

Der Einfluss bakterieller Genomik auf die Naturstoff-Forschung

Helge B. Bode und Rolf Müller*

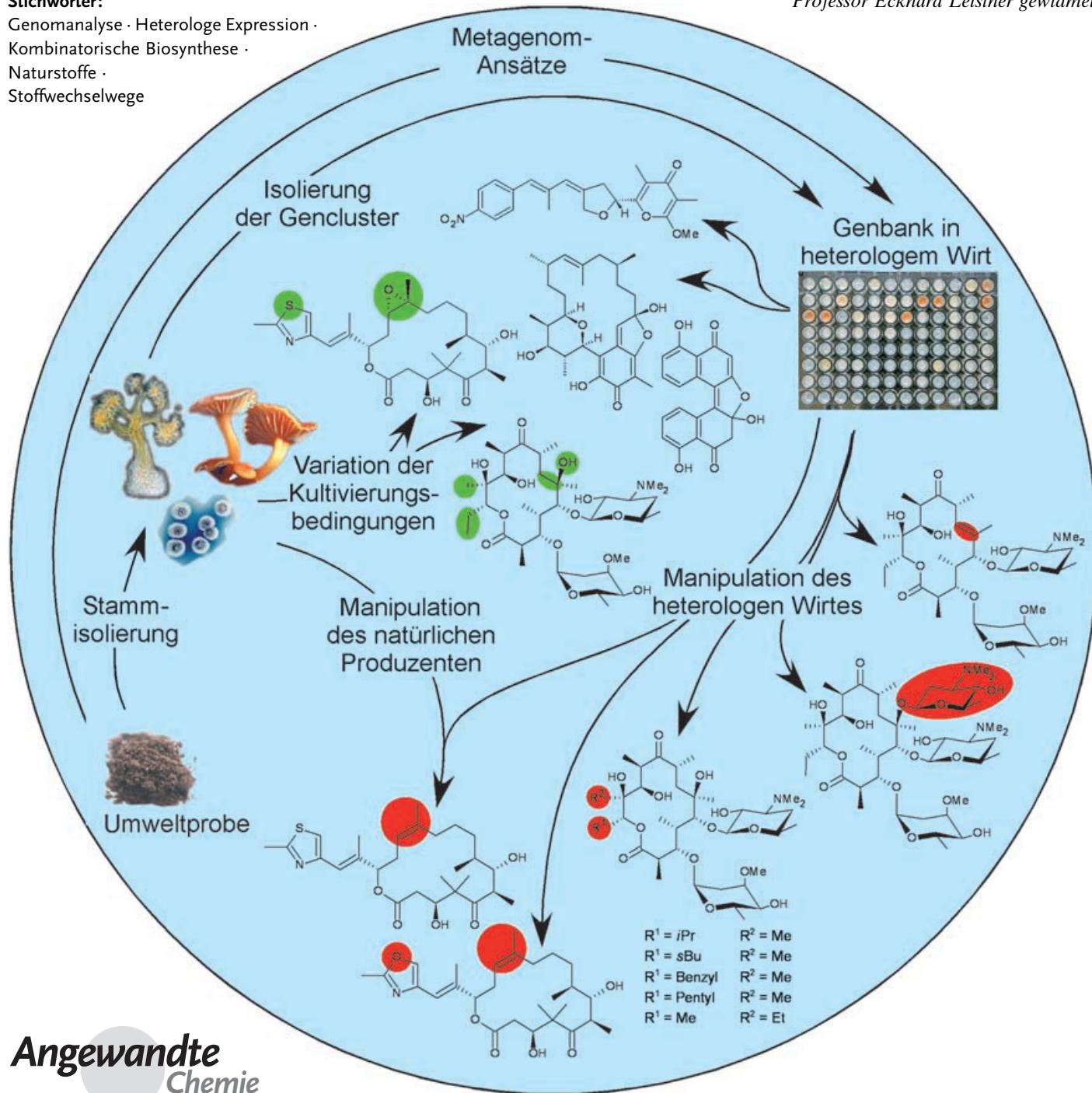
Stichwörter:

Genomanalyse · Heterologe Expression ·

Kombinatorische Biosynthese ·

Naturstoffe ·

Stoffwechselwege

Professor Eckhard Leistner gewidmet

„Totgesagte leben länger!“ Dieses Sprichwort gilt auch für die Naturstoff-Forschung. Nachdem Naturstoffe als Leitverbindungen durch die Einführung kombinatorischer Synthesetechniken in den Hintergrund gedrängt worden waren, haben sie ihren Rang in der pharmazeutischen Forschung zurückgerlangt. Durch Entwicklungen auf diesem Gebiet, das moderne Genomik mit angewandter Biologie und Chemie kombiniert, können Herausforderungen wie das vermehrte Auftreten multiresistenter Bakterien bewältigt werden, da neue Arzneistoffe und Leitstrukturen identifiziert, produziert und in ihrer Struktur verändert werden können. Der große Anteil der Sekundärstoffe und ihrer Derivate unter den klinisch eingesetzten Substanzen erklärt sich dadurch, dass sich Naturstoffe häufiger durch biologische Aktivitäten auszeichnen als Synthetika. Dieser Aufsatz beschreibt den Einfluss der mikrobiellen Genomik auf die Naturstoff-Forschung, insbesondere auf die Suche nach neuen Leitstrukturen und deren Optimierung, zeigt ihre Grenzen auf und gibt Einblicke in mögliche zukünftige Entwicklungen.

1. Einleitung

Ohne die derzeit medizinisch verwendeten Naturstoffe^[+] wäre menschliches Leben weniger angenehm und definitiv viel kürzer: Mehr als 75 % aller antibakteriellen Wirkstoffe und etwa 50 % aller Antitumorsubstanzen sind entweder Naturstoffe oder Naturstoffderivate.^[1] Antibakterielle Sekundärstoffe werden auch als letzte Therapieoption gegen multiresistente Mikroorganismen eingesetzt, die sonst oft tödlich verlaufende Infektionen hervorrufen. Permanent entwickeln die Krankheitserreger jedoch Resistenzen gegen Antibiotika, was auch vor Substanzen nicht Halt macht, die bisher als Reserveantibiotika Verwendung fanden. Auch beim Einsatz von Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen lautet die Frage nicht, ob eine Resistenz entsteht, sondern nur wann sie zuerst auftritt. Dieser Umstand ist vor allem auf die enorme Geschwindigkeit zurückzuführen, mit der Mikroorganismen genetische Information austauschen und mutieren. Je öfter Antibiotika verwendet werden, umso schneller breitet sich die Resistenz aus.^[2] Es ist offensichtlich, dass die Gewinner dieses Wechselspiels immer die Mikroben sein werden, was auch durch ihre große Anzahl und ihre kurzen Generationszeiten begründet werden kann. Nichtsdestoweniger muss die pharmazeutische Forschung versuchen, den therapeutischen Status Quo zu erhalten oder gar zu verbessern. Einen vielversprechenden neuen Naturstoff für die Behandlung einer beliebigen Krankheit zu finden, ist jedoch ein teures und schwieriges Unterfangen,^[3,4] weshalb viele große pharmazeutische Unternehmen in der Wirkstoffentwicklung ausschließlich auf synthetische Substanzen setzen.^[5,6]

Der Grund dafür kann in den Nachteilen gesehen werden, die Naturstoffe gegenüber Synthetika zu haben scheinen: 1) Die Isolierung und Charakterisierung ist aufwändig, 2) es ist daher nicht möglich, eine vergleichbare Zahl an Natur-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6989
2. Ansätze zur Erforschung des genetischen Potenzials	6993
3. Die Aussichten sind glänzend! <i>Naturstoff-Forschung in der Post-Genom-Ära</i>	7004

stoffen im selben Zeitraum herzustellen und zu testen wie Synthetika, und 3) der Naturstoff wird aus einer biologischen Quelle isoliert, was sowohl Erfahrung im Umgang mit dem produzierenden Organismus als auch eine spezielle Ausrüstung verlangt.

Diese Nachteile werden aber durch positive Charakteristika der Naturstoffe ausgeglichen, und einige der gegen

sie vorgebrachten Argumente können sogar zu ihrem Vorteil gewertet werden: 1) Naturstoffe ergänzen synthetische Verbindungen bei der Besetzung des strukturremischen Raums, wie in neueren Übersichten ausführlich diskutiert wird.^[7–12] Die prinzipiellen Unterschiede zu Synthetika reichen von einfachen Merkmalen wie Elementzusammensetzung und Molekulargewicht über spezifische Teilstuktureigenschaften wie Ringgröße und -art bis hin zur Gesamtkomplexität und allgemeinen stereochemischen Aspekten. 2) Naturstoffe sind die Produkte einer biologischen Entwicklung, und der Prozentsatz der biologisch aktiven Naturstoffe ist viel höher als der synthetischer Substanzen (obwohl nicht für alle Sekundärstoffe eine biologische Aktivität bestimmt wurde).^[13] Diese beiden Erkenntnisse resultierten in einem neuen Trend bei der Wirkstoffsynthese: Leitstrukturen werden entweder ausgehend von Naturstoffen synthetisiert, oder die Synthesen haben Naturstoff-Analoga zum Ziel.^[14–16] Inzwischen gibt es gemeinsame Ansätze von kombinatorischer Chemie und Naturstoff-Forschung, in denen sich beide Disziplinen gegenseitig unterstützen und bereichern.^[10,17] 3) Die biologische Quelle der jeweiligen Substanz ist häufig erneuerbar und eröffnet damit die Möglichkeit zur Produktion in größeren Mengen. Dies gilt insbesondere für leicht kultivierbare produzierende Organismen, was zugleich ein Haupt-

[*] Jun.-Prof. Dr. H. B. Bode, Prof. Dr. R. Müller
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-5473
E-mail: rom@mx.uni-saarland.de

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

[†] Im gesamten Aufsatz werden die Ausdrücke „Naturstoff“ und „Sekundärmetabolit“ bedeutungsgleich verwendet.

grund für die Verwendung von Bakterien und Pilzen als Quelle von Naturstoffen in der klinischen Anwendung ist. Dank unserer Kenntnisse der Genetik und der Prinzipien der biologischen Regulation ist es möglich, die Produktion dieser Substanzen zu optimieren (siehe Abschnitt 2.5). Ferner kann die Biosynthese der Substanzen dahingehend manipuliert werden, dass neue Derivate mit möglicherweise verbesserten Wirkungsprofilen daraus hervorgehen (siehe Abschnitt 2.6). Mögliche Wege, um diese Ziele für pharmakologisch relevante Naturstoffe zu erreichen, sind das zentrale Thema dieses Aufsatzes und werden in späteren Abschnitten anhand von Beispielen erläutert. Die meisten zitierten Arbeiten beschäftigen sich mit der Herstellung von Polyketiden und nichtribosomal biosynthetisierten Peptiden. Da diese Naturstoffe durch komplexe enzymatische Systeme, die Polyketid-synthasen (PKSn) und die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSn), gebildet werden, stellen wir diese Enzymsysteme und die resultierenden Stoffklassen in Schema 1 vor. Es muss jedoch angemerkt werden, dass viele bakterielle Naturstoffe auch auf anderen Stoffwechselwegen entstehen, z.B. auf dem Isoprenoid- oder dem Shikimaweg.^[18–20]

Bakterielle PKSn (Typ I) sind multifunktionale Enzyme, die in Modulen organisiert sind und aktivierte kurzkettige Carbonsäuren stufenweise miteinander verknüpfen. Jedes Modul enthält eine Reihe von nicht-iterativ eingesetzten katalytischen Domänen, die verschiedene Schritte eines Kettenverlängerungszyklus vermitteln.^[21] Typ-I-PKSn sind unter anderem an der Biosynthese von Makroliden, Polylethern und Polycyclen beteiligt. Typ-II-PKSn sind Multienzymkomplexe, die aus einem einfachen Satz iterativ arbeitender Proteine bestehen und bei der Biosynthese von aromatischen und oft polycyclischen Polyketiden eine Rolle spielen.^[22,23] Typ-III-PKS, auch Chalkonsynthase-ähnliche PKS genannt, sind homodimere, iterativ arbeitende Enzyme, deren Wirkungsweise am Beispiel der Flavolin-Bildung verdeutlicht werden kann.^[23] NRPSn sind ähnlich wie die Typ-I-PKS multifunktionale Enzyme, die in Modulen organisiert sind und Aminosäuren nichtribosomal miteinander verknüpfen. Die Module bestehen wiederum aus einem Satz nicht-iterativer katalytischer Domänen, welche die Ketten um die jeweils nächste Aminosäure verlängern (und gegebenenfalls modifizieren).^[24,25]



Helge B. Bode wurde 1973 geboren und studierte Chemie und Biologie in Göttingen und Stockholm. Nach seiner Promotion (2000) in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Zeeck über Naturstoffchemie beendete er 2001 sein Biologiestudium mit einer Diplomarbeit in molekulärer Mikrobiologie in der Gruppe von Prof. G. Braus. Nach Aufenthalt als DFG-Postdoktorand bei R. Müller in Braunschweig und Prof. D. Kaiser in Stanford wurde er im April 2004 zum Juniorprofessor für Naturstoff-Biotechnologie an der Universität des Saarlandes ernannt.

Sein Hauptinteresse gilt der Aufklärung der komplexen biochemischen Zusammenhänge bei der Entwicklung von Myxobakterien.

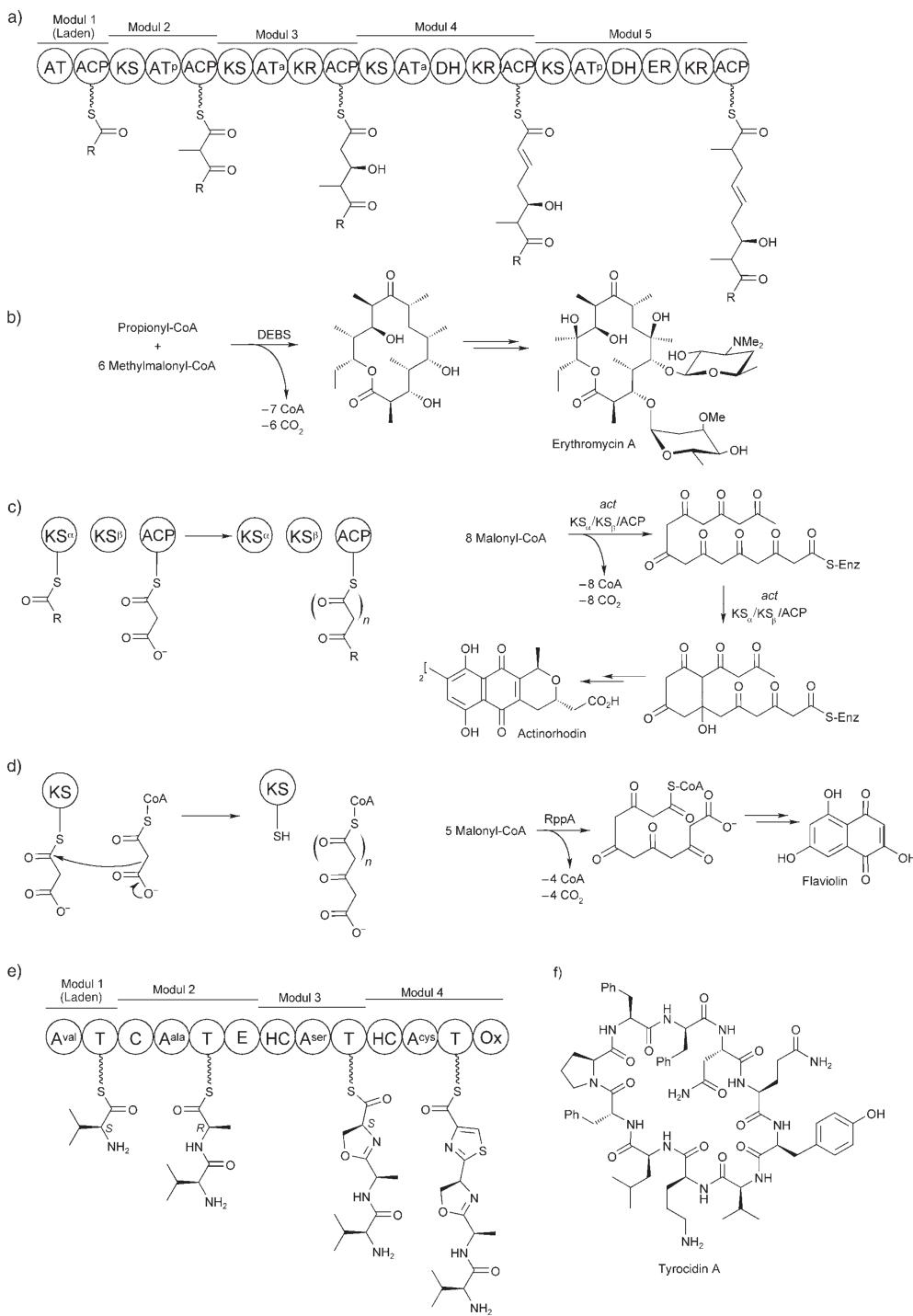
1.1. Zunahme von Sequenzinformationen

Seit der Veröffentlichung der ersten vollständigen mikrobiellen Genomsequenz von *Haemophilus influenzae* im Jahre 1995^[31] sind mehr als 250 Genome komplett aufgeklärt worden (Abbildung 1) und mehr als 600 Prokaryoten und 460 Eukaryoten werden gerade sequenziert.^[32] Während in den Anfängen der Genomsequenzierung pathogene Bakterien im Mittelpunkt standen, holt die Biotechnologie inzwischen deutlich auf: Zurzeit beschäftigen sich 47% aller bakteriellen Sequenzierprojekte mit Organismen, die industriell genutzt werden. Hierzu gehören auch immer mehr Sekundärstoffproduzenten. 52% der Projekte konzentrieren sich weiterhin auf pathogene Organismen, und etwa 1% beschäftigt sich mit exotischen Mikroorganismen.^[32] Der Wert der exponentiell zunehmenden Sequenzinformationen ist kaum bezifferbar, da Bioinformatik und komplexe Ansätze wie Transkriptom- und Proteomanalysen gerade erst begonnen haben, wichtige Forschungsthemen wie Virulenzmechanismen, Wechselwirkungen zwischen Wirt und Krankheitskeim, die Suche nach neuen molekularen Zielstrukturen oder neue Wege zur Naturstoffproduktion zu erschließen. Sequenzdaten von vielen klinischen Isolaten oder verschiedenen Stämmen eines einzigen Erregers sammeln sich an, und diese wertvollen Informationen liefern einerseits neue Einblicke in die genetische Variabilität einer bestimmten Art, erleichtern andererseits aber auch Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp.^[33]

Unerwarteterweise hat die Genomsequenzierung von bekannten Naturstoffproduzenten (*Streptomyces* sp.,^[34,35] *Arabidopsis*^[36]) gezeigt, dass diese Organismen weit mehr Gene aufweisen, die für Enzyme des Sekundärstoffwechsels codieren, als bislang angenommen wurde. Noch überraschender ist, dass viele bislang nicht als Naturstoffproduzenten bekannte Organismen die typischen Gene und oft großen Biosynthese-Gencluster für die Produktion hypothetischer oder noch nicht erkannter Naturstoffe enthalten. Möglicherweise liegt die Diskrepanz zur Zahl bekannter Sekundärstoffe daran, dass der Sekundärmetabolismus bislang nur in wenigen Taxa intensiv studiert worden ist (Pflanzen, Pilze, einige bakterielle Taxa). Fast alle sequenzierten Bakterien, Pilze und Pflanzen zeigen zumindest einige für die Naturstoffpro-



Rolf Müller studierte Pharmazie in Bonn und promovierte dort 1994 im Arbeitskreis von Prof. E. Leistner. Anschließend forschte er zwei Jahre als DFG-Forschungsstipendiat im Arbeitskreis von Prof. H. Floss, Seattle. Studien an Myxobakterien bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung führten zu seiner Habilitation (TU Braunschweig, 2001). 2003 erhielt er den BioFuture-Preis des BMBF, und noch im selben Jahr wurde er Leiter des Instituts für Pharmazeutische Biotechnologie an der Universität des Saarlandes. Derzeit beschäftigt er sich mit der biotechnologischen Umsetzung myxobakterieller Genomprojekte und der heterologen Expression und Modifikation komplexer Megasyntetasen in Pseudomonaden und schnell wachsenden Myxobakterien.



Schema 1. Mechanismen und Strukturen bakterieller PKSs und NRPSs. a) Beispiel einer Typ-I-PKS, bestehend aus nicht-iterativ arbeitenden Domänen; Acyltransferase (AT), Acyl-Carrier-Protein (ACP), Ketosynthase (KS), Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER); a und p beschreiben die Spezifität der AT-Domäne für Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA.^[21] b) Die Biosynthese von Erythromycin A ist ein gut untersuchtes Beispiel für einen Typ-I-PKS-Mechanismus; 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS). c) Typ-II-PKS, bestehend aus iterativ arbeitenden Untereinheiten, beispielhaft gezeigt für die Biosynthese von Actinorhodin; Chain Length Factor (KS_β).^[21,26] d) Typ-III-PKS, bestehend aus einem iterativ arbeitendem Enzym, beispielhaft gezeigt für die Biosynthese von Flavolin.^[23,27] e) Beispiel einer NRPS-Biosynthese; Adenylierungsdomäne (A), Peptidyl-Carrier-Protein (T), Kondensationsdomäne (C), Epimerisierungsdomäne (E), Heterocyclisierungsdomäne (HC), Oxidationsdomäne (Ox).^[28,29] f) Die Biosynthese von Tyrocidin A ist ein gut untersuchtes Beispiel für die NRPS-Biosynthese.^[29,30]

duktion typische Biosynthesegene, was andeutet, wie weit ihr evolutionärer Ursprung zurückliegt.

1.2. Pflanzen – Potenzial und Probleme

Pflanzen haben das größte Potenzial für die Produktion von Naturstoffen. Das verdeutlicht die enorme Vielzahl an niedermolekularen Substanzen, die in Pflanzenmaterialien zu finden ist.^[37] Der Aufbau eines typischen Pflanzengenoms erschwert jedoch die molekularbiologische Erforschung des pflanzlichen Sekundärmetabolismus: 1) Die Gene für die Naturstoffproduktion befinden sich in der Regel nicht auf einem einzigen DNA-Abschnitt (in Form eines Biosynthese-Genclusters, wie es üblicherweise in Bakterien und auch oft bei Pilzen der Fall ist), sondern sie sind im ganzen Genom verstreut. Somit ist die Identifizierung eines vollständigen Stoffwechselwegs in Pflanzen besonders zeitraubend. 2) Die Exon-/Intron-Struktur der Gene führt zu einer Reihe von Problemen. Daher muss ausgehend von mRNA-Proben cDNA erzeugt werden, um die gewünschten Gene zu identifizieren.

Ein gutes Beispiel für die geschilderte Problematik ist das potente Tumorthapeutikum Paclitaxel (Taxol), das 1971 aus der Rinde der pazifischen Eibe isoliert wurde. Diese Form der Gewinnung ist ökologisch fragwürdig, sodass es lange Zeit problematisch war, große Substanzmengen zu erhalten. Heute wird die Substanz semisynthetisch ausgehend von 10-

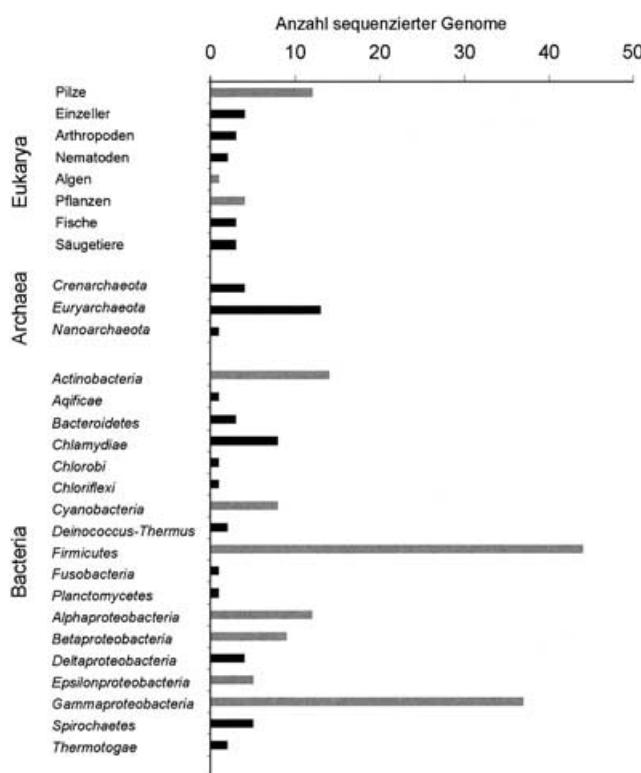
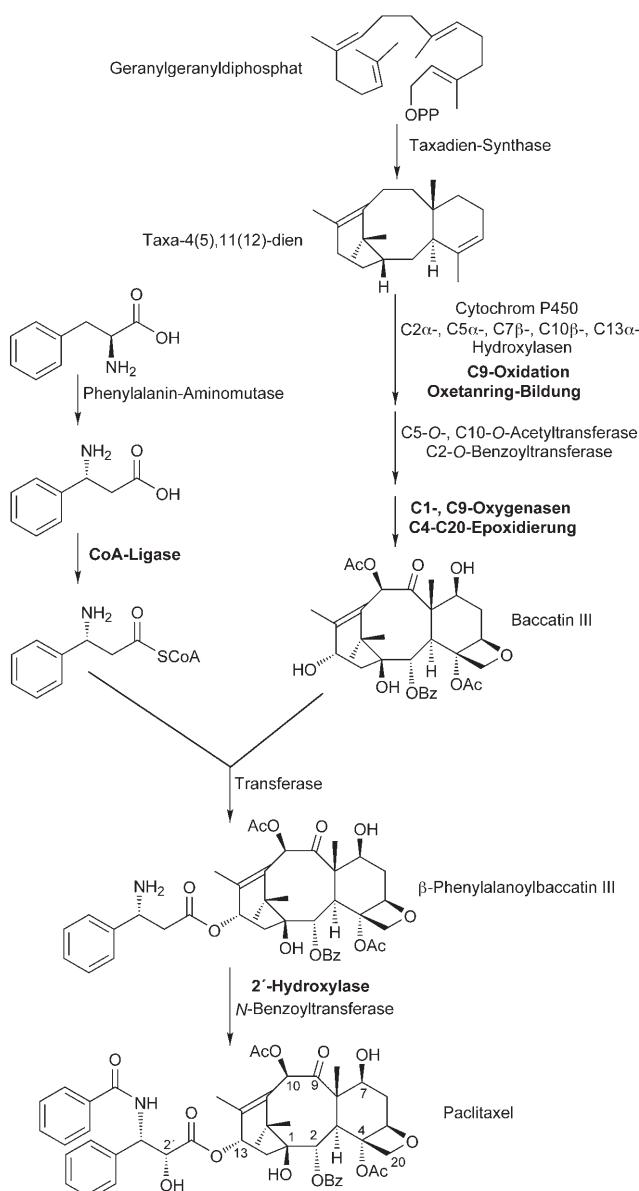


Abbildung 1. Derzeit publizierte Genome, geordnet nach taxonomischen Gesichtspunkten. Organismengruppen, unter denen experimentell verifizierte Sekundärmetabolit-Produzenten sind, sind grau dargestellt.

Desacetylbaicatin III hergestellt, das in großen Mengen aus den Nadeln der Eibe (und somit aus einer regenerativen Quelle) isoliert werden kann.^[38] Der verbreitete Gebrauch von Paclitaxel bei der Behandlung von Brustkrebs hat zahlreiche Bemühungen ausgelöst, diese wertvolle Substanz entweder in pflanzlichen Zellkulturen^[39] oder in schnell wachsenden bakteriellen Wirten nach der heterologen Expression der notwendigen Enzyme herzustellen. Die komplexe Taxol-Biosynthese benötigt jedoch mindestens 19 Biosyntheseschritte, und das erklärt, warum trotz bahnbrechender Erfolge insbesondere der Gruppe um Croteau viele Biosynthesegene noch immer unbekannt sind (Schema 2).^[40–43] Interessanterweise wird Paclitaxel auch in endophytischen Pilzen produziert, die aus verschiedenen Eiben isoliert wurden. Trotz der geringen Produktionstiter ermöglichen diese Pilze einen Vergleich ihrer Paclitaxel-Biosynthese mit dem Pflanzensystem und weisen damit den Weg für potenzielle biotechnologische Prozesse.^[39]

1.3. Pilze – das gelobte Land?

Schon seit alters her dienten Pilze als eine reiche Quelle für Naturstoffe in Nahrungsmittelindustrie und Medizin sowie für rituelle Zwecke. Die Ära der modernen Naturstoff-Forschung mit Pilzen begann im Jahre 1928 mit einer kontaminierten Agarplatte in Alexander Flemings Labor, die letztlich zur Entdeckung und zum klinischen Gebrauch von



Schema 2. Biosynthese von Paclitaxel (Taxol). Enzymaktivitäten, die von noch nicht klonierten Genen abhängig sind, sind fett gedruckt.^[40–43]

Penicillin gegen bakterielle Infektionen führte.^[44] Seitdem haben sich Pilze immer wieder als eine beeindruckende Quelle für Leitstrukturen in der Medizin bewährt, unter anderem für das Immunsuppressivum Cyclosporin^[45] und den Cholesterinsenker Lovastatin.^[46]

Die gentechnische Nutzung von Pilzen erlebte einen Aufschwung durch die Verfügbarkeit der vollständigen Genomsequenz der Modellhefe *Saccharomyces cerevisiae* im Jahr 1997.^[47] Seitdem wurden weitere Modellstämme sequenziert, um die Molekularbiologie von Pilzen und ihre Einsatzmöglichkeiten in der Biotechnologie zu erforschen (*Schizosaccharomyces pombe* (2002),^[48] *Neurospora crassa* (2003),^[49] *Phanerochaete chrysosporium* (2004),^[50] *Yarrowia lipolytica* (2004) und *Kluyveromyces lactis* (2004)^[51]).

Seit dem Jahr 2004 ist die erste Genomsequenz für einen naturstoffproduzierenden Pilz (den Weißfäulepilz *Phaner-*

ochaete chrysosporium) bekannt.^[50] Mehr als 50 an der Naturstoffbiosynthese beteiligte Gene, einschließlich verschiedener PKS und NRPS codierender Gene, wurden im 30-Mbp-Genom identifiziert. Anzumerken ist, dass die Biosynthese von Polyketiden oft Post-PKS-Biosyntheseschritte und Umwandlungen durch Cytochrom-P450-abhängige Enzyme einschließt. Mehr als 100 entsprechende Gene wurden im Genom identifiziert. Da die meisten Gene für die Naturstoffbiosynthese in *P. chrysosporium* und in anderen Pilzen im Allgemeinen in Genclustern angeordnet sind, können die kompletten Stoffwechselwege leichter identifiziert und studiert werden als bei Pflanzen.

Zurzeit werden weltweit 113 Pilzgenome sequenziert.^[32] Die meisten dieser Projekte beschäftigen sich mit bekannten Naturstoffproduzenten (z. B. *Penicillium chrysogenum* und 13 verschiedenen *Aspergillus*-Arten) oder pflanzenpathogenen Arten, die ebenfalls Naturstoffe produzieren (z. B. *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Magnaporthe* sp.). Diese Projekte werden ohne Zweifel wertvolle Einblicke in die Naturstoffbiosynthese von Pilzen bieten, die derzeit weit weniger gut erforscht sind als bakterielle Systeme. Ein vorhersehbares Problem bei Pilzen ist das Fehlen genetischer Methoden zur Manipulation vieler Stämme. Nichtsdestotrotz haben Pilze ein enormes Potenzial, und die meisten der Vorteile, die im Folgenden mit Bezug auf Bakterien genannt werden, zeichnen auch Pilze aus.

1.4. Bakterien – je größer, desto besser?

Untersuchungen zu Bakterien und insbesondere zum bakteriellen Sekundärmetabolismus haben gegenüber der Forschung an Pflanzen und Pilzen eine Reihe von Vorteilen: 1) Gene für die Biosynthese der gewünschten Substanzen sind zumeist in Genclustern gruppiert; 2) die Gendichte der bakteriellen Genome ist höher, und die Sequenzierungskosten sind somit geringer; 3) es sind keine Introns vorhanden, sodass die Expressionsmethoden direkt an der chromosomal DNA ansetzen können; 4) die kompakte genetische Anordnung erlaubt eine schnelle Identifizierung der bakteriellen Genclustern und ihre Übertragung in unterschiedliche Expressionswirte; 5) Fermentationsprozesse, die eine Produktion in großem Umfang zulassen, können entwickelt werden (dies trifft auch auf Pilze zu).

Aufgrund ihrer relativ geringen Größe wurden bisher weit mehr Bakteriengenome sequenziert als Eukaryotengenome. Frühe Genomprojekte konzentrierten sich dabei hauptsächlich auf pathogene Bakterien, während sich 47% aller gegenwärtigen Projekte mit biotechnologisch relevanten Stämmen beschäftigen. Bis jetzt wurden jedoch nur die Genome weniger Arten sequenziert, die bereits als Produzenten von Sekundärmetaboliten bekannt waren. Die Genomsequenz dieser Stämme enthüllte indes eine Fülle von Genclustern, die möglicherweise zur Produktion zusätzlicher, bisher unbekannter Sekundärmetabolite dienen (Abbildung 2). Die am besten untersuchten Organismen, *Streptomyces coelicolor* und *S. avermitilis* waren für die Produktion von vier bzw. drei Naturstoffen bekannt, besitzen tatsächlich aber 20 bzw. 25 Gencluster für die Biosynthese von Natur-

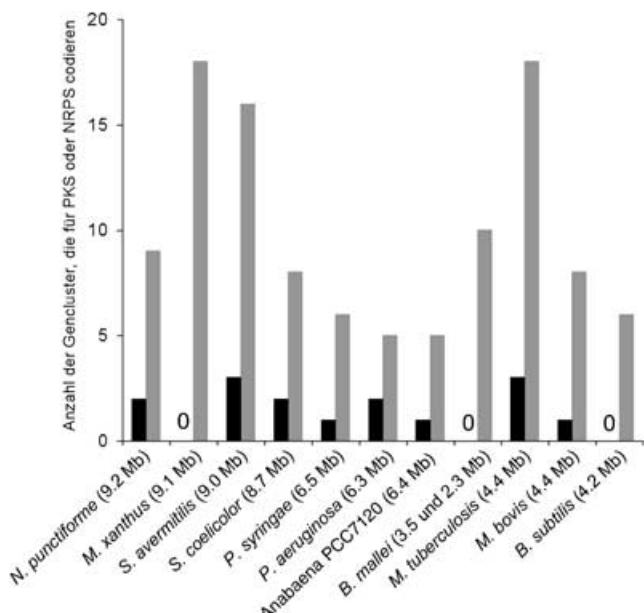


Abbildung 2. Ausgewählte komplett sequenzierte prokaryotische Sekundärmetabolit-Produzenten mit der Anzahl der aus ihnen isolierten Polyketide und nichtribosomal hergestellten Peptide vor Bekanntgabe der Genomsequenz (schwarze Balken). Identifizierte Gencluster, die PKS und NRPS im Genom codieren, sind mit grauen Balken dargestellt.^[32] Die Daten wurden aus den entsprechenden Originalarbeiten entnommen oder durch BLAST-Suche nach KS-, KR-, TE-, ACP-, T- und A-Domänen erhoben.

stoffen.^[34,35] Im Fall von *S. coelicolor* hat eine detaillierte Untersuchung des Produktionsprofils nach Bekanntgabe der Genomsequenz bereits zur Isolierung von zwei Substanzen geführt, deren Existenz anhand der Sequenzdaten postuliert wurde.^[52,53]

Die statistische Analyse aller bekannten bakteriellen Genome zeigt, dass eine positive Korrelation zwischen der Genomgröße und der Zahl der an der Naturstoffbiosynthese beteiligten Gene besteht.^[54] Große Genome, wie sie für die meisten Produzenten von Sekundärmetaboliten gefunden werden, können eine Konsequenz der komplexen ökologischen Nischen darstellen, in denen diese Organismen leben. Um mehr über diese Zusammenhänge zu erfahren, müssen aber erst weitere ökologisch relevante Arten sequenziert werden.^[55] Aus der gewaltigen Diskrepanz zwischen der Zahl an isolierten Substanzen und dem genetischen Potenzial ergeben sich vor allem zwei Fragen: Wie können wir die noch nicht isolierten Produkte erzeugen und identifizieren? Und wie können wir das enorme genetische Potenzial effektiv nutzen? In den folgenden Abschnitten werden wir auf diese Fragen anhand ausgewählter Beispiele eingehen.

2. Ansätze zur Erforschung des genetischen Potenzials

2.1. Ungezielt, aber einfach und erfolgreich

Die Variation der Kultivierungsbedingungen ist vermutlich der einfachste Weg, um zusätzliche Sekundärmetabolite

aus einem Stamm zu erhalten, der das genetische Potenzial zur Produktion vieler Substanzen hat. Dieser Ansatz geht davon aus, dass die Produktion von Naturstoffen eine Reaktion des produzierenden Organismus auf eine Veränderung seiner Umwelt darstellt.^[13] Beispielsweise müssen in der Rhizosphäre lebende Bodenbakterien mit Pilzen um Nährstoffe konkurrieren. Die Produktion von antifungalen Substanzen wäre in dieser Umgebung folglich von Vorteil. Umgekehrt könnte die Zusammensetzung des künstlichen Mediums, die Kultivierungsbedingungen und die hohe Zelldichte unter Laborbedingungen Regulationsmechanismen in den Zellen hervorrufen, die zur Produktion von einigen Substanzen führen, während die Produktion von anderen Metaboliten jedoch verhindert wird, die unter variierten und vielleicht „natürlicheren“ Bedingungen produziert werden könnten. Da unser Wissen um die ökologischen Verflechtungen noch sehr gering ist, sind ungerichtete Methoden (Variation von leicht zugänglichen Kultivierungsparametern wie Medienzusammensetzung, Belüftung, Zugabe von Chemikalien, etc.) am ehesten geeignet, die Expression von ansonsten latenten Biosynthese-Genclustern zu induzieren. Dieser Ansatz kann direkt oder indirekt sowohl die Transkription und die Translation als auch die Enzymaktivität und -spezifität im gesamten Organismus beeinflussen (Abbildung 3). Verwandte Techniken sind für die Optimierung der Biosynthese eines gewünschten Produktes weit verbreitet, und ihre Anwendung in der Naturstoffisolierung hat in einigen Fällen zu einer beeindruckenden Vielzahl neuer Naturstoffe geführt. Daher werden diese Methoden heute auch von pharmazeutischen und biotechnologischen Firmen eingesetzt.^[15]

Nach der Kultivierung des Asperginen-Produzenten *Aspergillus ochraceus* DSM7428 in unterschiedlichen Medien und Kultivierungsgefäßen (resultierend in unterschiedlichen Belüftungsraten) wurden 15 weitere Naturstoffe aus verschiedenen Strukturklassen isoliert. Insbesondere die mehrtägige statische Kultivierung (ohne Schütteln) führte zu einem vollkommen anderen Metabolitenspektrum (Schema 3).^[56,57] Bei statischer Kultivierung unter vergleichbaren Bedingungen produzierte ein weiterer Pilz bis zu 2.6 g L⁻¹ der reduzierten Vorstufe des Hauptmetaboliten aus der Schüttelkultur (120 mg L⁻¹).^[58] Da die Variation der Wachstumsbedingungen oft in der Produktion von unterschiedlichen Substanzen resultiert, wird dieser Ansatz auch OSMAC (one strain – many compounds) genannt.^[56] Kürzlich wurde die chemische Vielfalt ausgewählter Stämme auch durch die Zugabe von Signalsubstanzen und sogar organischen Lösungsmitteln zum Wachstumsmedium erhöht.^[59,60]

2.2. Mögliche Wege, die unerschöpflichen Ressourcen zu nutzen

Die im Labor kultivierten Mikroorganismen repräsentieren weniger als ein Prozent der mikrobiologischen Vielfalt der Natur.^[61] Das Biosynthetepotenzial dieser unerforschten Diversität ist damit nahezu endlos und wirft die Frage auf, warum wir nur mit dieser begrenzten Anzahl von Bakterien arbeiten. Die Antwort darauf lautet, dass die „Labor“-Stämme sich unter künstlichen Bedingungen problemlos kultivieren lassen. Die zurzeit untersuchten Mikroorganismen wachsen schnell in Reinkultur und erreichen hohe

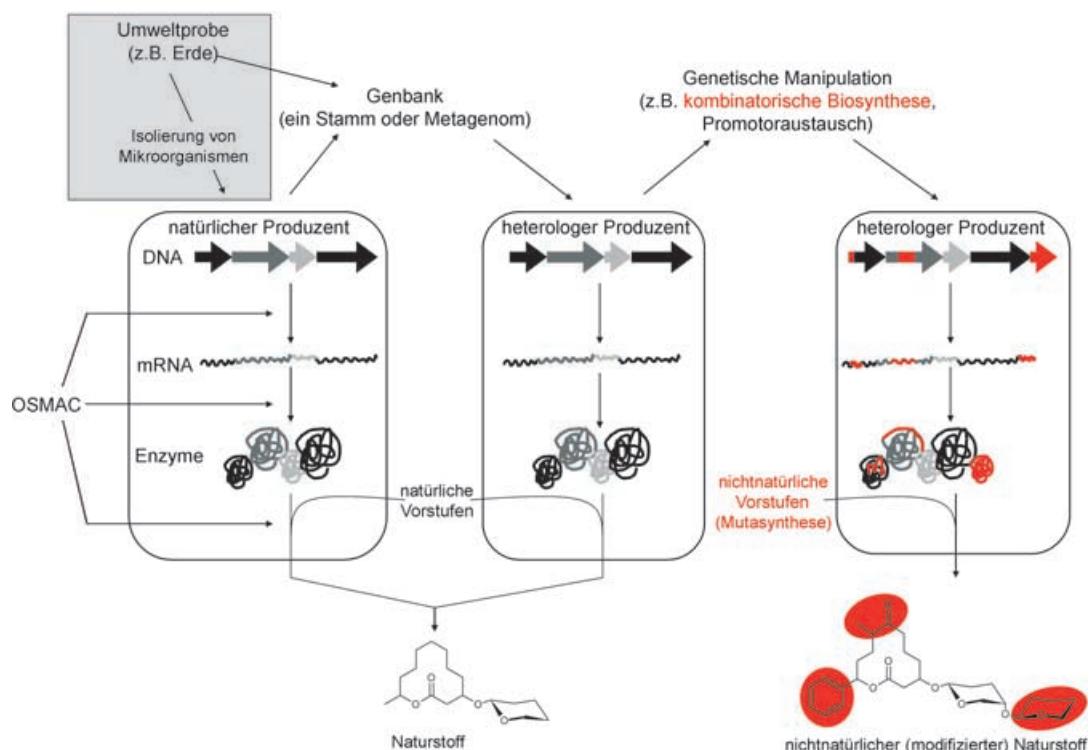
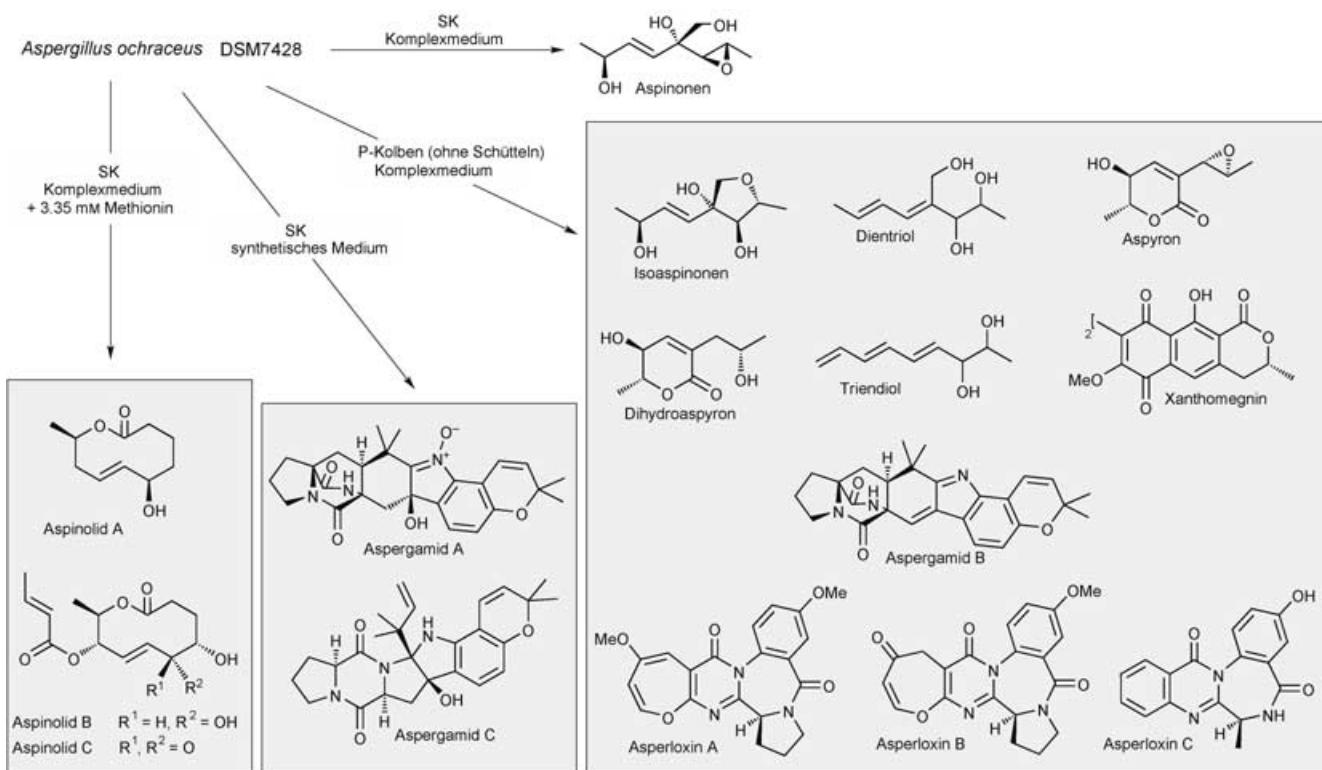


Abbildung 3. Beeinflussung der Produktion von Sekundärmetaboliten. Die Isolierung neuer Stämme und Metagenom-Ansätze sind grau unterlegt. Genetische Modifikationen, die zu veränderten Substanzen führen, sind rot markiert.



Schema 3. Aus *Aspergillus ochraceus* DSM7428 nach Variation der Kultivierungsparameter isolierte Sekundärmetabolite; Schüttelkultur (SK).^[56]

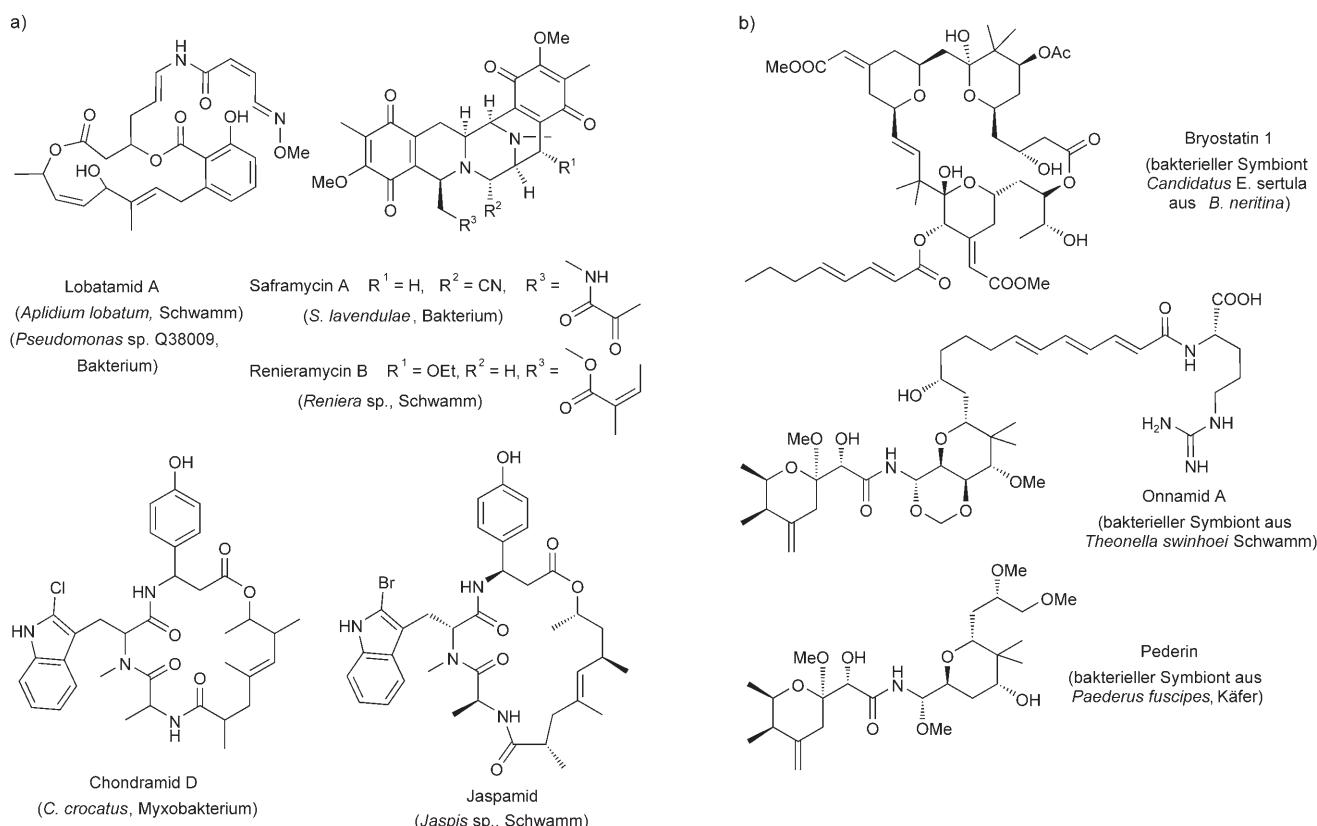
Zelldichten. Die Fähigkeit zu schnellem Wachstum ist jedoch nicht von Vorteil, wenn Nährstoffe nicht oder kaum vorhanden sind. Die Aufnahme von zuviel Nahrung kann sogar zum Tod von Zellen führen, sollten diese eine spezielle Diät benötigen. In der Natur sind nährstoffarme Bedingungen die Regel und nicht die Ausnahme; in vielen ökologischen Nischen stehen sogar zeitweise keinerlei Nährstoffe zur Verfügung.

Derzeit werden neue Techniken zur Kultivierung und Anreicherung vormals „nicht kultivierbarer“ Organismen entwickelt.^[62–65] Da diese Arbeiten sehr aufwändig und zeitintensiv sind, werden alternative Techniken entwickelt, die die Kultivierung der Organismen umgehen, aber immer noch die Erforschung ihrer biochemischen Vielfalt ermöglichen. Hierfür werden DNA-Bibliotheken direkt aus Umweltproben aufgebaut, welche die genetische Information aller Organismen enthalten, die zum Zeitpunkt der Probennahme vorhanden waren.^[66–68] Nach der Sequenzierung dieser Metagenome kann die genetische Information einzelner Organismen durch etablierte Methoden der Bioinformatik wieder zusammengestellt und analysiert werden. Dies wurde kürzlich sehr eindrucksvoll zahlreiche Mikroorganismen der Sargasso-See gezeigt.^[69] Auf diese Weise konstruierte DNA-Bibliotheken können in geeignete Wirtsorganismen transferiert werden, die dann auf die Produktion der gewünschten Substanzen und Enzyme hin getestet werden (siehe auch Abschnitt 2.5). Diese Techniken sind besonders wichtig für hoch potente biologisch aktive Verbindungen aus Organismen, die einer großtechnischen Kultivierung bisher nicht zugänglich sind (z.B. Moostierchen, Schwämme und Weichtiere).^[70] Interessanterweise existieren nämlich große struk-

turale Ähnlichkeiten zwischen einigen marinen Naturstoffen unbekannter Herkunft und Substanzen, die aus Bodenbakterien isoliert wurden (Schema 4). Aufgrund von neueren genetischen Daten ist deshalb inzwischen anerkannt, dass einige „marine“ Naturstoffe, die aus höheren Organismen isoliert wurden, tatsächlich Produkte vergesellschaftet lebender mariner Bakterien sind (z.B. Onnamid,^[71] Bryostatin^[72]). Daher sollte die Isolierung der Biosynthese-Gencluster die nachfolgende heterologe Produktion der entsprechenden Naturstoffe im großen Maßstab ermöglichen (siehe auch Abschnitt 2.5).

2.3. In-silico-Analyse genomischer DNA führt zur Produktion von neuen Naturstoffen

Die enorme Menge von Sequenzinformation für alle Arten von mikrobiologischen Organismen hat zur Entwicklung bioinformatischer Methoden für die Suche nach neuen Naturstoffen geführt. Obwohl die Techniken per se auf die Interpretation typischer Biosynthesegene des Sekundärmetabolismus begrenzt sind, können viele neue Naturstoff-Gencluster gefunden werden, da sie oft Ähnlichkeiten zu bekannten PKS- und/oder NRPS-Systemen aufweisen. Farnet und Mitarbeiter haben mit dieser Methode zahlreiche Gencluster identifiziert, die den Biosynthese-Genclustern der relativ seltenen Endiin-Antibiotika ähnlich sind.^[80] Eine gezielte Fermentation der entsprechenden Stämme unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen ermöglichte dann die Identifizierung zahlreicher neuer Endiin-Antibiotika produzierender Stämme. Daher kann man diese Technik als eine



Schema 4. Beispiele von strukturell ähnlichen Naturstoffen, die aus Bakterien oder marinen Organismen isoliert wurden (a),^[73–77] und von Naturstoffen, die von nichtkultivierten bakteriellen Symbionten oder höheren Organismen isoliert wurden (b).^[71, 72, 78, 79]

Kombination aus gezielter DNA-Analyse und dem OSMAC-Ansatz auffassen (siehe Abschnitt 2.1).

Wenn der Wirtsstamm genetisch manipulierbar ist, können – neben der vollständigen Sequenzierung von neuen Genclustern – auch kleine Fragmente der Gencluster verwendet werden, um die dazugehörigen Metabolite zu identifizieren. Zahlreiche Strategien beruhen auf degenerierter PCR zur Vervielfältigung von PKS- und/oder NRPS-Genfragmenten, mit deren Hilfe auch nichtsequenzierte Organismen auf PKS- und/oder NRPS-Genfragmente in entsprechenden Genclustern untersucht werden können. Sobald die an der Naturstoffbiosynthese beteiligten Regionen identifiziert sind, können die Fragmente in Genaktivierungsexperimenten verwendet werden, da die erzeugten Mutanten und die Wildtypstämme bezüglich ihrer Produktionsprofile verglichen werden können. Mit dieser Methode wurden bisher bereits drei neue Substanzen aus *Stigmatella aurantiaca* gefunden^[81] (Myxochelin,^[82] Myxochromid^[83] und Aurafuron^[84]; siehe Abbildung 4).

Vielelleicht wären diese Substanzen auch durch eine intensive Variation der Kulturbedingungen entdeckt worden, die genetische Information hat jedoch die Chancen der Identifizierung neuer Substanzen erheblich erhöht. Insbesondere für Substanzen, die nur in kleinen Mengen produziert werden, ist es schwierig zu entscheiden, ob diese tatsächlich neu sind oder lediglich aus dem Medium stammen. Letzteres kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, wenn die Produktion von einem unabhängigen Genlocus abhängt.

Während sich viele Gruppen auf die Identifizierung und biochemische Analyse neuer Biosynthesewege konzentrieren, verwenden Bioinformatiker bevorzugt die zahlreichen neuen mikrobiellen Genomsequenzen, um Stoffwechselwege *in silico* vorherzusagen. Auf der Grundlage der Enzymatik von PKS und NRPS^[21, 28, 85] können theoretisch – und abhängig von den angewandten bioinformatischen Methoden – sogar Strukturen unbekannter Substanzen vorhergesagt werden.^[86–89] Für einen identifizierten Gencluster unbekannter Funktion aus *S. aurantiaca* wurde vorhergesagt, dass er an der Biosynthese des Eisenchelators Myxochelin beteiligt ist, was dann auch experimentell bestätigt werden konnte.^[82, 90] Bacillibactin wurde in *Bacillus subtilis* gefunden, nachdem der entsprechende Gencluster in der Genomsequenz identifiziert worden war.^[91] Der Eisenchelator Coelichelin wurde ausgehend von den Genomdaten von *S. coelicolor* vorhergesagt^[92] und drei Jahre später gefunden.^[53] Obwohl die bioinformatischen Techniken zur Strukturvorhersage zunächst sehr überzeugend erscheinen, konnten nur sehr wenige der theoretisch vorhergesagten Substanzen identifiziert werden, was wahrscheinlich auf die nachstehend diskutierten Grenzen der Methodik zurückzuführen ist.

Alle Vorhersagen beruhen auf dem nichtribosomalen Code und/oder In-silico-Analysen der entsprechenden PKS- und NRPS-Gencluster. Es hat sich aber gezeigt, dass eine Vielzahl von Ausnahmen zu den allgemein akzeptierten Regeln für die Polyketid- und nichtribosomale Peptidbiosynthese existiert.^[93, 94] Eine dieser Regeln ist die „Colinearität“

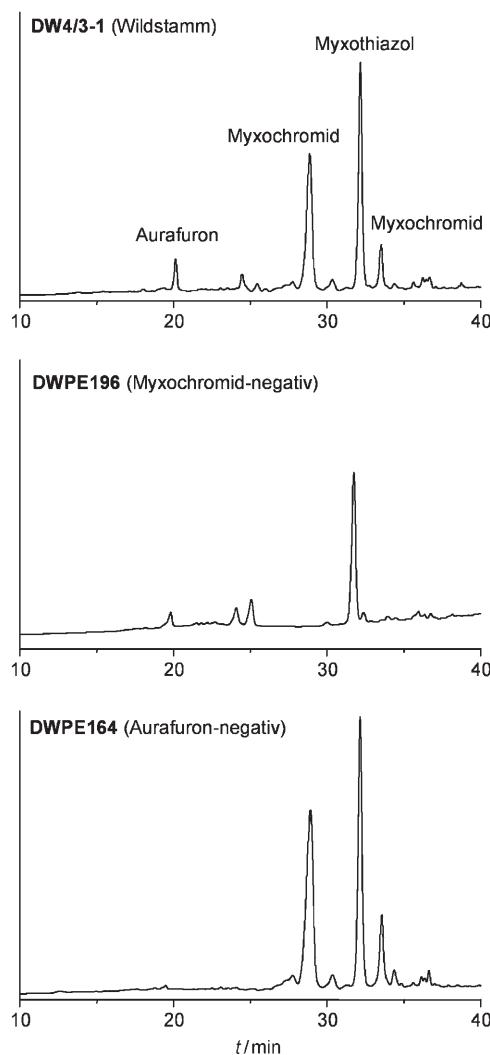


Abbildung 4. UV-Chromatogramme (Detektion bei 200–400 nm) bei der Korrelation von Biosynthese-Genclustern und Naturstoffen in *S. aurantiaca* DW4/3-1 durch HPLC-Vergleiche von Wildtyp und Mutanten.^[81]

der Biosynthese: Demnach besteht eine Korrelation sowohl zwischen Anzahl und Typ der Module als auch zwischen Anzahl und Typ der Verlängerungseinheiten, die in der Megasynthetase verwendet werden. Mittlerweile wurden jedoch das Überspringen von Modulen (module skipping)^[95] und die iterative Verwendung von Modulen in PKS-Systemen beschrieben. Die Vorhersage der Substrate (z.B. Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA) kann schwierig sein, und Module oder Domänen können inaktiv sein oder ganz fehlen.^[94,96] Ferner wurden auch inaktive NRPS-Domänen gefunden^[83,97] und der oft außerordentlich nützliche nichtribosomale Code stellte sich in einigen Beispielen als nicht anwendbar heraus.^[98,99] Darüber hinaus treten in Bakterien auch Biosynthesewege auf, deren zugehörige Gene auf verschiedenen Orten des Genoms lokalisiert sind, was Strukturvorhersagen unmöglich macht.^[99–101]

Insgesamt sind bioinformatische Vorhersagen von Sekundärstoffstrukturen möglich, wenn Biosynthesesysteme gefun-

den werden, die eng mit bereits bekannten Systemen verwandt sind. Für kompliziertere Fälle sind Vorhersagen allein mit den bestehenden bioinformatischen Hilfsmitteln sehr schwierig. Zum Beispiel könnten die Gencluster für die Biosynthese von Mupirocin^[102] oder Disorazol^[103] nicht dazu verwendet werden, die Struktur der produzierten Substanzen vorherzusagen. Ein kombinierter Ansatz, der experimentelle Biochemie mit hoch entwickelter Bioinformatik verbindet, sollte diese Situation in Zukunft jedoch verbessern.

2.4. Aktivierung „stiller“ Biosynthese-Gencluster

Eine Alternative zur Variation der Kultivierungsbedingungen und zu den oben beschriebenen Genomanalysen^[80] ist das Einfügen induzierbarer Promotoren in das Genom, um so die Expression bisher nicht charakterisierter, „stiller“ Biosynthese-Gencluster zu steuern. Obwohl ein derartiger Aktivierungsansatz ohne Ortsspezifität für die Genexpression beschrieben wurde,^[104] gibt es bisher keine Anwendung dieser Technik in naturstoffproduzierenden Mikroorganismen. Ein offensichtliches Problem hierbei wird die Notwendigkeit des Einbringens mehrerer Promotoren bei vielen Biosyntheseregionen sein.

Durch Kontrolle übergeordneter oder spezifischer Regulationsmechanismen innerhalb der Wirtszelle sollte die künstliche Expression nicht charakterisierter Gene möglich sein, die zur (Über-)Produktion von Naturstoffen führen könnten. Während negative Regulatoren inaktiviert werden müssten, könnten positive Regulatoren überexprimiert werden. Ein aktuelles Beispiel beschreibt die partielle Aktivierung eines stillen Angucyclin-Genclusters eines Streptomyketen.^[105] Nach Inaktivierung eines mutmaßlichen Repressorgens konnten aus der Mutante Angucycline isoliert werden. Der zentrale Regulator der Eisenaufnahme (ferric uptake regulator; Fur) kontrolliert zahlreiche spezifische Regulatoren, z.B. *pvdS* in *Pseudomonas aeruginosa*, das einen alternativen Sigma-Faktor codiert. Eine hierarchische Kaskade von direkter und indirekter Eisenregulierung wurde durch Transkriptomanalyse bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen untersucht.^[106] Eine starke Eisenregulierung wurde dabei für die zuvor bekannten Gene beobachtet, die an der Biosynthese oder der Aufnahme der Siderophore Pyoverdin und Pyochelin beteiligt sind. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sieben alternative Sigma-Faktoren und fünf weitere Transkriptionsfaktoren durch Fur bzw. Eisen reguliert werden.

Darüber hinaus können Xenobiotika und Pheromone die Expression einzelner Stoffwechselwege beeinflussen.^[107] Obwohl die Rolle von S-Adenosylmethionin (SAM) in der Antibiotika-Produktion alles andere als geklärt ist, wurde eine Korrelation zwischen der Actinorhodin-Produktion und der intrazellulären SAM-Konzentration beschrieben.^[108,109] Ein weiteres Beispiel für Substanzen, die Einfluss auf die Regulation des Sekundärmetabolismus in Streptomyketen ausüben, sind die γ -Butyrolactone.^[110] Davies und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sogar Antibiotika selbst schon in subinhibitiven Konzentrationen die Expression zahlreicher Gene beeinflussen.^[111] Auf diese Art könnten Naturstoffe auch an der Regulierung ihrer eigenen Biosynthese beteiligt

sein. Sie könnten aber auch die Biosynthese ähnlicher oder völlig unverwandter Substanzen in anderen Mikroorganismen steuern und damit die Produktion von weiteren Substanzen induzieren. Kürzlich haben Uchiyama et al.^[112] auf elegante Weise neue Gencluster, die für Abbauwege verschiedener Xenobiotika codieren, aus dem Metagenom entdeckt. Sie maßen die Expression einer Metagenom-Reportergenbibliothek nach Induktion mit einer Reihe von Abbaustoffen. Mithilfe der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) identifizierten sie als nächstes Klone, in denen die Expression induziert wird, um aus diesen dann die Produkte des aktiven Gens zu isolieren und zu charakterisieren. Man könnte Fragmente „stiller“ Biosynthese-Gencluster in einem ähnlichen Ansatz klonieren und nach niedermolekularen Effektoren suchen, die die Expression dieser Gene herbeiführen. Sobald die Induktoren der betreffenden Promotoren identifiziert sind, können sie dafür verwendet werden, die Expression der stillen Gene im natürlichen Wirt anzukurbeln. Da die Größe vieler Biosynthese-Gencluster eine vollständige Klonierung erschwert, erscheint diese Methode jedoch nicht praktikabel für die heterologe Expression ganzer Gencluster (siehe Abschnitt 2.5).

Die Erforschung der Regulationsmechanismen des Sekundärmetabolismus ist besonders zeitintensiv, wenn keine Genomsequenz verfügbar ist. Funktionale Genomprojekte sollen jedoch die Genomsequenzen einiger Naturstoffproduzenten (z.B. *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *B. subtilis*, *Sorangium cellulosum*) verfügbar machen, um die Voraussetzung für die Erforschung komplexer Regulationsmechanismen mithilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen zu schaffen. Überdies führt die Genomsequenz einer Art oft auch zur Identifizierung von regulatorischen und metabolischen Proteinen aus eng verwandten Stämmen.^[113]

2.5. Heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern

Zahlreiche PKS- und NRPS-Gencluster wurden in den vergangenen zehn Jahren kloniert, und das biochemische Wissen aus Studien mit den entsprechenden Enzymen hat zur Entstehung der „kombinatorischen Biosynthese“ geführt. Diese zielt darauf ab, neue Substanzen durch genetische Manipulation der ursprünglichen Produzenten zu gewinnen.^[114,115] Zusätzlich ermöglicht die Kenntnis der notwendigen Gencluster auch die heterologe Expression in besseren Produktionswirten, eine Technik, die eine Rolle bei der Expression biosynthetischer Stoffwechselwege aus noch nicht kultivierbaren Mikroorganismen spielen wird (siehe Abschnitt 2.2).

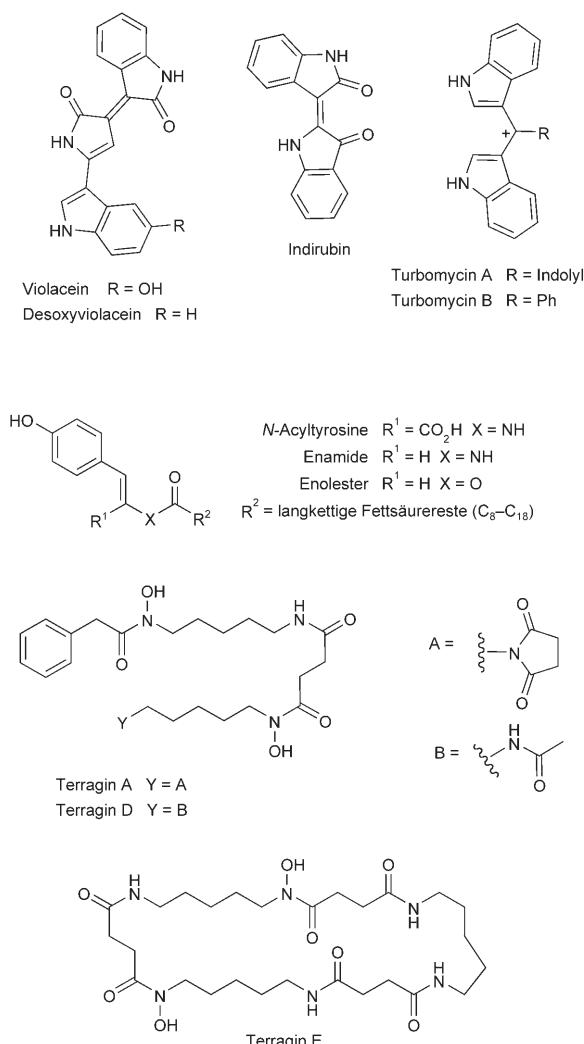
In einigen Modellstämmen (z.B. *S. coelicolor*, *B. subtilis*) ist die genetische Manipulation einfach, für viele der mikrobiellen Naturstoffproduzenten sind die genetischen Methoden jedoch ungenügend oder noch gar nicht entwickelt. Einige von ihnen wachsen sehr langsam oder sind noch nicht kultivierbar, weshalb sie sich nicht oder kaum für die genetische Modifizierung der Stoffwechselwege eignen (z.B. Myxobakterien, Cyanobakterien, mögliche bakterielle Symbionten als Produzenten von „marinen Naturstoffen“ (siehe Abschnitt 2.2)).

Diese Eigenschaften und die schnell wachsende Zahl bekannter mikrobieller Genomsequenzen steigern die Nachfrage für Techniken zur heterologen Expression kompletter Sekundärmetaboliten-Stoffwechselwege in der Naturstoff-Forschung und der Arzneimittelentwicklung. Sie bieten eine Alternative sowohl zur Produktions- und Wachstumsoptimierung als auch zur genetischen Modifizierung des natürlichen Produzenten.^[116]

Bekannte Strategien für die heterologe Expression ganzer Stoffwechselwege reichen von der gezielten Expression spezifischer Gencluster bis zur Expression großer unbekannter DNA-Fragmente (auch als Expression von Metagenomen bezeichnet; siehe Abschnitt 2.2).^[117] Um Genbibliotheken aufzubauen, die dann in unterschiedlichen Wirtsorganismen exprimiert werden können (z.B. Pseudomonaden, Streptomyces, *Escherichia coli*), wurden BAC-Shuttle-Vektoren (BAC: bacterial artificial chromosome) verwendet, die sehr große DNA-Fragmente aufnehmen.^[67,118] Dennoch wurden mit dieser Methode bisher nur Produkte relativ kleiner Biosynthese-Gencluster identifiziert, wobei der produzierende heterologe Wirt praktisch ausschließlich dem gleichen Genus wie der natürliche Produzent entstammt (Schema 5).^[118]

Eine Reihe von Berichten beschreibt demzufolge die heterologe Produktion von Substanzen aus eng verwandten Bakterien. Beispielsweise haben Marahiel und Mitarbeiter den Biosynthese-Gencluster für Bacitracin aus *Bacillus licheniformis* in *B. subtilis* exprimiert und auf diese Weise doppelt so viel Bacitracin gewonnen wie im natürlichen Produzenten.^[125] Salas und Mitarbeiter haben kürzlich durch heterologe Expression verschiedener Kombinationen von Biosynthesegenen in *Streptomyces albus* mehr als 30 Derivate der Antitumorwirkstoffs Indolocarbazol erzeugt; dabei erhielten sie Mengen, die vergleichbar mit denen des ursprünglichen Produzenten sind.^[126] Die meisten Beispiele beziehen sich auf kleine Typ-II-PKS-Systeme,^[127–132] während die heterologe Expression von großen Typ-I-PKS- und/oder NRPS-Genclustern durch Coexpression von mehreren Plasmiden erreicht wurde, die jeweils Teile des Genclusters enthielten.^[133,134] Die Expression des Epothilon-Genclusters aus *Sorangium cellulosum* in *Myxococcus xanthus*^[135] ist ein solches Beispiel. Die verwendete Methode beruhte auf mehreren aufeinander aufbauenden Klonierungsschritten, da keine autonom replizierenden Vektoren für Myxobakterien bekannt sind. Während die Ausbeute in diesem Fall bei nur 1% dessen lag, was in *S. cellulosum* produziert wird, konnte der Epothilontiter durch Optimierung des Mediums bis auf das ursprüngliche Niveau des natürlichen Produzenten angehoben werden.^[136] Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Titer für den ursprünglichen Produzenten in der Zwischenzeit ähnlich wie auch für den Soraphen-produzierenden Stamm *S. cellulosum* Soce26 durch klassische Methoden ebenfalls sehr stark erhöht wurde.^[137]

Erst vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Produktion komplexer Naturstoffe auch in nicht miteinander verwandten Bakterien gelingt. In ersten Studien diente ein genetisch veränderter *E. coli*-Wirt zur Produktion des Erythromycin-Aglycons.^[116] Analog wurden Intermediate der Biosynthese des Makrolactams Ansamycin in *E. coli* er-



Schema 5. Bisher durch Metagenom-Ansätze identifizierte Substanzen.^[119–124]

zeugt.^[138] Epothilon und auch Soraphen aus verschiedenen Myxobakterien der Gattung *Sorangium* wurden in Streptomyces produziert, wenn auch nur in sehr geringen Mengen.^[139,140] Trotz der wachsenden Erfahrung mit verschiedenen Wirten ist die Produktausbeute meistens viel geringer als im ursprünglichen Produzenten. Das kann an Schwächen des natürlichen Promotors, einem zu geringen Expressionsniveau der korrekt gefalteten Proteine,^[141] Schwierigkeiten mit der posttranslationalen Aktivierung der Carrier-Proteine,^[142] Unterschieden in der mRNA-Stabilität oder an der Versorgung mit Biosynthesevorstufen liegen, um nur einige der möglichen Schwierigkeiten zu nennen. Zahlreiche aktuelle Studien versuchen, diese Probleme zu lösen, unter anderem durch die Anwendung neuer Klonierungstechniken und vielfältiger heterologer Wirs.

In allen oben genannten Studien wurden zeitintensive klassische Klonierungsverfahren verwendet, und die Expression von großen Genclustern wurde nur durch Coexpression verschiedener genetischer Einheiten erreicht. Unlängst waren mehrere Gruppen mit der Methode des „Recombinogenic Engineering“^[143] in *E. coli* beim Klonieren und Manipulieren

großer Biosynthesesysteme erfolgreich. Diese Technik ist besonders für große DNA-Moleküle wie BACs und Cosmide geeignet, da sie nicht auf den klassischen Klonierungsverfahren wie der Anwendung von Restriktionsenzymen aufbaut. Nach der Überexprimierung von Proteinen (Red/ET), welche die effiziente homologe Rekombination in *E. coli* erleichtert, können die Gencluster ausgehend von kurzen homologen Bereichen verändert und optimiert werden.

Forscher bei Cubist haben so den Biosynthese-Gencluster für Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* in *E. coli* modifiziert und anschließend in einer Daptomycin-negativen Mutante von *S. roseosporus* exprimiert, um neue, aktiver Lipopeptide zu produzieren.^[144] Dabei wurde ein eng verwandter (im Beispiel sogar der gleiche) Expressionswirt verwendet, was bei gut charakterisierten Wirs durchaus sinnvoll ist. Diese Voraussetzung ist jedoch selten erfüllt, und daher gilt die effiziente heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern mikrobieller Produzenten noch immer als eine Herausforderung. In einem neueren Beispiel wurde ebenfalls „Recombinogenic Engineering“^[143] verwendet, um den kompletten PKS/NRPS-Gencluster für die Produktion von Myxochromid S in einer genetischen Einheit aufzubauen und die nötigen Elemente für die Konjugation, die stabile Integration und die regulierte Expression im heterologen Wirt *Pseudomonas putida* einzuführen.^[97]

Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist, dass der gesamte Gencluster auf einem Konstrukt vorliegt, das dann in *E. coli* präzise manipuliert werden kann, bevor es in einen heterologen Wirtsstamm transferiert wird. Überraschenderweise ist die Kultivierungszeit bei der Produktion von Myxochromid S in *P. putida* um das Dreifache reduziert, während die Produktausbeute fünfmal höher ist als im natürlichen Produzenten *S. aurantiaca*. *P. putida* kann also alle benötigten Vorstufen für die Myxochromid-S-Biosynthese (Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Propionyl-CoA) herstellen und exprimiert eine für die Carrier-Protein-Aktivierung nötige Phosphopantethein-Transferase mit der notwendigen geringen Substratspezifität.^[145] Da die genetische Manipulation in *P. putida* einfach ist, sollte es auch möglich sein, den Stamm so zu verändern, dass er weitere essenzielle Vorstufen für die Biosynthese anderer Naturstoffe produzieren kann (z.B. ungewöhnliche Verlängerungseinheiten und Aminosäuren). Diese Strategie verbindet modernste Klonierungstechniken und Mutagenese in *E. coli* mit Pseudomonaden als heterologen Wirs und bietet somit eine Alternative für die Analyse und Mutagenese von bekannten wie unbekannten Genclustern.

Eine weitere Alternative geht von der chemischen DNA-Synthese ganzer Genclustern aus. Der entscheidende Schritt hierbei ist die effiziente und fehlerfreie Synthese langer DNA-Sequenzen. Im Anschluss an die Synthese von etwa 5kb-DNA-Segmenten, die dann durch konventionelle Klonierungstechniken zu längeren Sequenzen zusammengefügt wurden, wurde ein synthetischer PKS-Gencluster konstruiert, der seine Funktionsfähigkeit durch die Produktion der entsprechenden Enzyme und des Polyketidprodukts in *Escherichia coli* eindrucksvoll unter Beweis stellte.^[146]

An dieser Stelle soll betont werden, dass es keine allgemeine Lösung für die vielfältigen Probleme der hetero-

logen Expression geben wird. Eng miteinander verwandte und gut etablierte Produktionswirte, die genetisch manipulierbar sind, können als Organismen erster Wahl betrachtet werden. Da diese oft nicht verfügbar sind, sollten viele Produktionswirte weiterentwickelt werden, um eine Reihe an möglichen Expressionstechnologien bereitzustellen, deren Stärken und Schwächen durch weitere Studien geklärt werden können.

2.6. Kombinatorische Biosynthese

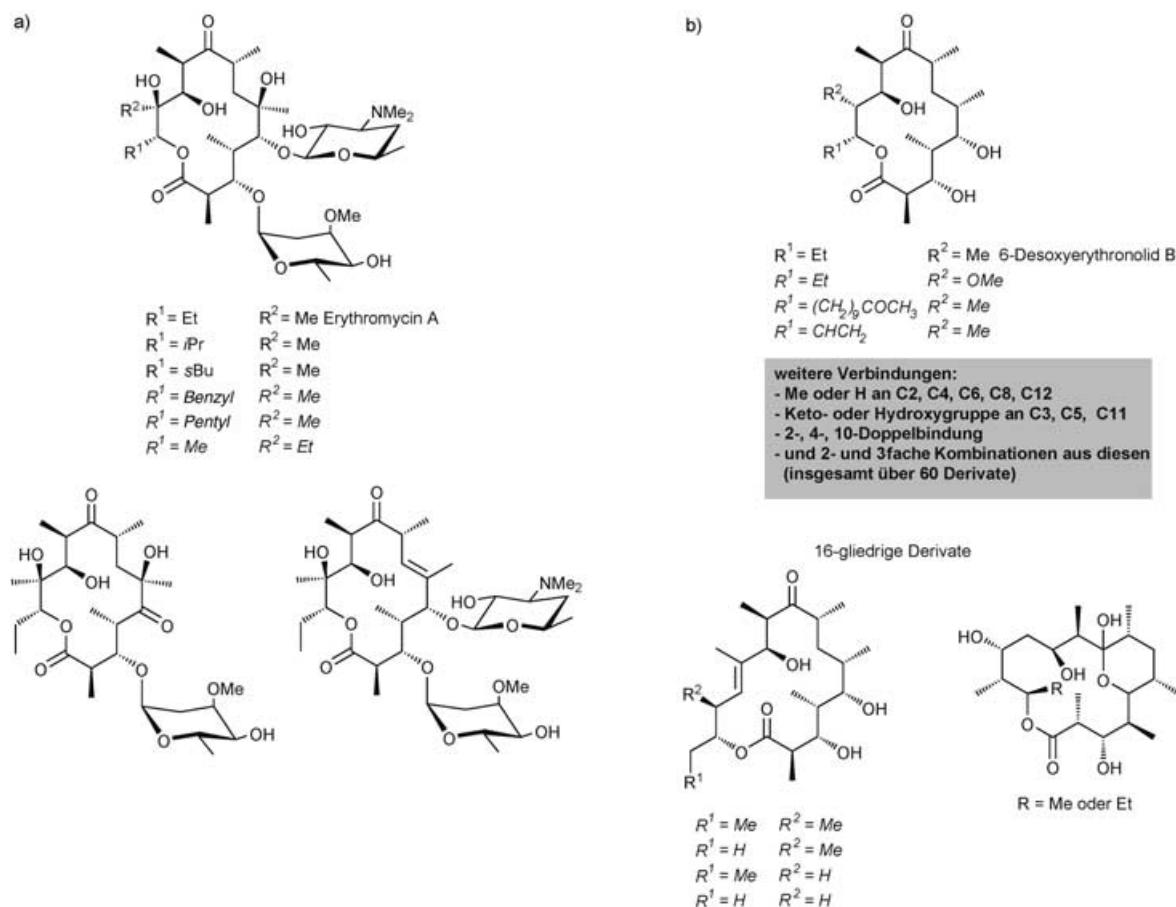
2.6.1. Genetische Manipulation des natürlichen Produzenten

Die Modularität und Vielfältigkeit von PKS und NRPS und auch die Chancen der kombinatorischen Biosynthese sind in ausgezeichneten Übersichten dargelegt worden (Schema 6).^[24,147–153] Um das zunehmende Wissen zur genetischen Konstruktion und zur Produktion neuer Substanzen mit veränderten Strukturen zu illustrieren, werden wir hier einige aktuelle Studien vorstellen. Weitere Beispiele zu kombinatorischen Biosynthesemethoden finden sich in Abschnitt 2.5 (heterologe Expressionstechniken).

Die Gruppen um Leadlay und Staunton führten ihre wegweisende Arbeit in der PKS-Forschung fort, indem sie die Spezifität der Ladeeinheit in der Erythromycin-PKS und den

dadurch produzierten veränderten Polyketiden manipulierten.^[154] Anhand des gleichen Biosynthesystems zeigten sie, dass nach der Einführung eines zusätzlichen Moduls in die PKS auch ein verlängertes Polyketid erzeugt werden kann.^[155] Ebenso konnten Ivermectin-ähnliche Naturstoffe nach einem Domänenaustrausch in der Avermectin-PKS von *S. avermitilis* produziert werden, wenn auch in einer geringeren Ausbeute.^[156] In einem weiteren Beispiel untersuchten sie die Lademodäne der Soraphen-PKS, von der vermutet wurde, dass sie Benzoyl-CoA auf die Megasynthase von *S. cellulosum* überträgt.^[157] Um die Hypothese zu beweisen, wurde mit dieser Domäne ein DEBS1-TE-Hybrid erzeugt (Fusionieren der Thioesterase-Domäne von DEBS3 an DEBS1 und Austausch des Erythromycin-Lademoduls gegen das für Soraphen), was in der Produktion eines 5-Phenyltriketidlacons mit einer Ausbeute von etwa 1 % des regulären DEBS1-TE-Triketids resultierte.^[158] Ausgehend von diesen Arbeiten konnten inzwischen auch weitere phenylsubstituierte Polyketide hergestellt werden.^[159]

Forscher von Kosan Biosciences und der Stanford University haben gleichermaßen beeindruckende Erfolge bei der Manipulation von PKS vorzuweisen.^[160,161] Es gelang ihnen, die Erthromycinsynthase codierenden Gene in *Saccharopolyspora erythraea* so zu ergänzen, dass das potente Antiparazitikum Megalomicin in besserer Ausbeute gebildet wurde als



Schema 6. Ausgewählte Variationen von Erythromycin (a) und dem Aglycon 6-Desoxyerythronolid B (b), die durch kombinatorische Biosynthese und Mutagenese (kursiv) erhalten wurden. Insgesamt wurden mehr als 100 Derivate auf diese Weise erzeugt.

im natürlichen Produzenten.^[162] Des Weiteren führten sie Studien zur Substratspezifität der PKS-Module durch, indem sie Chimären multimodularer Synthasen konstruierten.^[163] Durch die Veränderung der Epothilon-Megasynthetase (wenn auch nicht im natürlichen Produzenten, siehe oben) konnten Katz und Mitarbeiter ein neues Epothilon-Derivat in guter Ausbeute produzieren.^[164] Darüber hinaus ermöglichte die kombinatorische Biosynthese von Pikromycin-verwandten Makroliden in *Streptomyces venezuelae*^[165] die Bildung zahlreicher neuer bioaktiver Makrolide.^[166]

Die kombinatorische Biosynthese mithilfe von Typ-II-PKSs ist das zentrale Forschungsthema einiger Arbeitsgruppen.^[114,115,131,167] Chromomycin-Analoga mit unterschiedlichen Methylierungs-, Acylierungs- und Glycosylierungsmustern wurden unlängst durch die Manipulation entsprechender Post-PKS-Gene erzeugt.^[168,169] Weitere Beispiele für die In-vitro- und In-vivo-Konstruktion modifizierter Sekundärstoffe unter Verwendung von Post-PKS-Enzymen entstammen der Charakterisierung von Glycosyltransferasen (siehe Abschnitt 2.6.2).^[170,171] Wahrscheinlich wird die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Naturstoffbiosynthesen bald zur rationalen Konstruktion ganzer Gencluster inklusive der Post-PKS/NRPS-Schritte führen.

Den bisher in diesem Kapitel angeführten Beispielen, die sämtlich erfolgreich waren, stehen weit mehr unveröffentlichte Ansätze gegenüber, in denen die gewünschten Ergebnisse ausblieben. Ein Beispiel, in dem der Versuch einer genetischen Manipulation nicht zur Bildung veränderter Produkte führte, beschäftigt sich mit der Biosynthese von Myxothiazol in *S. aurantiaca*. Obwohl nur relativ einfache genetische Manipulationen vorgenommen wurden, konnten weder Zwischenprodukte, noch die erwarteten Derivate der Biosynthese beobachtet werden, ganz gleich welcher Teil des Genclusters modifiziert wurde.^[172]

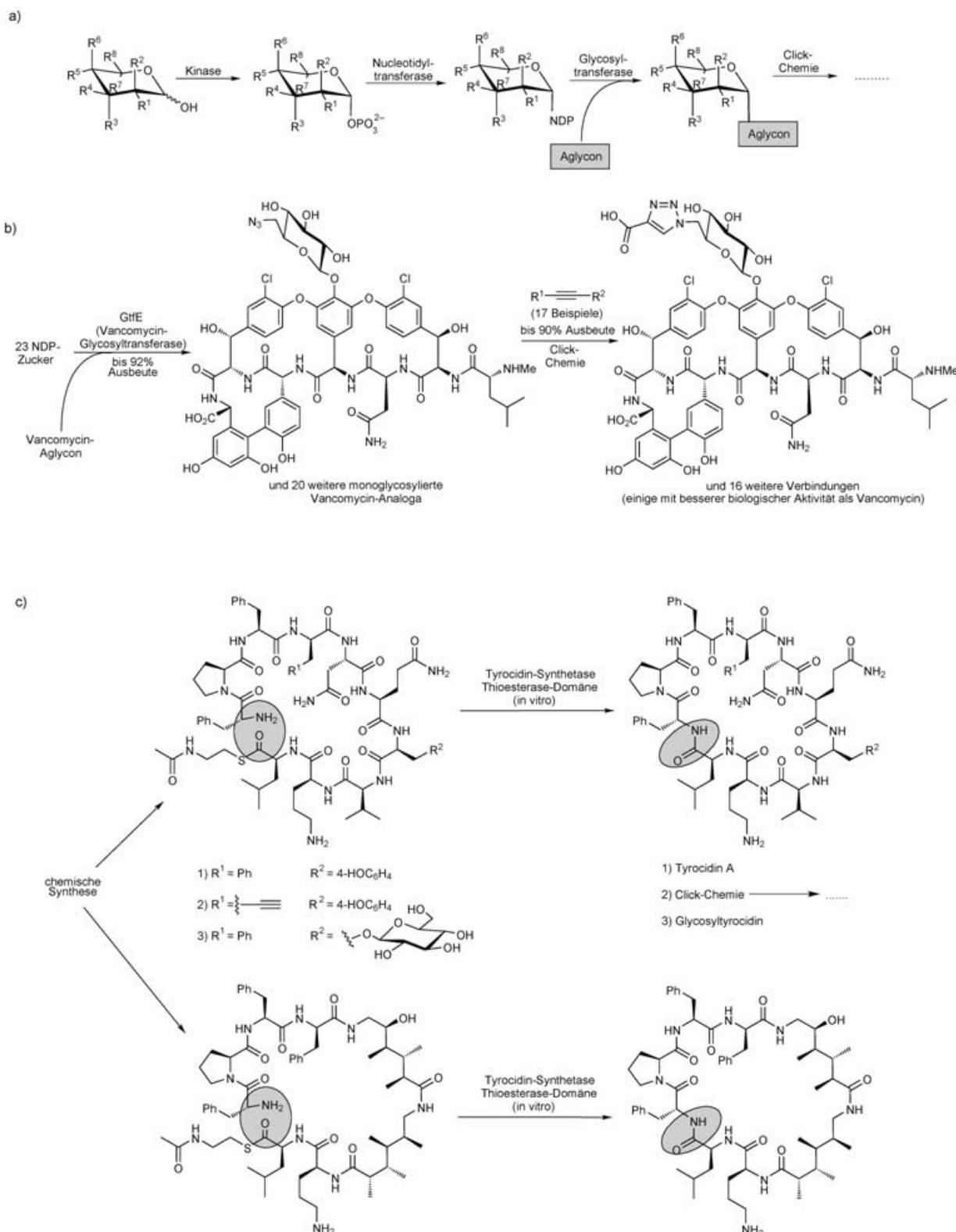
2.6.2. In-vitro-Studien mit einzelnen Biosyntheseenzymen

Bei der Suche nach neuen Naturstoff-Genclustern identifizierte Biosynthesegene werden oft für die Expression von katalytischen Modulen und Domänen in In-vitro-Studien genutzt. Diese rekombinanten Proteine halfen anfangs bei der Entschlüsselung grundlegender biochemischer Prozesse,^[28,173,174] und sogar komplett Naturstoffbiosynthesen wurden in vitro rekonstituiert.^[90,175,176] Kombinatorische In-vitro-Biosynthesetechniken basieren hauptsächlich auf der genetischen Manipulation in *E. coli*, da diese viel schneller ist als die Manipulation der meisten (wahrscheinlich aller) typischen Naturstoffproduzenten. Folglich liegen die meisten funktional-biochemischen und kombinatorischen Studien zu Proteinen vor, die aktiv in *E. coli* exprimiert werden konnten. Wegweisende Arbeiten der Gruppen von Marahiel und Walsh haben gezeigt, dass rekombinante NRPS- und PKS-Proteine konstruiert werden können, die neue, veränderte Produkte herstellen.^[30,174,177] Durch kombinatorische Biosynthese gelang auch die Produktion kommerziell nützlicher Substanzen: So wurde eine rekombinante NRPS erzeugt, die α -L-Aspartyl-L-phenylalanin, die Vorstufe des künstlichen Süßstoffs Aspartam, in vitro synthetisiert.^[178] Intermediate der Epothilon-^[179] und der Rifamycin-Biosynthese^[180,181] mit

nichtnatürlichen Startereinheiten wurden mithilfe von aufgereinigten Proteinen aus den entsprechenden Genclustern hergestellt. In einer anderen Studie ermöglichte die Modifizierung des Acyl-Carrier-Proteins mit alternativen Startereinheiten die Biosynthese von neuen Polyketiden mit 16 (statt 14) Kohlenstoffatomen unter Verwendung der Actinorhodin-Typ-II-PKS.^[182] Vor kurzem wurde in In-vitro-Studien gezeigt, dass auch die iterativen und relativ kleinen Typ-III-PKSs eine Alternative bieten, um chemische Vielfalt unter Verwendung aufgereinigter bakterieller Enzyme zu erzeugen.^[27,183] Diese „pflanzenähnlichen PKSs“ wurden zuerst von der Horinouchi-Gruppe beschrieben. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme in Bakterien relativ weit verbreitet sind^[23,184–186] und dass sie vielseitige Systeme zur Erzeugung neuer Substanzen darstellen.^[187–190] Bis zu 14 Derivate verschiedener Strukturklassen (Pyrone und Phenole mit unterschiedlich langen Seitenketten) wurden in vitro durch RppA-katalysierte Verlängerung von fünf verschiedenen Startereinheiten mit Malonyl-CoA hergestellt (Rppa = redbrown pigment production enzyme A).^[187] Typ-III-PKSs sind außerdem am Aufbau von Glycopeptid-Vorstufen durch NRPS beteiligt; entsprechende Enzyme im Balhimycin- und im Vancomycin-Gencluster sind Synthasen von 3,5-Dihydroxyphenyllessigsäure. Diese Verbindung dient ihrerseits als Vorstufe für die ungewöhnliche Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin, die Teil des Glycopeptid-Rückgrats ist.^[191,192]

Kürzlich wurden Proteine oder einzelne katalytische Domänen in chemoenzymatischen Synthesen verwendet. Die für die Produktion von makrocyclischen Substanzen zuständigen PKS und NRPS benötigen für die enzymatische Cyclisierung einer linearen Vorstufe häufig eine C-terminale Thioesterase(TE)-Domäne.^[193] Wash und Mitarbeiter konnten zeigen, dass isolierte TE-Domänen ihre autonome Fähigkeit zur Makrocyclisierung linearer Peptidthioester mit nativen Peptidsequenzen behalten. Zusätzlich cyclisieren sie Peptidanaloge mit veränderter Peptidsequenz und Peptid-Polyketid-Hybride mit größerer Kettenlänge.^[194] Daher könnte die TE-Katalyse für die Erzeugung von Bibliotheken makrocyclischer Peptide interessant sein.^[195] Isolierte TE-Domänen katalysieren außerdem die Cyclisierung immobilisierter Peptide und schließen so eine Lücke zwischen Naturstoffbiochemie und kombinatorischer Synthese an der Festphase.^[196] Darauf hinaus konnten sogar glycosyierte Peptide in guten Ausbeuten cyclisiert werden.^[197]

Glycosyltransferasen sind oft an der Post-PKS-Modifizierung von Produkten beteiligt, die auf die Wirkung von PKS und NRPS zurückgehen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Glycosylierung von Naturstoff-Aglyca, die häufig für die biologische Aktivität erforderlich ist. Glycosyltransferasen verwenden aktivierte Zucker und können derart genetisch verändert werden, dass sie eine Vielzahl von Substraten glycosylieren. Thorson und Mitarbeiter entwickelten diese Methode, Bibliotheken glycosylierter Naturstoffe zu erzeugen, und bezeichneten sie als „Glycorandomisierung“ (Schema 7).^[198,199] Die weitere Aufklärung der molekularen Vorgänge bei der Desoxyhexose- und Aminozuckerbiosynthese wird auch neue Zucker oder solche, deren chemische Synthese schwierig ist, für entsprechende Anwendungen zugänglich machen.^[200,201]



Schema 7. In-vitro-Derivatisierung und Synthese von Naturstoffen. a) Allgemeiner Ablauf der Glycorandomisierung.^[198] b) Glycorandomisierung am Beispiel von Vancomycin.^[202] c) Bildung von Tyrocidin-Analoga unter Verwendung einer Kombination aus chemischer Synthese und Thioesterase-katalysierter Cyclisierung.^[194,197,203]

Generell kann man erwarten, dass jegliche Art von Post-PKS- oder Post-NRPS-Enzym (z.B. Glycosyltransferasen, Methyltransferasen, Hydrolasen, P450-abhängige Enzyme,

prenylierende Enzyme) in Zukunft für ähnliche In-vitro-Studien genutzt werden kann. So wie die Genomsequenzierung die genetische Grundlage der biochemischen Vielfalt in

Mikroorganismen zusehends enthüllt, harren die dabei entdeckten Biosynthesegene ihrer Nutzung in kombinatorischen Ansätzen.

2.7. Mutasynthese

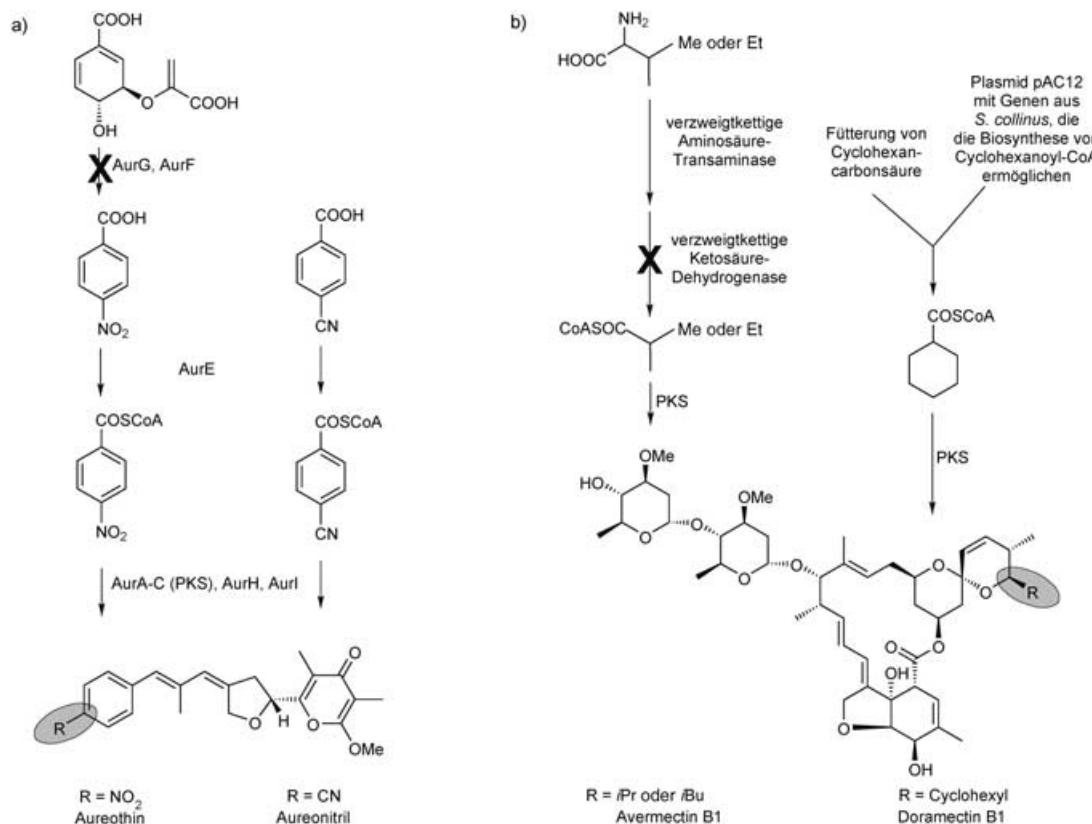
Die vielfältigen Möglichkeiten der Kombination molekulärbiologischer Techniken mit „altmodischer“ Mutasynthese^[204] wurden kürzlich ausgezeichnet dargelegt.^[205,206] Wir werden daher nur einige neuere Beispiele vorstellen, die das Potenzial dieses Ansatzes illustrieren.

Die „Vorstufen-dirigierte Biosynthese“ wurde vielfach angewendet, um Polyketid- und nichtribosomale Peptidbiosynthesen aufzuklären und um neue Derivate zu erzeugen. Dabei wurden die Vorstufen in der Regel als *N*-Acetylcysteamin(NAC)-Thioester aktiviert, da so die an Carrier-Proteine gebundenen Biosynthese-Intermediate imitiert werden können.^[207–212] In Mutasynthese-Experimenten kann die Effizienz des Einbaus modifizierter Intermediate oder Vorstufen nach Fütterung an eine Kultur deutlich erhöht werden, wenn die Biosynthese der natürlichen Vorstufe durch Mutationen blockiert ist. Hertweck und Mitarbeiter erhielten mit dieser Methode das neue Cytostatikum Aureonitril. Sie fütterten *p*-Cyanbenzoyl-NAC als nichtnatürlichen Starter der Aureothin-Biosynthese an eine Mutante, die den natürlichen Starter *p*-Nitrobenzoyl-CoA nicht mehr herstellen konnte.^[213] Sie zeigten außerdem, dass die Zugabe von *p*-Cyanbenzoat für die Produktion von Aureonitril ausreichend

ist, da vermutlich die endogene *p*-Nitrobenzoat-CoA-Ligase beide Vorstufen aktivieren kann (Schema 8).

Die Biosynthese einer großen Auswahl entsprechender PKS-Startereinheiten in Bakterien wurde in einer Übersicht von Hertweck und Moore besprochen.^[215] Ein Meilenstein in der praktischen Anwendung eines Ansatzes mit Mutasynthese und kombinatorischer Biosynthese ist die Produktion des modifizierten Naturstoffs Doramectin. Dieses biologisch aktiveren Derivat unterscheidet sich von dem anthelmintisch wirkenden Typ-I-Polyketid Avermectin in der Startereinheit.^[216]

Die Avermectin-Biosynthese beginnt gewöhnlich mit Thioestern kurzkettiger verzweigter Carbonsäuren, die aus dem Abbau der verzweigkettigen Aminosäuren stammen; sobald dieser Abbauweg inaktiviert ist, kommt die Avermectin-Biosynthese zum Stillstand. Der Mangel an Vorstufen kann jedoch durch die Zugabe von Cyclohexancarbonsäure (oder ähnlichen Carbonsäuren) überwunden werden, was zur Produktion von Doramectin führt. Nachdem ein Stoffwechselweg für die Biosynthese von Cyclohexancarbonsäure-CoA in *Streptomyces collinus* identifiziert worden war,^[217] übertrugen Reynolds und Mitarbeiter diese Gene in eine *S.-avermitilis*-Mutante, die keine natürlichen Startereinheiten mehr bilden kann. Die Analyse des so erzeugten neuen Stammes zeigte die direkte Produktion von Doramectin in vergleichbarer Ausbeute wie nach Zugabe von Cyclohexancarbonsäure zur ersten Mutante.^[214] Dieses Experiment ist somit eher ein Beispiel für das Design eines Stoffwechselweges als für Mutasynthese, da die benötigte Vorstufe im Bakterium selbst erzeugt wird und nicht zugegeben werden muss.



Schema 8. Bildung von Aureonitril durch Mutasynthese (a) und Doramectin durch Konstruktion eines neuen Stoffwechselweges (b).^[213,214]

Eine Kombination von Mutasynthese und chemoenzymatischen Methoden lieferte auch neue Rapamycine^[218] und Aminocumarine.^[219,220] Neue Glycopeptide wurden durch die Verwendung entsprechender Halogenasen erzeugt.^[221]

Das Potenzial der Mutasynthese kann analog den in Abschnitt 2.6.2 geschilderten Arbeiten durch Studien mit rekombinanten Biosyntheseenzyme vor dem eigentlichen Experiment abgeschätzt werden. Walsh und Mitarbeiter zeigten *in vitro*, dass die ersten Module der Epothilon-Synthetase alternative Startereinheiten und Substrate verwenden können, und erzeugten so neuartige Intermediate der Epothilon-Biosynthese.^[179,222] Ob diese Experimente auch zur Produktion neuer Epothilone *in vivo* führen, bleibt allerdings abzuwarten.

Diese Beispiele machen deutlich, dass die beschriebenen Techniken zur Variation von Strukturen nicht klar gegeneinander abgegrenzt sind. Viele gebräuchliche Phrasen wie „kombinatorische Biosynthese“ und „Mutasynthese“ sind nicht genau definiert, und die so bezeichneten Verfahren können als verschiedene Formen der Optimierung eines Stoffwechselweges angesehen werden. Die Stärke der experimentellen Ansätze liegt hier insbesondere in der Kombination einzelner Methoden.

3. Die Aussichten sind glänzend! Naturstoffforschung in der Post-Genom-Ära

Die zunehmende Verfügbarkeit von Genomdaten sowie Biosynthese- und Regulationsstudien trägt zur Entschlüsselung der Naturstoffsynthese auf molekularer Ebene bei, die eine unabdingbare Voraussetzung für die rationale Konstruktion eines Stoffwechselweges ist. Einige der in diesem Aufsatz vorgestellten Techniken haben bereits zur Produktion von neuen Substanzen geführt, zahlreiche Manipulationen der Biosynthese erwiesen sich jedoch als ineffektiv oder lieferten nur geringe Produktausbeuten, sodass weitere biochemische Studien notwendig sind. Das rasant wachsende Wissen um die Genomsequenzen, neue Kultivierungsmethoden, Metagenomansätze und die Fortschritte der heterologen Expression und Molekularbiologie lassen die Zukunft der Naturstoff-Forschung verheißungsvoll erscheinen. Die schnelle Weiterentwicklung auf allen Gebieten der Stoffwechseloptimierung eröffnet Möglichkeiten, vielversprechende Naturstoffe *in vivo* und *in vitro* zu verändern und so zu verbesserten Derivaten zu gelangen. Bedenkt man die komplexen Strukturen der Naturstoffe, so kann dieser Ansatz zu einem Eckpfeiler der pharmazeutischen Leitstrukturentwicklung werden.

Die Forschungsarbeiten im Labor der Autoren wurden durch die DFG und das BMBF gefördert. Die Autoren danken Mark Zabriskie, Barrie Wilkinson, Christian Hertweck und einem namentlich unbekannten Gutachter für hilfreiche Kommentare zu diesem Manuskript.

Eingegangen am 25. März 2005

- [1] D. Newman, G. Cragg, K. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022.
- [2] G. D. Wright, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R127.
- [3] R. P. Wenzel, *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 523.
- [4] C. J. Thomson, E. Power, H. Ruebsamen-Waigmann, H. Labischinski, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 445.
- [5] R. Nelson, *Lancet* **2003**, *362*, 1726.
- [6] T. Clarke, *Nature* **2003**, *425*, 225.
- [7] T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *111*, 688; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643.
- [8] M. L. Lee, G. Schneider, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 284.
- [9] M. Feher, J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218.
- [10] J. Y. Ortholand, A. Ganesan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 271.
- [11] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, *432*, 824.
- [12] C. Lipinski, A. Hopkins, *Nature* **2004**, *432*, 855.
- [13] R. D. Firn, C. G. Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 382.
- [14] J. Niggemann, K. Michaelis, R. Frank, N. Zander, G. Höfle, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 2490.
- [15] U. Abel, C. Koch, M. Speitling, F. G. Hansske, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 453.
- [16] A. M. Boldi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 281.
- [17] A. Ganesan, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 584.
- [18] A. R. Knaggs, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119.
- [19] A. R. Knaggs, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 334.
- [20] P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181.
- [21] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
- [22] B. Shen, *Top. Curr. Chem.* **2000**, *209*, 1.
- [23] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79.
- [24] C. T. Walsh, *Science* **2004**, *303*, 1805.
- [25] D. Cane, C. Walsh, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R319.
- [26] B. Shen in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 209 (Hrsg.: A. de Meijere, K. Houk, H. Kessler, J.-M. Lehn, S. V. Ley, S. L. Schreiber, J. Thiem), Springer, Berlin, **2000**, S. 1.
- [27] N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *Nature* **1999**, *400*, 897.
- [28] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275.
- [29] H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6843.
- [30] H. D. Mootz, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5848.
- [31] R. D. Fleischmann et al., *Science* **1995**, *269*, 496.
- [32] <http://www.genomesonline.org> und www.tigr.org.
- [33] W. C. Nierman, C. M. Fraser, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 62.
- [34] H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, S. Omura, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 526.
- [35] S. D. Bentley et al., *Nature* **2002**, *417*, 141.
- [36] C. R. Buell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10181.
- [37] R. Croteau, T. Kutchan, N. Lewis in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Hrsg.: B. Buchanan, W. Grussem, R. Jones), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, **2000**, S. 1250.
- [38] S. Jennewein, R. Croteau, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 13.
- [39] E. Leistner, *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 98.
- [40] S. Jennewein, M. R. Wildung, M. Chau, K. Walker, R. Croteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9149.
- [41] M. Chau, S. Jennewein, K. Walker, R. Croteau, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 663.
- [42] K. Walker, R. Croteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13591.
- [43] K. D. Walker, K. Klettke, T. Akiyama, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53947.
- [44] P. I. Lerner, *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 524.
- [45] G. Testa, G. B. Klintmalm, *Clin. Liver Dis.* **1997**, *1*, 417.

- [46] J. A. Tobert, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 517.
- [47] A. Goffeau et al., *Nature* **1997**, 387, 5.
- [48] V. Wood et al., *Nature* **2002**, 415, 871.
- [49] J. E. Galagan et al., *Nature* **2003**, 422, 859.
- [50] D. Martinez et al., *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 695.
- [51] B. Dujon et al., *Nature* **2004**, 430, 35.
- [52] F. Barona-Gomez, U. Wong, A. E. Giannakopoulos, P. J. Derrick, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16282.
- [53] S. Lautru, R. J. Deeth, L. M. Bailey, G. L. Challis, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 1, 265.
- [54] K. T. Konstantinidis, J. M. Tiedje, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 3160.
- [55] A. T. Bull, A. C. Ward, M. Goodfellow, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 573.
- [56] H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, 3, 619.
- [57] J. Fuchs, A. Zeeck, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 87.
- [58] H. B. Bode, M. Walker, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3185.
- [59] G. Chen, G. Y. Wang, X. Li, B. Waters, J. Davies, *J. Antibiot.* **2000**, 53, 1145.
- [60] K. Ueda, S. Kawai, H. Ogawa, A. Kiyama, T. Kubota, H. Kawanobe, T. Beppu, *J. Antibiot.* **2000**, 53, 979.
- [61] N. R. Pace, *Science* **1997**, 276, 734.
- [62] M. Keller, K. Zengler, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 141.
- [63] K. Zengler, G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, M. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 15681.
- [64] T. Kaeberlein, K. Lewis, S. S. Epstein, *Science* **2002**, 296, 1127.
- [65] K. E. Davis, S. J. Joseph, P. H. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 826.
- [66] W. R. Streit, R. A. Schmitz, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, 7, 492.
- [67] R. Daniel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 199.
- [68] W. R. Streit, R. Daniel, K. E. Jaeger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 285.
- [69] J. C. Venter et al., *Science* **2004**, 304, 66.
- [70] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1216.
- [71] J. Piel, D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzer, N. Fusetti, S. Matsunaga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 16222.
- [72] M. Hildebrand, L. E. Waggoner, H. Liu, S. Sudek, S. Allen, C. Anderson, D. H. Sherman, M. Haygood, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1543.
- [73] T. Arai, K. Takahashi, A. Kubo, S. Nakahara, S. Sato, K. Aiba, C. Tamura, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 2355.
- [74] H. Y. He, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5822.
- [75] T. M. Zabriskie, J. A. Klocke, C. M. Ireland, A. H. Marcus, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, C. Xu, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3123.
- [76] B. Kunze, R. Jansen, F. Sasse, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1262.
- [77] K. Suzumura, I. Takahashi, H. Matsumoto, K. Nagai, B. Setiawan, R. M. Rantiatmodjo, K. Suzuki, N. Nagano, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7573.
- [78] S. K. Davidson, S. W. Allen, G. E. Lim, C. M. Anderson, M. G. Haygood, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 4531.
- [79] J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14002.
- [80] E. Zazopoulos et al., *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 187.
- [81] B. Silakowski, B. Kunze, R. Müller, *Gene* **2001**, 275, 233.
- [82] B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 6476.
- [83] S. C. Wenzel, B. Kunze, G. Höfle, B. Silakowski, M. Scharfe, H. Blöcker, R. Müller, *ChemBioChem* **2005**, 6, 375.
- [84] B. Kunze, H. Reichenbach, R. Müller, G. Höfle, *J. Antibiot.* **2005**, 58, 244.
- [85] C. T. Walsh in *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM, Washington, DC, **2003**, S. 175.
- [86] G. Yadav, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 335.
- [87] G. Yadav, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3654.
- [88] G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 211.
- [89] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 493.
- [90] N. Gaitatzis, B. Kunze, R. Müller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11136.
- [91] J. J. May, T. M. Wendrich, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7209.
- [92] G. L. Challis, J. Ravel, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 187, 111.
- [93] B. Shen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 285.
- [94] R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 4.
- [95] I. Thomas, C. J. Martin, C. J. Wilkinson, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 781.
- [96] S. J. Moss, C. J. Martin, B. Wilkinson, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 575.
- [97] S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fu, F. A. Stewart, R. Müller, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 349.
- [98] D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. von Döhren, T. Börner, B. A. Neilan, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 753.
- [99] A. Sandmann, F. Sasse, R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1071.
- [100] T. W. Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 7968.
- [101] J. Piel, G. P. Wen, M. Platzer, D. Q. Hui, *ChemBioChem* **2004**, 5, 93.
- [102] A. K. El-Sayed, J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 419.
- [103] M. Kopp, H. Irschik, S. Pradella, R. Müller, *ChemBioChem* **2005**, 1277.
- [104] J. J. Harrington et al., *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 440.
- [105] M. Metsa-Ketela, K. Ylihonko, P. Mantsala, *J. Antibiot.* **2004**, 57, 502.
- [106] U. A. Ochsner, P. J. Wilderman, A. I. Vasil, M. L. Vasil, *Mol. Microbiol.* **2002**, 45, 1277.
- [107] Y. Ohnishi, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **2003**, 77, 852.
- [108] S. Okamoto, A. Lezhava, T. Hosaka, Y. Okamoto-Hosoya, K. Ochi, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 601.
- [109] D. J. Kim, J. H. Huh, Y. Y. Yang, C. M. Kang, I. H. Lee, C. G. Hyun, S. K. Hong, J. W. Suh, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 592.
- [110] E. Takano, R. Chakraburty, T. Nihira, Y. Yamada, M. J. Bibb, *Mol. Microbiol.* **2001**, 41, 1015.
- [111] E. B. Goh, G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M. G. Surette, J. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 17025.
- [112] T. Uchiyama, T. Abe, T. Ikemura, K. Watanabe, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 88.
- [113] A. M. Lum, J. Huang, C. R. Hutchinson, C. M. Kao, *Metab. Eng.* **2004**, 6, 186.
- [114] C. Hutchinson in *Drug Discovery from Nature* (Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Berlin, **1999**, S. 233.
- [115] C. Mendez, J. A. Salas, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2003**, 6, 513.
- [116] B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **2001**, 291, 1790.
- [117] J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R245.
- [118] A. Martinez, S. J. Kolvek, C. L. T. Yip, J. Hopke, K. A. Brown, I. A. MacNeil, M. S. Osburne, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 2452.
- [119] D. E. Gillespie, S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, J. Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 4301.
- [120] S. F. Brady, C. J. Chao, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9968.
- [121] S. F. Brady, C. J. Chao, J. Handelsman, J. Clardy, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1981.
- [122] S. F. Brady, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12903.
- [123] G. Y. Wang et al., *Org. Lett.* **2000**, 2, 2401.

- [124] M. S. Osburne, T. H. Grossman, P. R. August, I. A. MacNeil, *ASM News* **2000**, 66, 411.
- [125] K. Eppelmann, S. Doekel, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34824.
- [126] C. Sanchez, L. Zhu, A. F. Brana, A. P. Salas, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 461.
- [127] A. Bechthold, J. K. Sohng, T. M. Smith, X. Chu, H. G. Floss, *Mol. Gen. Genet.* **1995**, 248, 610.
- [128] C. Y. Kim, H. J. Park, E. S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 13, 819.
- [129] S. T. Hong, J. R. Carney, S. J. Gould, *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 470.
- [130] U. von Mulert, A. Luzhetskyy, C. Hofmann, A. Mayer, A. Bechthold, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 230, 91.
- [131] K. Ichinose, M. Ozawa, K. Itou, K. Kunieda, Y. Ebizuka, *Microbiology (Reading, U.K.)* **2003**, 149, 1633.
- [132] J. A. Kalaitzis, B. S. Moore, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1419.
- [133] C. M. Kao, L. Katz, C. Khosla, *Science* **1994**, 265, 509.
- [134] C. Hertweck, *ChemBioChem* **2000**, 1, 103.
- [135] B. Julien, S. Shah, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2772.
- [136] J. Lau, S. Frykman, R. Regentin, S. Ou, H. Tsuruta, P. Licari, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 78, 280.
- [137] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, 106, 233.
- [138] K. Watanabe, M. A. Rude, C. T. Walsh, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9774.
- [139] L. Tang, S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, B. Julien, *Science* **2000**, 287, 640.
- [140] R. Zirkle, J. M. Ligon, I. Molnar, *Microbiology (Reading, U.K.)* **2004**, 150, 2761.
- [141] S. Murli, M. Piagentini, R. McDaniel, C. R. Hutchinson, *Biochemistry* **2004**, 43, 15884.
- [142] C. T. Walsh, A. M. Gehring, P. H. Weinreb, L. E. Quadri, R. S. Flugel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 309.
- [143] J. Muylers, Y. Zhang, G. Testa, A. Stewart, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 1555.
- [144] D. Ritz et al. in *BMP Conference*, Society for Industrial Microbiology, San Diego, **2004**, S. 38.
- [145] F. Gross, D. Gottschalk, R. Müller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 66.
- [146] S. J. Kodumal, K. G. Patel, R. Reid, H. G. Menzella, M. Welch, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15573.
- [147] C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, 3, 125.
- [148] F. Del Vecchio, H. Petkovic, S. G. Kendrew, L. Low, B. Wilkinson, R. Lill, J. Cortes, B. A. Rudd, J. Staunton, P. F. Leadlay, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 30, 489.
- [149] J. Staunton, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 159.
- [150] C. Khosla, P. B. Harbury, *Nature* **2001**, 409, 247.
- [151] C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3010.
- [152] H. G. Floss, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 27, 183.
- [153] S. Pelzer, A. Vente, A. Bechthold, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, 8, 228.
- [154] P. F. Long et al., *Mol. Microbiol.* **2002**, 43, 1215.
- [155] C. Rowe et al., *Chem. Biol.* **2001**, 8, 475.
- [156] S. Gaisser et al., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2840.
- [157] J. Ligon, S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnar, J. Zawodny, S. Money, T. Schupp, *Gene* **2002**, 285, 257.
- [158] C. J. Wilkinson, E. J. Frost, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1197.
- [159] J. Garcia-Bernardo, L. Xiang, H. Hong, B. S. Moore, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1129.
- [160] R. McDaniel, A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, G. Ashley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1846.
- [161] Q. Xue, G. Ashley, C. R. Hutchinson, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11740.
- [162] Y. Volchegursky, Z. Hu, L. Katz, R. McDaniel, *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 752.
- [163] K. Watanabe, C. C. C. Wang, C. N. Boddy, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 42020.
- [164] R. L. Arslanian, L. Tang, S. Blough, W. Ma, R. G. Qiu, L. Katz, J. R. Carney, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1061.
- [165] Y. Q. Xue, D. H. Sherman, *Metab. Eng.* **2001**, 3, 15.
- [166] Y. J. Yoon, B. J. Beck, B. S. Kim, H.-Y. Kang, K. A. Reynolds, D. H. Sherman, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 203.
- [167] K. Ichinose, D. J. Bedford, D. Tornus, A. Bechthold, M. J. Bibb, W. P. Revill, H. G. Floss, D. A. Hopwood, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 647.
- [168] N. Menendez, E. A. M. Nur, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas, C. Mendez, *Mol. Microbiol.* **2004**, 53, 903.
- [169] N. Menendez, M. Nur-e-Alam, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas, C. Mendez, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 21.
- [170] D. Hoffmeister, B. Wilkinson, G. Foster, P. J. Sidebottom, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 287.
- [171] C. Dürr, D. Hoffmeister, S. E. Wohlert, K. Ichinose, M. Weber, U. von Mulert, J. S. Thorson, A. Bechthold, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2962.
- [172] S. Weinig, T. Mahmud, R. Müller, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 953.
- [173] T. Weber, M. A. Marahiel, *Structure (Cambridge, MA, U.S.)* **2001**, 9, R3.
- [174] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 7036.
- [175] A. M. Gehring, I. Mori, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, 37, 2648.
- [176] T. Keating, G. Marshall, C. Walsh, *Biochemistry* **2000**, 39, 15522.
- [177] H. D. Mootz, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *ChemBioChem* **2002**, 3, 490.
- [178] T. Duerfahrt, S. Doekel, T. Sonke, P. Quaedflieg, M. A. Marahiel, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 4555.
- [179] S. E. O'Connor, C. T. Walsh, F. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4047; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3917.
- [180] S. J. Admiraal, C. Khosla, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2002**, 41, 5313.
- [181] S. J. Admiraal, C. Khosla, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13664.
- [182] T. P. Nicholson, C. Winfield, J. Westcott, J. Crosby, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Chem. Commun.* **2003**, 686.
- [183] K. Ueda, K. M. Kim, T. Beppu, S. Horinouchi, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 638.
- [184] H. B. Bode, R. Müller, *Plant Physiol.* **2003**, 132, 1153.
- [185] B. S. Moore et al., *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1956.
- [186] B. S. Moore, J. N. Hopke, *ChemBioChem* **2001**, 2, 35.
- [187] N. Funai, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 4628.
- [188] N. Funai, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *Biochem. J.* **2002**, 367, 781.
- [189] P. Saxena, G. Yadav, D. Mohanty, R. S. Gokhale, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44780.
- [190] J. C. Jeong, A. Srinivasan, S. Gruschow, H. Bach, D. H. Sherman, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 64.
- [191] T. Li, O. Choroba, H. Hong, D. Williams, J. Spencer, *Chem. Commun.* **2001**, 20, 2156.
- [192] V. Pfeifer, G. J. Nicholson, J. Ries, J. Recktenwald, A. B. Schefer, R. M. Shawky, J. Schröder, W. Wohlleben, S. Pelzer, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 38370.
- [193] J. W. Trauger, R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Nature* **2000**, 407, 215.
- [194] R. M. Kohli, M. D. Burke, J. Tao, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7160.
- [195] R. M. Kohli, J. Takagi, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1247.
- [196] R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature* **2002**, 418, 658.
- [197] H. Lin, D. A. Thayer, C. H. Wong, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1635.

- [198] J. S. Thorson, W. A. Barton, D. Hoffmeister, C. Albermann, D. B. Nikolov, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 16.
- [199] J. Yang, L. Liu, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 992.
- [200] X. M. He, H. W. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 701.
- [201] X. He, H. W. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 590.
- [202] X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1467.
- [203] H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998.
- [204] K. L. Rinehart, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361.
- [205] W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1163.
- [206] S. Weist, R. D. Sussmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141.
- [207] K. Kinoshita, B. A. Pfeifer, C. Khosla, D. E. Cane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3701.
- [208] K. Kinoshita, C. Khosla, D. E. Cane, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3889.
- [209] K. J. Weissman et al., *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 743.
- [210] D. E. Ehmann, J. W. Trauger, T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 765.
- [211] D. E. Cane, F. Kudo, K. Kinoshita, C. Khosla, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 131.
- [212] J. Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1110.
- [213] M. Ziehl, J. He, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1202.
- [214] T. A. Cropp, D. J. Wilson, K. A. Reynolds, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 980.
- [215] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70.
- [216] C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, M. K. Richards, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357.
- [217] S. Chen, D. von Bamberg, V. Hale, M. Brauer, B. Hardt, R. Müller, H. G. Floss, K. A. Reynolds, E. Leistner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261*, 98.
- [218] L. E. Khaw, G. A. Böhm, S. Metcalfe, J. Staunton, P. F. Leadlay, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 809.
- [219] H. Xu, L. Heide, S. M. Li, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 655.
- [220] U. Galm, M. A. Dessoy, J. Schmidt, L. A. Wessjohann, L. Heide, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 173.
- [221] B. Bister et al., *ChemBioChem* **2003**, *4*, 658.
- [222] T. L. Schneider, C. T. Walsh, S. E. O'Connor, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11272.