnicowanych strukturalnie związków. Wprowadzenie reszty cukrowej do zmodyfikowanych makrolidów daje również możliwości zbadania innych niż antybakteryjna, aktywności tych związków (czynniki przeciwwzapalne, immunomodulacyjne) (50).

7. Podsumowanie

Związki poliketydowe wytwarzane przez mikroorganizmy, głównie przez bakterie glebowe – promieniowce, charakteryzują się dużym zróżnicowaniem strukturalnym i zróżnicowaniem aktywności biologicznych. Najliczniej reprezentowane są antybiotyki. Szczególną grupę związków poliketydowych stanowią makrolidy, których strukturę można poddać złożonym i wielokrotnym modyfikacjom przez zastosowanie manipulacji w układzie kodujących je genów. Dzięki tym zabiegom można zarówno uzyskać związki zawierające elementy strukturalne poliketydów (analogi

statyn) jak i bogaty zestaw analogów naturalnych makrolidów (biblioteki kombinatoryczne). Zaangażowanie enzymów syntezy reszt cukrowych i ich przyłączania do makrolidu zwiększa bogactwo nowych, biologicznie aktywnych związków.

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej, przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych, KBN 6P04B 025 16.

Literatura

1. Donadio S., Staver M. J., McAlpine J. B., Swanson S. J., Katz L., (1991), *Science*, 252, 675-679.
2. Katz L., Donadio S., (1993), *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 875-912.
3. Gaisser S., Böhm G. A., Cortés J., Leadlay P. F., (1997), *Mol. Gen. Genet.*, 256, 239-251.
4. Shah S., Xue Q., Tang L., Carney J. R., Betlach M., McDaniel R., (2000), *J. Antibiotics*, 53, 502-508.
5. Summers R. G., Donadio S., Staver M. J., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R., Katz L., (1997), *Microbiology*, 143, 3251-3262.
6. Zhao L., Sherman D. H., Liu H.-W., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 10256-10257.
7. Zhao L., Ahlert J., Xue Y., Thorson J. S., Sherman D. H., Liu H.-W., (1999), *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9881-9882.
8. Cortés J., Haydock S. F., Roberts G. A., Bevirt D. J., Leadlay P. F., (1990), *Nature (London)*, 348, 176-178.
9. Schwecke T., Aparicio J. F., Molnar I., Konig A., Khaw L. E., Haydock S. F., Oliynyk M., Caffrey P., Cortes J., Lester J. B., Bohm G. A., Staunton J., Leadlay P. F., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7839-7843.
10. Kakavas S. J., Katz L., Stassi D., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 7515-7522.
11. Xue Y., Zhao L., Liu H. W., Sherman D. H., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12111-12116.
12. Ikeda H., Nonomiya T., Usami M., Ohta T., Omura S., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9509-9514.
13. Smith S., (1994), *FASEB J.*, 8, 1248.
14. Bohm I., Holzbaur I. E., Hanefeld U., Cortes J., Staunton J., Leadlay P. F., (1998), *Chem. Biol.*, 5, 407-412.
15. Holzbaur I., Harris R., Bycroft M., Cortes J., Bisang C., Staunton J., Rudd B., Leadlay P. F., (1999), *Chem. Biol.*, 6, 189-195.
16. Holzbaur I., Ranganathan A., Thomas I., Kearney D., Reather J., Rudd B., Staunton J., Leadlay P. F., (2001), *Chem. Biol.*, 8, 329-340.
17. Quiros L. M., Aguirrezabalaga I., Olano C., Mendez C., Salas J. A., (1998), *Mol. Microbiol.*, 28, 1177-1185.
18. Olano C., Lomovskaya N., Fonstein L., Roll J., Hutchinson C. R., (1999), *Chem. Biol.*, 6, 845-855.
19. Cortés J., Wiesmann K. E. H., Roberts G. A., Brown M. J., Staunton J., Leadlay P. F., (1995), *Science*, 268, 1487-1489.
20. Wiesmann K. E. H., Cortés J., Brown M. J. B., Cutter A. L., Staunton J., Leadlay P. F., (1995), *Chem. Biol.*, 2, 583-589.
21. Böhm I., Holzbaur I. E., Hanefeld U., Cortés J., Staunton J., Leadlay P. F., (1998), *Chem. Biol.*, 5, 407-412.
22. Pieper R., Gokhale R. S., Luo G., Cane D., Khosla C., (1997), *Biochemistry*, 36, 1846-1851.
23. Bycroft M., Weissman K., Staunton J., Leadlay P. F., (2000), *Eur. J. Biochem.*, 267, 520-526.
24. Oliynyk M., Brown M. J., Cortés J., Staunton J., Leadlay P. F., (1996), *Chem. Biol.*, 3, 833-839.
25. McDaniel R., Kao C. M., Hwang S. J., Khosla C., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 4309-4310.
26. Alberts A. W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1846-1851.

27. Tobert J. A., Bell G. D., Birtwell J., James I., Kurkovetz W. R., Pryor J. S., Buntinx A., Holmes I. B., Hao Y. S., Bolognese J. A., (1982), *J. Clin. Invest.*, 69, 913-919.
28. Stokker G. E., Hoffman W. F., Alberts A. W., Cragoe E. J., Deana A. A., Gilfillan J. L., Huff J. W., Novello F. C., Prugh J. D., Smith R. L., Wilard A. K., (1985), *J. Med. Chem.*, 28, 347-358.
29. Stokker G. E., Alberts A. W., Anderson P. S., Cragoe E. J., Deana A. A., Gilfillan J. L., Hishfield J., Holtz W. J., Hoffman W. F., Huff J. W., Willard A. K., (1986), *J. Med. Chem.*, 29, 170-181.
30. Kennedy, J., Auclair K., Kendrew S. G., Park Ch., Vederas J. C., Hutchinson C. R., (1999), *Science*, 284, 1368-1372.
31. Ranganathan A., Timoney M., Bycroft M., Cortes J., Thomas I., Wilkinson B., Kellenberger L., Hanefeld U., Galloway I., Staunton J., Leadlay P. F., (1999), *Chem. Biol.*, 6, 731-741.
32. Staunton J., Caffrey P., Aparicio J. F., Roberts G. A., Bethell S. S., Leadlay P. F., (1996), *Nat. Struct. Biol.*, 3, 188-192.
33. Haydock S. F., Aparicio J. F., Molnar I., Schwecke T., Khaw L. E., Konig A., Marsden A. F., Galloway I. S., Staunton J., Leadlay P. F., (1995), *FEBS Lett.*, 374, 246-248.
34. Molnar I., Aparicio J. F., Haydock S. F., Khaw L. E., Schwecke T., Konig A., Staunton J., Leadlay P. F., (1996), *Gene*, 169, 1-7.
35. Wietzorrek A., Bibb M., (1997), *Mol. Microbiol.*, 25, 1182-1184.
36. Culebras E., Martinez E., Carnero A., Malpartida F., (1999), *Mol. Gen. Genet.*, 262, 730-737.
37. Xue Q., Ashley G., Hutchinson C. R., Santi D. V., (1999), *PNAS*, 96, 11740-11745.
38. Schwecke T., Leadlay P. F., (1995), *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 92, 7839-7843.
39. Aparicio J. F., Leadlay P. F., (1996), *Gene*, 169, 9-16.
40. McDaniel R., Thamchaipenet A., Gustafsson C., Fu H., Betlach M., Ashley G., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1846-1851.
41. Kao C. M., Katz L., Khosla C., (1994), *Science*, 265, 509-512.
42. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E. T., Rao R. N., Schoner B. E., (1992), *Gene*, 116, 43-49.
43. Servin-Gonzalez L., Sampieri A. I., Cabello J., Galvan L., Jerez V., Castro C., (1995), *Microbiology*, 141, 2499-2510.
44. Jacobsen J. R., Hutchinson C. R., Cane D. E., Khosla C., (1997), *Science*, 277, 367-369.
45. Marsden A. F., Wilkinson B., Cortes J., Dunster N., Staunton J., Leadlay P. F., (1998), *Science*, 279, 199-202.
46. Fish S. A., Cundliffe E., (1997), *Microbiology*, 143, 3871-3876.
47. Volchegursky Y., Hu Z., Katz L., McDaniel R., (2000), *Mol. Microbiol.*, 37, 752-762.
48. Griesgraber G., Or Y. T., Chu D. T. W., Nilius A. M., Johnson P. M., Flamm R. K., Henry R. F., Plattner J. J., (1996), *J. Antibiot.*, 49, 465-477.
49. Agouridas C., Denis A., Auger J.-M., Benedetti Y., Bonnefoy A., Bretin F., Cantot J.-F., Dussarat A., Fromentin C., D'Ambrierés S. G., Lachaud S., Laurin P., Le Martret O., Loyau V., Tessot N., (1998), *J. Med. Chem.*, 41, 4080-4100.
50. Tang Li., McDaniel R., (2001), *Chemistry & Biology*, 8, 547-555.
51. Donadio S., McAlpine J. B., Sheldon P. J., Jackson M., Katz L., (1993), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, (1993), 90, 7119-7123.
52. Ruan X. R., Pereda A., Stassi D. L., Zeidner D., Summers R. G., Jackson M., Shivakumar A., Kakavas S., Staver M. J., Donadio S., Katz L., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 6416-6425.
53. Zhao L., Sherman D. H., Liu H. W., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 10256-10257.