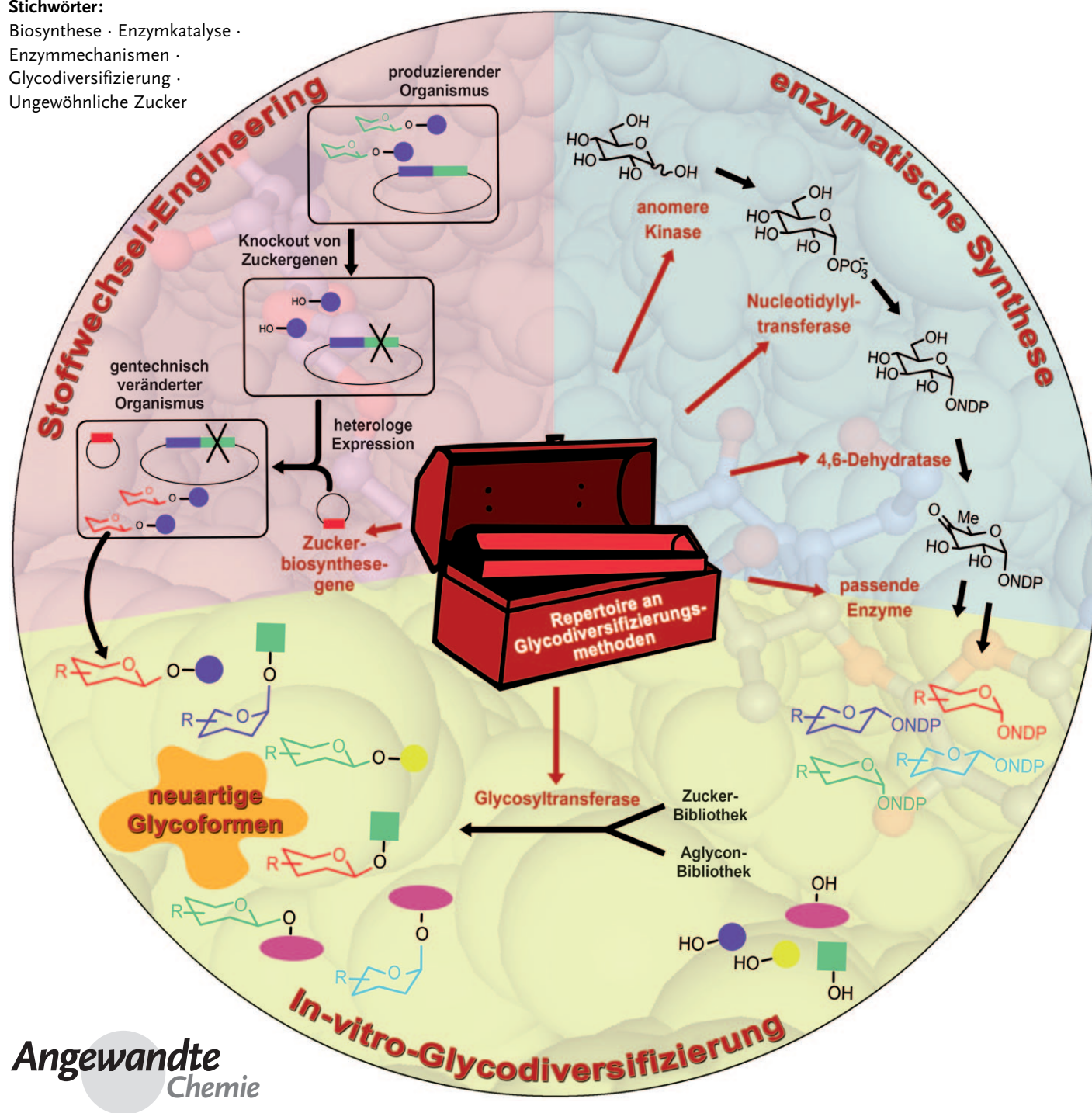


Biosynthese von Naturstoffzuckern und enzymatische Glycodiversifizierung

Christopher J. Thibodeaux, Charles E. Melançon III und Hung-wen Liu*

Stichwörter:

Biosynthese · Enzymkatalyse ·
Enzymmechanismen ·
Glycodiversifizierung ·
Ungewöhnliche Zucker



Viele biologisch aktive niedermolekulare Naturstoffe, die von Mikroorganismen produziert werden, leiten ihre Aktivitäten von Zuckersubstituenten ab. Eine Veränderung der Struktur dieser Zucker kann starke Auswirkungen auf die biologischen Eigenschaften der Stammverbindungen haben. Diese Erkenntnis hat zu Bestrebungen geführt, die Zuckerreste dieser Naturstoffe mithilfe des Zuckerbiosyntheseapparats zu derivatisieren. Hierfür müssen die jeweiligen Biosynthesewege und die Mechanismen der Schlüsselenzyme im Detail bekannt sein. In der Biochemie beginnt man allmählich, die Biosyntheseprinzipien, die dem Aufbau vieler glycosylierter Naturstoffe zugrunde liegen, zu verstehen, und man konnte einen Satz von Enzymaktivitäten ausmachen, die für die Synthese der vielfältigen in der Natur beobachteten Zuckerstrukturen zuständig sind. Bemerkenswerterweise zeigen viele dieser Zuckerbiosyntheseenzyme ebenso wie Glycosyltransferasen eine relaxierte Substratspezifität. Die Promiskuität dieser Enzyme führte zu Bestrebungen, die Zuckerstrukturen zu modifizieren und die Glycosylierungsmuster von Naturstoffen durch Planung der Stoffwechselwege oder durch enzymatische Glycodiversifizierung zu verändern. In der praktischen biomedizinischen Forschung werden diese Studien zur Entwicklung neuer Glycosylierungsmittel führen und bei Sekundärmetaboliten neue Glycoformen mit nützlichen biologischen Aktivitäten hervorbringen.

1. Einführung

Die Glycosylierung ist eine der häufigsten und wichtigsten Reaktionen in biologischen Systemen. Die resultierenden Glycokonjugate haben mannigfaltige Funktionen, einschließlich Informationsspeicherung und -transfer, Energiespeicherung, Erhaltung der strukturellen Integrität der Zelle, molekulare Erkennung, Signalübertragung, Virulenz und chemische Abwehr. Einige Krankheiten des Menschen sind mit anomalen Proteinglycosylierungsmustern verbunden,^[1,2] und Virusinfektionen beginnen häufig mit der Erkennung spezifischer Proteinglycoformen der Zelloberflächen.^[3] Ähnlich hängt auch die bakterielle Virulenz mit Polysacchariden der Zelloberfläche zusammen,^[4] und viele Bakterien verwenden glycosylierte Moleküle als chemische Waffen oder als Signalmoleküle für die Kommunikation innerhalb oder zwischen Spezies.^[5] Eine beträchtliche Anzahl dieser glycosylierten Moleküle ist von klinischem Nutzen zur Behandlung bakterieller oder Pilzinfektionen, Krebs und anderer Krankheiten des Menschen. Diese Klasse kleiner Glycokonjugate steht im Mittelpunkt dieses Aufsatzes. Änderungen in den Strukturen von Zuckerresten glycosylierter Verbindungen können weitreichende Auswirkungen auf deren Aktivitäten, Selektivitäten und pharmakinetische Eigenschaften zur Folge haben.^[6,7] Daher ist es wünschenswert, die biochemischen Vorgänge für die Bildung von Glycokonjugaten zu verstehen.

Es gibt etliche Arten glycolysierter Biomoleküle, wie etwa Nucleinsäuren, Polysaccharide, Proteine, Lipide und Sekundärmetabolite. Die Biosynthesen von D-Ribose (1), 2-

Aus dem Inhalt

1. Einführung	9961
2. Biosynthese ungewöhnlicher Naturstoffzucker	9962
3. Enzymchemie in der Biosynthese von NDP-Zuckern	9976
4. Glycosyltransferasen	9984
5. Glycoengineering von Naturstoffen	9988
6. Zusammenfassung und Ausblick	10002

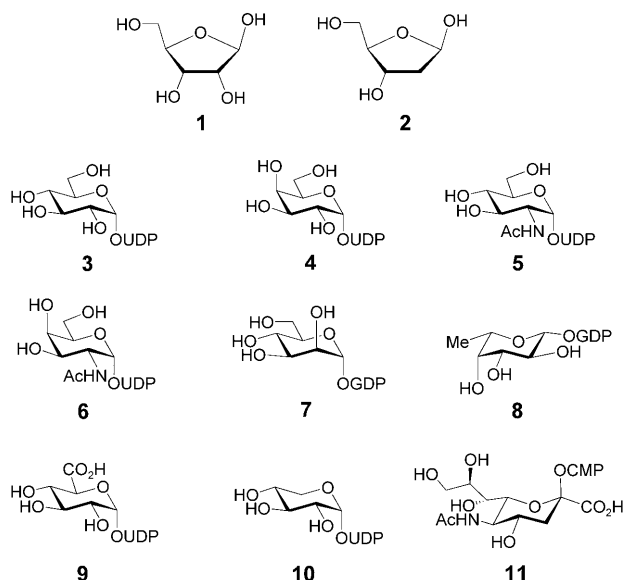
Desoxy-D-ribose (2) (Schema 1) und Nucleosiden werden in diesem Aufsatz nicht behandelt. Überraschenderweise werden eukaryotische Glycoproteine und Glycolipide aus lediglich neun Nucleotidzuckerdonoren synthetisiert (3–11, Schema 1).^[8] Obwohl diverse enzymatische Routen zur Verfügung stehen, um diese Zucker auch nach

dem Glycosyltransfer enzymatisch zu modifizieren, ergibt sich bei den meisten eukaryotischen Glycanen die strukturelle Vielfalt durch Variation der Zahl und Art der Zuckereinheiten und der Verknüpfungen zwischen den Zuckerkomponenten von Oligosacchariden. Umgekehrt enthalten prokaryotische Polysaccharide und glycosylierte Naturstoffe mehr als hundert verschiedene Zucker, von denen viele desoxygeniert und hoch funktionalisiert sind. Folglich erzielen prokaryotische Glycokonjugate ihre strukturelle Diversität meist durch ihre ungewöhnlichen Zuckerkomponenten selbst.

Weil die Zuckerreste für die Bioaktivitäten vieler bakterieller Naturstoffe wichtig sind, bestand großes Interesse an der Entwicklung von Biosynthesetechniken, um die Zuckerstrukturen der Glycokonjugate zu verändern.^[9] Der Entwurf solcher Strategien verlangt fundierte Kenntnisse sowohl der Organisation des nativen Biosyntheseapparats als auch der Mechanismen der codierten Enzyme. Die Einführung moderner molekularbiologischer Techniken hat zur Entdeckung und Sequenzierung der Biosynthesegencluster vieler Naturstoffe und ungewöhnlicher Zucker geführt, wodurch verglei-

[*] C. J. Thibodeaux, C. E. Melançon III, Prof. H.-w. Liu
Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy and Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712 (USA)
Fax: (+1) 512-471-2746
E-Mail: h.w.liu@mail.utexas.edu

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200801204> zu finden.



Schema 1. Häufig vorkommende Zucker im Primärmetabolismus. D-Ribose (1), 2-Desoxy-D-ribose (2), UDP-D-Glucose (3), UDP-D-Galactose (4), UDP-2-N-Acetyl-D-glucosamin (5), UDP-2-N-Acetyl-D-galactosamin (6), GDP-D-Mannose (7), GDP-L-Fucose (8), UDP-D-Glucuronsäure (9), UDP-D-Xylose (10), CMP-N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure, 11).

chende Genomanalysen zur funktionalen Zuordnung der codierten Enzyme möglich wurden. Dies wiederum hat die genetische und biochemische Charakterisierung einiger Zuckerbiosynthesewege ermöglicht. Ein wichtiger Befund aus diesen Studien ist, dass viele ungewöhnliche Zuckerbiosynthesenzyme und Glycosyltransferasen (GTs), die Enzyme, die aktivierte Zucker an ein Akzeptormolekül binden) eine breite Substratspezifität aufweisen, weshalb sie sowohl in vivo als auch in vitro zur Bindung alternativer Zucker an Naturstoffakzeptoren (ein Vorgang, der als Glycodiversifizierung bezeichnet wird) verwendet werden können. Die In-vitro-Glycodiversifizierung beruht auf der Nutzung einer GT mit breiter Spezifität, um chemisch oder enzymatisch synthetisierte, nichtnative Zuckerdonoren an Akzeptormoleküle zu koppeln. Gendisruption und heterologe Expression fremder Zuckerbiosynthesegene haben auch die Beeinflussung endogener Zuckerbiosynthesewege in vivo durch Stoffwechsel-

Engineering und kombinatorische Biosynthese ermöglicht. Sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Strategien haben sich bei der Herstellung von Naturstoffanaloga mit modifizierten Zuckerstrukturen als wirksam erwiesen.

In diesem Aufsatz fassen wir das gegenwärtige Wissen über die Biosynthese und den Glycosyltransfer ungewöhnlicher Zucker, die in biologisch aktiven niedermolekularen Naturstoffen bakteriellen Ursprungs gefunden werden, zusammen (Abschnitt 2). Nur diejenigen Reaktionswege werden ausführlich besprochen, die genetisch oder biochemisch verifiziert sind. Als nächstes erörtern wir die Katalysemechanismen mehrerer Zuckerbiosynthesenzyme, wobei wir uns auf solche konzentrieren, die von der Natur eingesetzt werden, um strukturelle Diversität bei Zuckern zu erzeugen (Abschnitt 3). Wir werden auch einige ungewöhnliche und nicht gut verstandene Zuckermodifikationen behandeln, die eine weitere Erforschung verdienen. Die Struktur und Mechanismen von Glycosyltransferasen werden in Abschnitt 4 vorgestellt, mit Schwerpunkt auf Glycosyltransferasen, die am bakteriellen Sekundärmetabolismus beteiligt sind. Schließlich werden neuere Versuche, die Zuckerkomponenten von Naturstoffen durch enzymatisches Glycoengineering zu modifizieren, diskutiert (Abschnitt 5). Insgesamt beleuchten diese Studien nicht nur den überwältigenden Einfallreichtum der Natur, die zum Zweck der Glycodiversifizierung auf vielfältige chemische Mechanismen und natürliche kombinatorische Biosyntheseprozesse zurückgreift, sondern sie ermöglichen auch die Entwicklung von Methoden zur Veränderung des Zuckerbiosyntheseapparats, mit dem Fernziel, klinisch nützliche Wirkstoffe zu erhalten.

2. Biosynthese ungewöhnlicher Naturstoffzucker

2.1. Aktivierung von Zuckern

Monosaccharide müssen zuerst in Nucleotidmonophosphat(NMP)- oder Nucleotiddiphosphat(NDP)-Derivate überführt werden, damit sie von den Biosynthesenzymen und GTs innerhalb der Zelle verwendet werden können. Beispiele für Adenindiphosphat(ADP)-, Thymidindiphosphat(TDP)-, Guanindiphosphat(GDP)-, Uridindiphosphat(UDP)-, Cytidindiphosphat(CDP)- und Cytidinmonophosphat(CMP)-aktivierte Monosaccharide sind bekannt. Die



Christopher J. Thibodeaux, geboren in Louisiana (USA), studierte Biochemie und Pflanzenbiologie an der Louisiana State University und schloss sich dann der Arbeitsgruppe von Prof. Hung-wen Liu an der University of Texas in Austin an, wo er zurzeit seine Dissertation in Zell- und Molekularbiologie anfertigt. Seine Forschungsinteressen gelten der Kinetik und den Mechanismen ungewöhnlicher enzymkatalysierter Reaktionen.



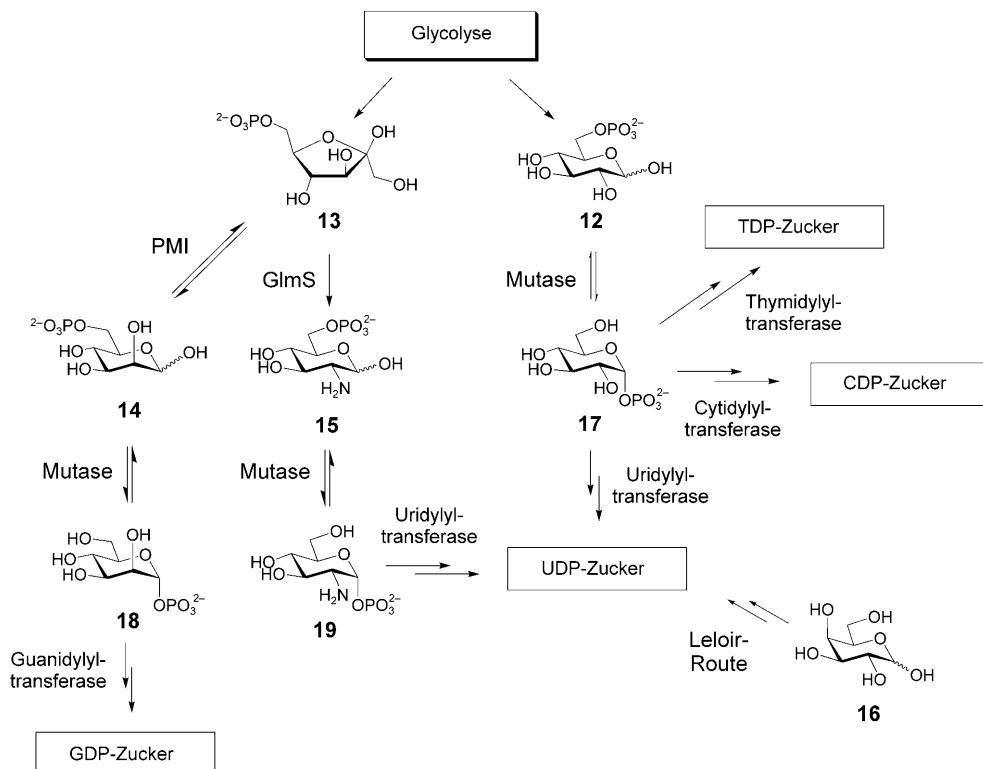
Charles E. (Chad) Melançon wuchs in New Orleans auf und studierte Chemie und Biologie an der dortigen Universität (Bachelor 2001). Er promovierte in Biochemie bei Prof. Hung-wen Liu an der University of Texas in Austin mit einer Arbeit über die Biosynthese von Zuckern in Makrolid-Antibiotika und die Glycosylierungswege in Actinomycetes. Im Juni 2007 begann er ein Postdoktorat bei Prof. Peter Schultz am Scripps Research Institute in La Jolla, wo er sich mit der Anwendung diversitätsbasierter Strategien zur Herstellung gentechnisch modifizierter Organismen mit erweiterten genetischen Codes beschäftigt.

Phosphonucleotidyleinheit hat zwei Funktionen: Sie dient als Erkennungselement für die an den Biosynthesewegen beteiligten Enzyme und fungiert als gute Abgangsgruppe während des Glycosyltransfers. Die Zwischenstufen der Glycolyse, Glucose-6-phosphat (**12**) und Fructose-6-phosphat (**13**), bilden die Quellen für die meisten Nucleotidzucker (Schema 2). Fructose-6-phosphat (**13**) wird in der Biosynthese von GDP-Zuckern durch die Phosphomannoisomerase (PMI) in Mannose-6-phosphat (**14**) überführt, und bei der Bildung von UDP-Zuckern durch die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS) in Glucosamin-6-phosphat (**15**). Alternativ können UDP-Zucker aus Galactose (**16**) über den Leloir-Reaktionsweg abgeleitet werden, der letztlich zu UDP-

Glucose (**3**) führt. Glucose-6-phosphat (**12**) fungiert ebenfalls als Biosynthesevorstufe vieler UDP-Zucker, tritt aber am häufigsten in den Biosynthesen von TDP- und CDP-Zuckern auf. In allen Fällen werden die Zucker-6-phosphate **12**, **14** und **15** vor dem Nucleotidyltransfer durch unterschiedliche, aber verwandte Phosphohexosemutasen in die entsprechenden Zucker-1-phosphate (**17**, **18** bzw. **19**) umgewandelt.^[10] In Eukaryoten existieren Wiederverwertungsmechanismen („salvage pathways“), die Zucker aus katabolischen Routen (wie dem Glycoproteinabbau) als Biosynthesevorstufen verwenden, darunter auch gewöhnliche Zucker wie *N*-Acetylglucosamin, *N*-Acetylgalactosamin, Mannose und Fucose.^[8] Diese Wiederverwertungsmechanismen umfassen entweder

einen direkten anomeren Phosphoryltransfer oder eine 6-Phosphorylierung mit anschließender mutasekatalysierter 6→1-Wanderung, um Zucker-1-phosphate zu bilden. Die Biosynthesewege der einzelnen Nucleotidzuckergruppen werden unten genauer diskutiert.

Der Transfer von Nucleotidmonophosphaten auf Zucker-1-phosphat-Substrate wird von Nucleotidyltransferasen katalysiert. Diese Aktivierungsreaktion erfolgt in den Zuckerbiosynthesewegen gewöhnlich früh. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist der späte Nucleotidyltransfer in der Biosynthese von CMP-Zuckern (wie CMP-Sialinsäure).^[11–13] Die Mehrheit der bisher identifizierten Nucleotidyltransferasen zeigt mäßige bis hohe Sequenzähnlichkeit. Jedoch ist es noch nicht möglich, die Nucleotidspezifität dieser Enzyme nur auf Basis der Aminosäuresequenz zuverlässig vorherzusagen, obwohl mit phylogenetischen Analysen bei der Identifizierung von Untergruppen, die annähernd mit der Nucleotidspezifität korrelieren, ein begrenzter Erfolg erzielt wurde. Die Brauchbarkeit von Kinasen, die anomere Zucker umsetzen, und von Nucleotidyltransferasen zum Aufbau von NDP-Zucker-Bibliotheken für das In-vitro-Glycoengineering wird in Abschnitt 5.2.1 erörtert.



Schema 2. Die meisten NDP-Zucker leiten sich von den Glycolyse-Zwischenstufen Glucose-6-phosphat (**12**) und Fructose-6-phosphat (**13**) oder von Galactose (**16**) ab. Diese Zucker werden in Zucker-1-phosphate überführt, die dann durch die passende Nucleotidyltransferase aktiviert werden können.



Hung-wen (Ben) Liu wurde in Taipei (Taiwan) geboren. Nach dem Chemiestudium und der Promotion kam er 1984 an die chemische Fakultät der University of Minnesota. 2000 wechselte er an die University of Texas in Austin, wo er zurzeit den George H. Hitchings Regents Chair in Drug Design innehat und Professor für Medizinische Chemie, Chemie und Biochemie ist. Seine Forschung liegt an der Schnittstelle zwischen organischer und biologischer Chemie, mit Schwerpunkten auf enzymatischen Reaktionsmechanismen, Biosynthesen, Regulation von Proteinfunktionen, Entwicklung und Synthese von Inhibitoren und Stoffwechsel-Engineering.

Hung-wen (Ben) Liu wurde in Taipei (Taiwan) geboren. Nach dem Chemiestudium und der Promotion kam er 1984 an die chemische Fakultät der University of Minnesota. 2000 wechselte er an die University of Texas in Austin, wo er zurzeit den George H. Hitchings Regents Chair in Drug Design innehat und Professor für Medizinische Chemie, Chemie und Biochemie ist. Seine Forschung liegt an der Schnittstelle zwischen organischer und biologischer Chemie, mit Schwerpunkten auf enzymatischen Reaktionsmechanismen, Biosynthesen, Regulation von Proteinfunktionen, Entwicklung und Synthese von Inhibitoren und Stoffwechsel-Engineering.

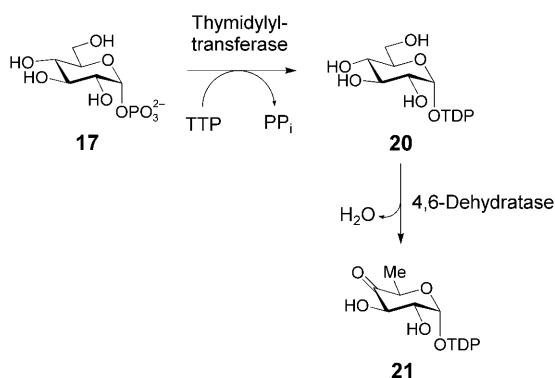
länglich vorherzusagen, obwohl mit phylogenetischen Analysen bei der Identifizierung von Untergruppen, die annähernd mit der Nucleotidspezifität korrelieren, ein begrenzter Erfolg erzielt wurde. Die Brauchbarkeit von Kinasen, die anomere Zucker umsetzen, und von Nucleotidyltransferasen zum Aufbau von NDP-Zucker-Bibliotheken für das In-vitro-Glycoengineering wird in Abschnitt 5.2.1 erörtert.

2.2. Natürlich vorkommende TDP-Zucker

TDP-aktivierte Zucker bilden die strukturell vielfältigste Klasse der in der Natur beobachteten Nucleotidzucker. Zusätzlich zu ihrer Verwendung als Bausteine für viele bakte-

rielle Polysaccharide sind TDP-Zucker die bevorzugten Zuckerdonoren in der Biosynthese glycosylierter Naturstoffe in Bakterien. Fast alle bekannten TDP-Zucker sind 6-Desoxyhexosen, und viele sind auch am C-2, C-3 oder C-4 des Pyranoserings desoxygeniert. Tatsächlich sind TDP-Zucker die einzige bislang bekannte Klasse von NDP-Zuckern, die an C-2 oder C-4 desoxygeniert sein können. Die Desoxygenierung an einer oder mehreren Positionen führt zusammen mit einer Vielzahl an anderen Modifikationen (von denen viele bei anderen Klassen von NDP-Zuckern nicht gefunden werden) zu der hohen Diversität bei den TDP-Zuckerstrukturen in der Natur.

Alle TDP-Zucker, deren Biosynthese untersucht worden ist, leiten sich von Glucose-1-phosphat (**17**) ab, das durch eine Thymidyltransferase in TDP-D-Glucose (**20**) und dann weiter durch die TDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase in TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose (**21**) umgewandelt wird (Schema 3).



Schema 3. Eintrittsstelle für den bakteriellen Sekundärmetabolismus der TDP-Desoxyzucker: Nach Thymidyllylierung von α -D-Glucose-1-phosphat (**17**) durch eine Thymidyltransferase katalysiert eine TDP-Glucose-4,6-Dehydratase die Umwandlung von TDP-D-Glucose (**20**) in TDP-4-Keto-6-desoxy- α -D-glucose (**21**).

Weil **21** in der Biosynthese der meisten bakteriellen Desoxyzucker eine Schlüsselzwischenstufe ist, enthalten die meisten Biosynthesegencluster von Naturstoffen Gene zur Verschlüsselung der zugehörigen Thymidyltransferase und 4,6-Dehydratase, wenngleich Beispiele für Cluster ohne diese Gene nicht selten sind. Es wird vermutet, dass in den letzteren Fällen die Enzyme gemeinsam mit der Polysaccharidbiosynthese genutzt werden. Bisher wurden die Biosynthesewege für mehr als 30 ungewöhnliche TDP-Zucker beschrieben. Die meisten dieser Wege sind aufgrund von Sequenzinformationen zu den Genclustern vorgeschlagen worden, wobei weniger als die Hälfte der Wege durch experimentelle Daten belegt sind. Durch Korrelation von Phänotypen mit spezifischen Gendisruptionen und/oder durch biochemische Charakterisierung heterolog exprimierter Enzyme ließen sich mehrere Reaktionswege detailliert aufklären. Diese Studien lieferten wichtige Erkenntnisse, um die molekularen Abläufe bei der Biosynthese ungewöhnlicher Zucker zu verstehen, was im Gegenzug zu besseren Voraussagen für andere Reaktionswege auf der Basis von Gensequenzinformationen führte.

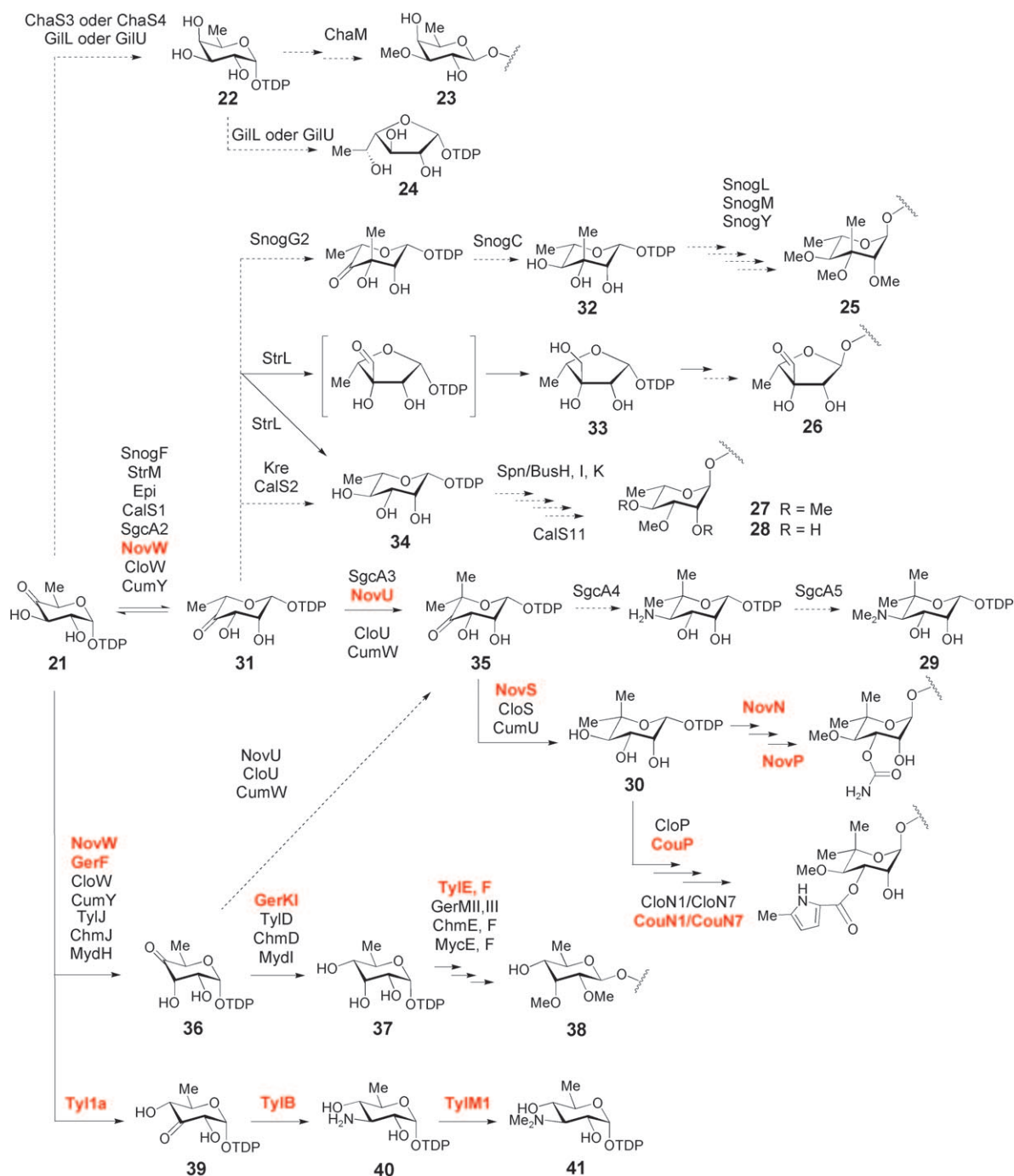
Die Schemata 4–6 enthalten eine umfangreiche Zusammenstellung der Biosynthesewege zu Naturstoff-TDP-Zuckern, die zumindest teilweise aus biochemischen und genetischen Daten abgeleitet wurden. Diese Wege werden – hauptsächlich anhand des Desoxygenierungsgrades – in drei Gruppen unterteilt. Ein bemerkenswerter Aspekt ist, dass die primären Strukturunterschiede in den TDP-Zuckern nur durch fünf Arten von Enzymreaktionen erzeugt werden, was der sehr ökonomischen Verwendung einer „kombinatorischen Biosynthesestrategie“ durch die Natur entspricht. Die Mechanismen von einigen dieser „allgemeinen“ Enzymaktivitäten werden in Abschnitt 3.1 genauer diskutiert.

2.2.1. Gruppe 1: 6-Desoxy-, 3-Amino-3,6-didesoxy- und 4-Amino-4,6-didesoxyzucker

Die D-Fucose (siehe **22**) und D-Digitalosereste (**23**) der Antitumorverbindung Chartreusin, die von *Streptomyces chartreusis* produziert wird, und der D-Fucufuranoserest (siehe **24**) des Antibiotikums Gilvocarcin V aus *Streptomyces griseoflavus* leiten sich vermutlich von der TDP-D-Fucose (**22**) ab, die wiederum durch Ketoreduktion aus **21** gebildet wird (Schema 4). Die Verbindung **22** ist auch ein Baustein für die Kapselpolysaccharide in *Aneurinibacillus actinomycetemcomitans*.^[14,15] Die Ketoreduktion wird wahrscheinlich durch ChaS3,^[16] einem Homologen der Ketoreduktase Fed in *A. actinomycetemcomitans*,^[17] oder durch die kurzkettinge Dehydrogenase/Reduktase (SDR) ChaS4 katalysiert. Nach der Glycosidbildung wird die D-Fucose dann am Sauerstoff durch die Methyltransferase ChaM zur D-Digitalose (**23**) methyliert. Bei der Biosynthese von Gilvocarcin könnten GilL und GilU (beide aus der SDR-Familie) die Umwandlung von **21** in **22** und die anschließende Ringverengung zur TDP-D-Fucufuranose (**24**) katalysieren, obgleich dies spekulativ ist.^[18]

Für die Biosynthesen der Zucker **25–35** wird ein gemeinsamer 3,5-Epimerisierungsschritt vorgeschlagen, der **21** in TDP-4-Keto-6-desoxy-L-mannose (**31**) überführt. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, sind homolog zu RmlC, das an der Biosynthese von TDP-L-Rhamnose (**34**) in *Salmonella enterica* beteiligt ist.^[17,19–21] Der Zucker L-Nogalose (**25**) kommt im Anthracyclin-Antibiotikum Nogalamycin aus *Streptomyces nogalater* vor. Für die Bildung von **25** wurde vorgeschlagen, dass durch aufeinanderfolgende 3,5-Epimerisierung (SnogF), 3-C-Methylierung (SnogG2) und 4-Ketoreduktion (SnogC) die TDP-6-Desoxy-3-C-methyl-L-mannose (**32**) entsteht, die wahrscheinlich als Substrat für den Glycosyltransfer fungiert.^[22] Die Methylierungen der 2-, 3- und 4-Hydroxygruppen durch die Methyltransferasen SnogL, SnogM bzw. SnogY zur L-Nogalose (**25**) finden vermutlich nach der Glycosylierung statt.

Der ungewöhnliche Zucker D-Streptose (**26**), der im Aminoglycosidantibiotikum Streptomycin vorkommt, wird von mehreren *Streptomyces*-Spezies, vor allem *S. griseus*, produziert. Eine frühe biochemische Untersuchung bewies, dass TDP-D-Dihydrostreptose (**33**) der unmittelbare Donor für die Streptoseeinheit ist,^[23] der in zwei Schritten aus **21** gebildet wird: 3,5-Epimerisierung führt zu **31** und anschließende NADPH-abhängige Ringverengung zu **33**.^[24,25] Der



Schema 4. Biosynthese von TDP-Zuckern der Gruppe I. Diese Gruppe umfasst 6-Desoxyzucker (wie **23–28**, **30** und **38**) sowie den 4-Amino-4,6-dideoxyzucker **29** und den 3-Amino-3,6-dideoxyzucker **41**. Ausgehend vom gemeinsamen Intermediat TDP-4-Keto-6-deoxy- α -D-glucose (**21**) beginnt die Biosynthese der meisten TDP-Zucker dieser Gruppe mit dem gleichen Epimerisierungsschritt (**21** \rightarrow **31**). Durchgezogene Pfeile kennzeichnen enzymkatalysierte Reaktionen, die entweder in vitro durch biochemische Experimente mit gereinigten Enzymen oder in vivo durch Gen-disruption/heterologe Expression geprüft wurden. Gestrichelte Pfeile zeigen Reaktionen an, die experimentell nicht überprüft wurden, aber durch Vergleich der Gensequenzen mit Genen bekannter Funktion vorgeschlagen wurden. Namen in Rot markieren Enzyme, deren Funktionen biochemisch mit gereinigten Enzymen verifiziert wurden.

Streptomycin-Gencluster wurde später in *S. griseus* identifiziert, und es wurde bestimmt, dass die Epimerisierung durch StrM, ein RmlC-Homologes, und die Ringverengung durch StrL, ein Mitglied der SDR-Superfamilie, katalysiert wird.^[26] Die heterologe Expression von *strL* und *strM* zusammen in einer Mutante des Methymycinproduzenten *S. venezuelae*,

die **21** akkumuliert, führte zur Produktion von Methymycin-derivaten, die L-Rhamnose enthalten (siehe **34**).^[27] Obwohl keine Dihydrostreptose gebildet wurde, lieferte die Tatsache, dass **21** in diesem rekombinanten Stamm in TDP-L-Rhamnose (**34**) überführt wurde, einen starken Beleg dafür, dass StrM eine 3,5-Epimerase ist und StrL 4-Ketoreduktaseakti-

vität aufweist.^[27] Die vorgeschlagene Bildung von Furanose- (33) und Pyranoseprodukten (34) aus 31 durch StrL erinnert an die Reaktion, die von der UDP-Apiose-Synthase (durch *AXS1* in *Arabidopsis thaliana* codiert) katalysiert wird.^[28–30] Die Ringverengung von 22 zu 24 in der Gilvocarcin-Biosynthese kann auf einem ähnlichen Weg erfolgen.

In der Natur findet man vielfältige *O*-methylierte L-Rhamnosereste, z. B. 27 und 28 in den Makrolidverbindungen Spinosyn und Butenylspinosyn, die beide von *Saccharopolyspora spinosa* produziert werden,^[31] im aromatischen Polyketid Elloramycin aus *Streptomyces olivaceus*^[32] und in den Endiin-Calicheamicinen aus *Micromonospora echinospora*.^[33] Die Gene *spn/busH*, *spn/busI* und *spn/busK* codieren für die *O*-Methyltransferasen der Spinosyn- bzw. Butenylspinosyn-Wege, während *calS11* für die 3-*O*-Methyltransferase codiert, die in der Calicheamicin-Biosynthese zum Einsatz kommt. Interessanterweise fehlen die zur Bildung von 34 notwendigen Gene in den Genclustern der Spinosyne/Butenylspinosyne. Stattdessen sind sie in anderen Bereichen des Genoms in *S. spinosa* lokalisiert und sind wahrscheinlich sowohl an der Biosynthese der Zellwand als auch an der Bildung der Spinosyne beteiligt.^[34]

TDP-4-*N,N*-Dimethylamino-4-desoxy-5-*C*-methyl-L-rhamnose (29) und TDP-L-Noviose (30) sind die vermuteten Zuckerdonoren für die Biosynthese des Endiin-Antibiotikums C-1027^[35] bzw. der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin,^[36] Clorobiocin^[37] und Coumermycin.^[38] Diese Zucker enthalten eine geminale 5,5-Dimethyleinheit, die durch *C*-Methylierung am C-5 gebildet wird. Ausgehend von 21 verläuft ihre Biosynthese über eine durch RmlC-Homologe katalysierte 3,5- oder 3-Epimerisierung zu 31 bzw. 36, mit anschließendem 5-*C*-Methyltransfer zur TDP-4-Keto-6-desoxy-5-*C*-methyl-L-mannose (35). Ergebnisse aus gekoppelten Assays der gereinigten Epimerase NovW und 5-*C*-Methyltransferase NovU aus dem Novobiocin-Weg^[39] zusammen mit Geninaktivierungsstudien von *cloU* aus der Clorobiocin-Biosynthese^[40] deuteten darauf hin, dass die Biosynthese von 30 eher über eine 3,5- als eine 3-Epimerisierung verläuft. Eine neue In-vitro-Studie zeigte jedoch, dass die Epimerase NovW kinetisch nur als 3-Epimerase wirksam ist.^[41] Der letzte Schritt der Biosynthese von 30 ist die durch NovS/CloS/CumU katalysierte Reduktion von 35 an C-4.^[39] Für die Bildung von 29 ausgehend von 21 in der Biosynthese von C-1027 wurde folgende Reaktionssequenz vorgeschlagen: 3,5-Epimerisierung durch SgcA2, *C*-Methyltransfer durch SgcA3, C4-Aminotransfer durch SgcA4 und 4-*N,N*-Dimethyltransfer durch SgcA5.

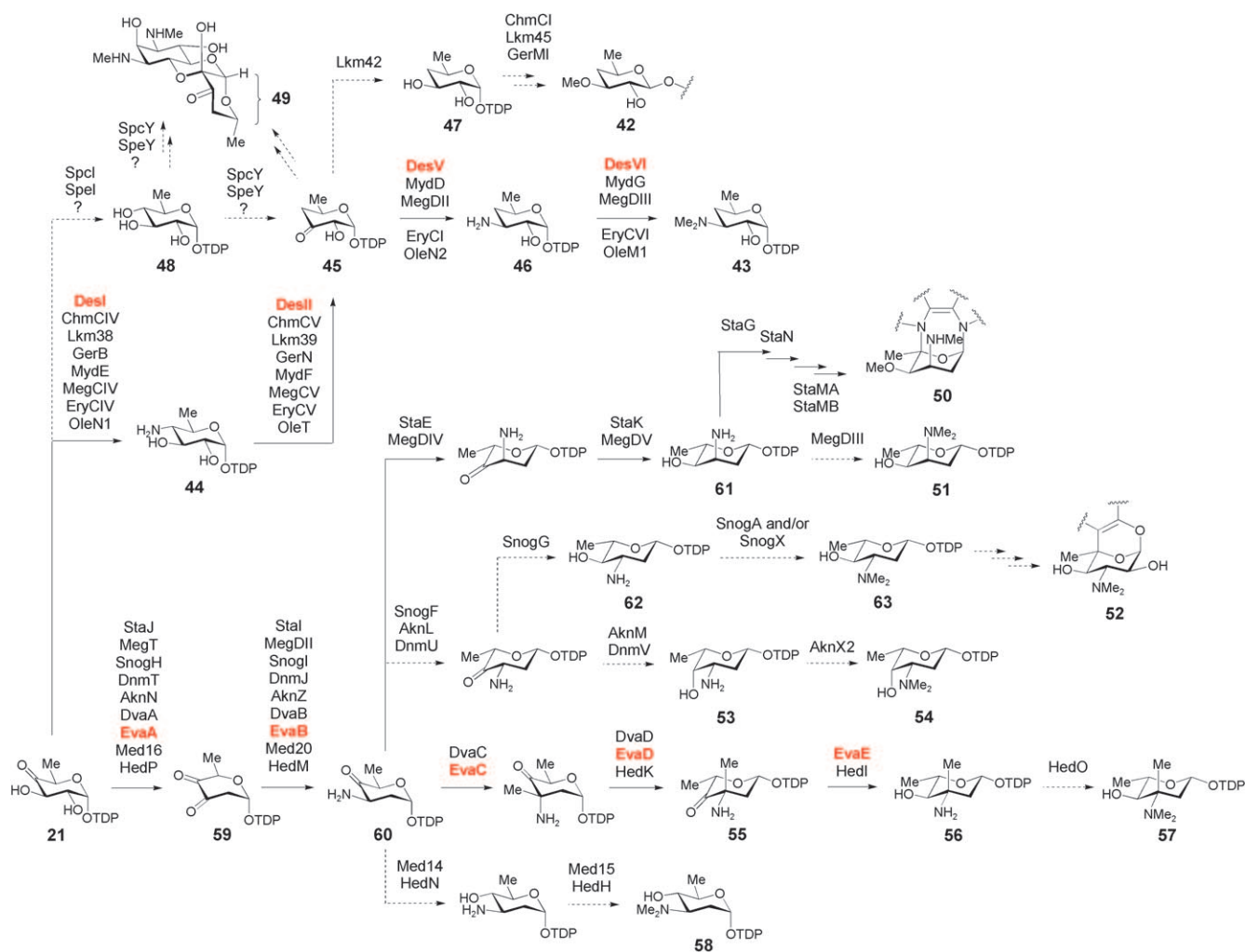
Mehrere der Glycosylierung nachgeschaltete Schritte zur Modifizierung der L-Novioseinheit (30) der Aminocoumarin-Antibiotika sind durch Gendisruption und biochemische In-vitro-Methoden untersucht worden.^[42–45] In der Biosynthese von Novobiocin modifiziert die Carbamoyltransferase NovN die C-3-Hydroxygruppe der L-Noviose, wonach dann die *O*-Methyltransferase NovP die C-4-Hydroxygruppe aktiviert, um den Zucker zu vervollständigen.^[44] In der Biosynthese von Clorobiocin und Coumermycin erfolgt vermutlich zuerst die 4-*O*-Methylierung, die durch CloP/CouP katalysiert wird. Die 5-Methyl-2-pyrrolylcarbonyl-Einheit wird dann durch die Acyltransferase CloN7/CouN7 vom Peptidyl-

Trägerprotein (PCP) CloN1/CouN1 auf die 3-Position der gebundenen 4-*O*-Methyl-L-noviose übertragen.^[43,45]

Die Zucker D-Mycinoose (38) und D-Mycaminose (41) treten in den Strukturen mehrerer Makrolidantibiotika einschließlich Tylosin, Chalcomycin, Dihydrochalcomycin und Mycinamicin auf. Tylosin trägt beide Zucker, während Chalcomycin, Dihydrochalcomycin und Mycinamicin nur den Zucker 38 tragen. Die Biosynthesegencluster für 38 und 41 wurden sequenziert,^[46–50] und neuere genetische und biochemische Studien an den Tylosin- und Dihydrochalcomycin-Systemen haben die Reaktionswege für die Bildung beider Zucker vollständig etabliert.^[47,51–55] Die Schlüsselzwischenstufe beim Aufbau von 38, die TDP-6-Desoxy-D-allose (37), wird aus 21 durch Epimerisierung am C-3 durch die RmlC-Homologen GerF/TylJ/ChmJ/MydH und nachfolgende Kettoreduktion am C-4 durch GerKI/TylD/ChmD/MydI synthetisiert. Wie eine neuere In-vitro-Studie bestätigte, wird bei Inkubationen von 21 mit den gereinigten Dihydrochalcomycin-Biosyntheseeenzymen GerF und GerKI als einziges Produkt 37 gebildet.^[47] Wahrscheinlich liegt in den Tylosin-, Chalcomycin- und Mycinamicin-Wege eine ähnliche Reaktionsfolge vor. Die *O*-Methylierung der beiden Hydroxygruppen geschieht nach dem Glycosyltransfer und wird von GerMII, MIII und Tyl/Chm/MycE, F katalysiert. Während der Tylosinbiosynthese wird TDP-D-Mycaminose (41) in drei Schritten aus 21 aufgebaut: 3,4-Ketoisomerisierung durch Tyl1a zur TDP-3-Keto-6-desoxy-D-glucose (39), Aminotransfer durch TylB zu 40 und *N,N*-Dimethylierung durch TylM1 unter Bildung von 41. Die Funktionen von Tyl1a,^[54] TylB^[53] und TylM1^[52] wurden alle biochemisch mit gereinigten Enzymen nachgewiesen.

2.2.2. Gruppe II: 4,6-Didesoxy-, 3-Amino-3,4,6-tridesoxy- und 3-Amino-2,3,6-tridesoxyzucker

Die Zucker D-Chalcoose (42) und D-Desosamin (43) sind Bestandteil vieler Makrolid-Antibiotika (Schema 5). Von denjenigen Makroliden, deren Gencluster sequenziert wurden, enthalten Lankamycin,^[56] Chalcomycin^[50] und Dihydrochalcomycin^[46] D-Chalcoose, während Erythromycin,^[57] Oleandomycin,^[58–60] Mycinamicin,^[49] Methymycin/Pikromycin^[61] und Megalomicin^[62,63] D-Desosamin als Bestandteil haben. Frühe Geninaktivierungsexperimente mit dem Erythromycinproduzenten *Saccharopolyspora erythraea* ergaben mehrere mögliche Wege für die Bildung von TDP-D-Desosamin (43).^[57,64–66] Spätere genetische und biochemische Untersuchungen des Methymycin/Pikromycin-Systems aus *Streptomyces venezuelae* bewiesen klar, dass 43 in vier Stufen aus 21 biosynthetisiert wird.^[67–70] Wie in Schema 5 skizziert, wird die Reaktion durch den DesI-katalysierten C-4-Aminotransfer zur Bildung von 44 eingeleitet, danach folgen die oxidative Desaminierung durch DesII zu 45, die C-3-Transaminierung durch DesV zu 46 und die 3-*N,N*-Dimethylierung durch DesVI zu 43.^[67–69] Die von DesII (44 → 45), einem Mitglied der Radikal-SAM-Superfamilie, katalysierte Reaktion ist einzigartig in der Zuckerbiosynthese. DesI und DesII führen gemeinsam die C-4-Desoxygenierung von 21 zur TDP-3-Keto-4,6-didesoxy-D-glucose (45) aus.^[70–72]



Schema 5. Biosynthese von TDP-Zuckern der Gruppe II. Zu den extrem seltenen TDP-4,6-Didesoxyzuckern gehören TDP-D-Desosamin (43), TDP-D-Chalcomycin (47) und Actinospectose (49). Die meisten der Zucker in Gruppe II sind 3-Amino-2,3,6-tridesoxyzucker (50–58 und 60–63), die eine Reaktionssequenz aus 2-Dehydratisierung und 3-Aminotransfer (21 → 59 → 60) gemeinsam haben.

Homologe von DesI, DesII, DesV und DesVI kommen in den Biosynthesewegen von Erythromycin, Oleandomycin, Mycinamicin und Megalomycin vor, und es wird angenommen, dass sie jeweils die gleichen Reaktionen in der Biosynthese von D-Desosamin (43) katalysieren. Während die Biosynthese von 43 jetzt vollständig aufgeklärt ist, bleibt die Biosynthese von Chalcomycin (42) unerforscht. In den Genclustern von Lankamycin, Chalcomycin und Dihydrochalcomycin sind jedoch Gene vorhanden, die für Homologe von DesI und DesII codieren, was darauf hindeutet, dass die C-4-Desoxygenierung bei der Bildung von Chalcomycin (42) in analoger Weise geschieht wie in der Desosamin-Biosynthese (21 → 44 → 45). Die Umwandlung von 45 zur TDP-4,6-Didesoxy-D-glucose (47) erfordert eine 3-Ketoreduktase. Ein für die Ketoreduktase von NDP-Zuckern codierendes Gen, *lkm42*, existiert im Lankamycin-Gencluster, fehlt aber in den Chalcomycin- und Dihydrochalcomycin-Genclustern. In den beiden letzteren Fällen könnten die entsprechenden Gene anderswo in den Genomen von *Streptomyces bikiniensis* oder *Streptomyces* sp KCTC 0041BP verschlüsselt sein. Die O-Methylierung am C-3, die zu 42 führt, geschieht wahr-

scheinlich nach dem Glycosyltransfer und kann in der Biosynthese von Chalcomycin, Lankomycin und Dihydrochalcomycin von ChmCI/Lkm45 bzw. GerMI katalysiert werden.

Das Aminoglycosid-Antibiotikum Spectinomycin, das von *Streptomyces flavopersicus* und *Streptomyces spectabilis* produziert wird, enthält eine seltene 3-Keto-4,6-didesoxyglucose-Einheit, die als Actinospectose (49) bekannt ist. Aus diesen beiden Stämmen sind partielle Gencluster für die Spectinomycin-Biosynthese^[73] isoliert worden. Beide Cluster enthalten Gene für die Glucose-1-phosphatthymidyl-Transferase und die TDP-Glucose-4,6-Dehydratase (*spcK* bzw. *spcI* in *S. flavopersicus* und *spcD* bzw. *spcE* in *S. spectabilis*). Die Aktivität von *SpcE* wurde in vitro nachgewiesen,^[73] was auf TDP-Glucose als Vorstufe im Actinospectose-Biosyntheseweg hinweist. Obwohl der Mechanismus der C-4-Desoxygenierung nicht offensichtlich ist, codieren beide Spectinomycin-Cluster für ein mutmaßliches Radikal-SAM-Enzym (SpcY in *S. flavopersicus* und SpeY in *S. spectabilis*), das an der Bildung von TDP-Actinospectose (45) mitwirkt. Daher ist eine Biosyntheseroute zu 49 denkbar, die über eine

durch das SDR-Enzym *SpcI/SpeI* katalysierte 4-Ketoreduktion von **21** zu **48** mit nachfolgender oxidativer Dehydroxylierung durch *ScpY/SpeY* verläuft. Der vorgeschlagene Mechanismus (**21** → **48** → **45**) entspricht dem des C-4-Desoxygenierungsschritts, der von *DesI/DesII* in der D-Desosamin-Biosynthese durchgeführt wird. Interessanterweise zeigen *SpcY* und *SpeY* keine nachweisbare Sequenzidentität mit *DesII*.

Die Verbindungen **50–58** sind Vertreter der 3-Amino-2,3,6-tridesoxyzucker, deren Gencluster sequenziert wurden. Jeder Gencluster codiert für eine 2,3-Dehydratase und eine 3-Aminotransferase, die jeweils die C-2-Desoxygenierung von **21** zur TDP-3,4-Diketo-2,6-didesoxy-D-glucose (**59**) bzw. den nachfolgenden C-3-Aminotransfer unter Bildung von TDP-3-Amino-4-keto-2,3,6-tridesoxy-D-glucose (**60**) katalysieren. Die weiteren, von **60** ausgehenden Biosynthesewege verwenden spezifische Kombinationen aus Epimerisierungen, stereospezifischen C-4-Ketoreduktionen und C- und/oder N-Methyltransfers, um die jeweiligen TDP-Zucker zu synthetisieren. Zum Beispiel wird die Schlüsselzwischenstufe **61** in der Biosynthese von 3-N-Methyl-4-O-methyl-L-ristosamin (**50**) – der Zuckerkomponente des Indolocarbazol-Antibiotikums Staurosporin – über eine *StaE*-katalysierte C-5-Epimerisierung von **60** und anschließende *StaK*-katalysierte C-4-Ketoreduktion gebildet. Der Transfer von L-Ristosamin zum Aglycon durch *StaG* ist der nächste Schritt, auf den die Vernetzung zwischen dem C-5 des Ristosamins und dem Indolstickstoff des Aglycons folgt, die durch *StaN*, ein P450-Enzym, vermittelt wird. Die abschließenden 3-N- und 4-O-Methylierungen, die zum Staurosporin führen, werden von *StaMA* bzw. *StaMB* katalysiert.^[74] Die erfolgreiche Rekonstitution der Staurosporin-Biosynthese in heterologen Wirten liefert Beweise, die den vorgeschlagenen Reaktionsweg für **50** stützen.^[74,75]

Die Biosynthese von L-Megosamin (**51**) im Makrolid-Antibiotikum Megalomycin wird als analog zum TDP-L-Ristosamin (**61**) angenommen und umfasst die C-5-Epimerisierung von **60** (*MegDIV*), die C-4-Ketoreduktion des entstandenen L-Zuckers (*MegDV*) und die 3-N,N-Dimethylierung der Zwischenstufe **61** (*MegDIII*) zum TDP-L-Megosamin (**51**).^[63] Megalomycin enthält zwei 3-N,N-Dimethylaminosucker, D-Desosamin (**43**) und L-Megosamin, doch der Gencluster enthält nur ein Aminotransferase- (*megDII*) und ein Dimethyltransferase-Gen (*megDIII*). Die codierten Enzyme katalysieren wahrscheinlich die entsprechenden Schritte in beiden Zuckerbiosynthesewegen.^[62]

Die Zucker L-Nogalamin (**52**),^[22] L-Daunosamin (**53**)^[76] und L-Rhodosamin (**54**)^[77] treten in den Anthracyclin-Antibiotika Nogalamycin, Daunorubicin bzw. Aclarubicin auf. Ihre gemeinsame Vorstufe ist die Glucose **60**, die in jedem Reaktionsweg eine 3,5-Epimerisierung und eine stereospezifische Ketoreduktion eingeht. Die C-4-Hydroxygruppe von TDP-L-Acosamin (**62**), die durch die aufeinanderfolgende Aktivität von *SnogF* und *SnogG* gebildet wird, ist äquatorial, während die von TDP-L-Daunosamin (**53**) axial steht. Diese Zucker können 3-N,N-dimethyliert werden und führen zu TDP-2-Desoxy-L-nogalamin (**63**), dem Zuckerdonor in der Nogalamycin-Biosynthese, oder zu TDP-L-Rhodosamin (**54**), dem Zuckerdonor in der Aclarubicin- und Rhodomycin-

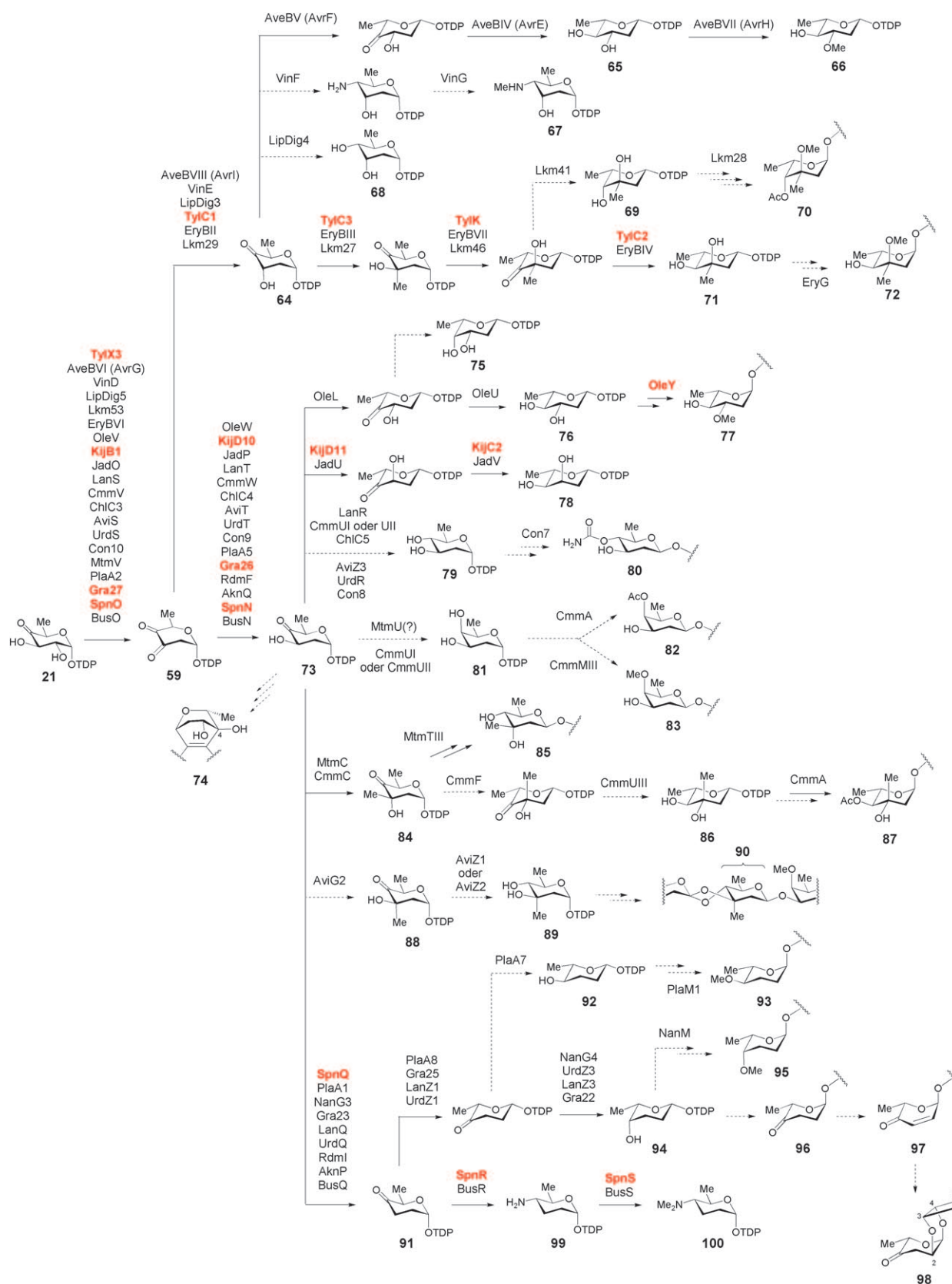
Biosynthese. Sobald die Übertragung auf das Aglycon erfolgt ist, wird das C-5 von 2-Desoxy-L-nogalamin (**63**) mit dem Aglycon verknüpft und durch Rehydroxylierung am C-2 das Endprodukt gebildet.^[22] Die Identität der zuständigen Enzyme bleibt unklar, ebenso wie der Zweck der Desoxygenierung und erneuten Hydroxylierung am C-2 der Zuckereinheit.

Die 3-Amino-2,3,6-tridesoxyzucker, TDP-4-Oxo-L-vancosamin (**55**) und TDP-L-Eremosamin (**56**), sind Zwischenstufen in der Biosynthese der Antibiotika Balhimycin^[78] bzw. Chloroeremomycin^[79] vom Vancomycin-Typ. TDP-3-N,N-Dimethyl-L-eremosamin (**57**) und TDP-D-Angolosamin (**58**) sind die beiden Zuckerdonoren in der Biosynthese von Hedamycin.^[80] Zucker **58** ist auch an der Biosynthese des Benzoisochromanchinon-Antibiotikums Medermycin beteiligt.^[81] Die vollständige Biosynthese von **56** ausgehend von **21** ist durch biochemische Analyse der beteiligten Enzyme aufgeklärt worden.^[82] Das Schlüsselintermediat **55**, das Substrat für den Glycosyltransfer im Balhimycin-Weg, wird aus **60** durch C-3-Methylierung und anschließende 5-Epimerisierung erhalten. Spätere C-4-Ketoreduktion von **55** ergibt **56**, den Zuckerdonor in der Biosynthese von Chloroeremomycin. Es ist ungewöhnlich, dass ein Ketozucker wie **55** als Substrat für eine Glycosyltransferase fungiert. Die Untersuchung des Balhimycin-Genclusters zeigt jedoch ein inaktives 4-Ketoreduktase-Gen, *dvaE*, das wahrscheinlich an einer Stelle die Umwandlung von **55** zu **56** im Balhimycin-produzierenden Stamm katalysierte. Zusammen mit der weitgehenden Konservierung zwischen den Balhimycin- und Chloroeremomycin-Clustern lässt dies auf eine enge evolutionäre Verwandtschaft zwischen den beiden Reaktionswegen schließen.^[83]

L-Vancosamin, das C-4-Epimer von L-Eremosamin (**56**), ist eine Komponente des Glycopeptid-Antibiotikums Vancomycin. Obwohl noch keine Analyse der Biosynthesegene von L-Vancosamin beschrieben wurde, nimmt man an, dass die Bildung von TDP-L-Vancosamin identisch zu der von **56** verläuft, außer dass die Stereochemie der C-4-Ketoreduktion umgekehrt wird. Ebenso kann das TDP-3-N,N-Dimethyl-L-eremosamin (**57**) in der Hedamycin-Biosynthese in gleicher Weise wie **56** durch die jeweiligen *Hed*-Biosynthesenzyme gebildet werden, aber mit einem zusätzlichen, *HedO*-katalysierten Dimethylierungsschritt, um **56** in **57** zu überführen.^[80] TDP-D-Angolosamin (**58**), dessen Gene sowohl im Hedamycin- als auch im Medermycin-Gencluster identifiziert wurden, wird vermutlich in zwei Schritten aus **60** synthetisiert: 4-Ketoreduktion durch *Med14/HedN* und 3-N,N-Dimethyltransfer durch *Med15/HedH*.^[80,81]

2.2.3. Gruppe III: 2,6-Didesoxy-, 4-Amino-2,4,6-tridesoxy-, 2,3,6-Tridesoxy- und 4-Amino-2,3,4,6-tetradeseoxyzucker

TDP-2,6-didesoxyzucker und ihre Derivate, die durch 2,3-Dehydratisierung von **21** und nachfolgende 3-Ketoreduktion entstehen, machen den Großteil der in Naturstoff-Biosynthesewegen verwendeten TDP-Zucker aus (Schema 6). Die Enzyme, die die 2,3-Dehydratisierung von **21** zu **59** in jedem dieser Reaktionswege katalysieren, sind homolog zu denen, die die gleiche Reaktion in der Biosynthese der 3-Amino-2,3,6-tridesoxyzucker (siehe Schema 5) beschleunigen. Diese



Schema 6. Biosynthese von TDP-Zuckern der Gruppe III. Diese größte Gruppe der TDP-Desoxyzucker hat gemeinsam, dass am Anfang der Biosynthesewege 2-Dehydratisierungen ($21 \rightarrow 59$) und 3-Ketoreduktionen ($59 \rightarrow 64$ oder $59 \rightarrow 73$) auftreten. **64** wurde als Vorstufe der TDP-Zucker **66–72** vorgeschlagen, während sich mehrere 2,6-Didesoxyzucker (**75–90**), 2,3,6-Tridesoxyzucker (**91–98**) und ein TDP-4-Amino-2,3,4,6-tetradesoxyzucker (**100**) mutmaßlich von **73** ableiten.

Gruppe der TDP-Zucker kann abhängig von der Konfiguration ihrer 3-OH-Gruppe (siehe **64** und **73**) in zwei Untergruppen weiter unterteilt werden. Interessanterweise sind alle Enzyme für die axiale und die äquatoriale 3-Ketoreduktion NAD(P)H-abhängige Reduktasen, zeigen aber keine nachweisbare Sequenzähnlichkeit, wodurch ihre codierenden Gene leicht zu unterscheiden sind.

TDP-D-Vicenisamin (**67**), TDP-D-Digitoxose (**68**), 4-*O*-Acetyl-L-arcanose (**70**), TDP-L-Mycarose (**71**) und L-Cladinose (**72**) haben alle eine axiale 3-OH-Gruppe und leiten sich von der TDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-allose (**64**) ab, die aus **21** durch 2,3-Dehydratisierung und anschließende 3-Ketoreduktion synthetisiert wird. Die Enzyme für diese beiden Reaktionen (**21** → **59** → **64**) in der Biosynthese von **71** (TylX3 bzw. TylC1) sind in vitro charakterisiert worden.^[84] Verbindung **66**, der Zuckerdonor im Biosyntheseweg von Avermectin,^[85] wird aus **64** in drei Schritten erhalten: 5-Epimerisierung durch AveBV (AveF), 4-Ketoreduktion durch AveBIV (AveE) und 3-*O*-Methylierung durch AveBVII (AveH). Durch heterologe Expression des vollständigen Enzymsatzes wurde die vorgeschlagene Route zu **66** untermauert.^[86] Obwohl die genaue Reihenfolge der Schritte unbekannt bleibt, lassen aktuelle Daten darauf schließen, dass der 3-*O*-Methyltransfer eher auf der Stufe der TDP-L-Olivose (**65** → **66**) stattfindet und nicht als separater Schritt.^[87]

TDP-D-Vicenisamin (**67**), der Zuckerdonor für die Biosynthese des Makrolactam-Antibiotikums Vicenistatin in *Streptomyces halstedii*, entsteht vermutlich durch C-4-Transaminierung von **64** durch VinF und nachfolgende N-Monomethylierung durch VinG.^[88] Der Zucker **67** ist der einzige 4-Amino-2,4,6-tridesoxyzucker, dessen Biosynthesegene identifiziert wurden, und er ist ein seltenes Beispiel für einen *N*-monomethylierten Aminozucker. Der Gencluster für die Bildung von Lipomycin, das D-Digitoxose (**68**) enthält, wurde in *Streptomyces aureofaciens* lokalisiert.^[89] Dieser ungewöhnliche Zucker wird durch C-4-Ketoreduktion von **64** durch LipDig4 gebildet. Die Zucker 4-*O*-Acetyl-L-arcanose (**70**), TDP-L-Mycarose (**71**) und das *O*-methylierte L-Mycarosederivat L-Cladinose (**72**) werden aus **64** über ähnliche Biosyntheserouten gebildet. Der Biosyntheseweg für **71**, der Teil des Tylosin-Wegs von *Streptomyces fradiae* ist, ist in vitro vollständig charakterisiert worden.^[90–92] Verbindung **64** wird durch die SAM-abhängige Methyltransferase TylC3 3-*C*-methyliert. Danach epimerisiert TylK C-5 und TylC2 reduziert C-4 unter Bildung von **71**. In der Erythromycin-Biosynthese wird L-Cladinose (**72**) über 3-*O*-Methylierung von L-Mycarose durch EryG gebildet, nachdem diese von **71** auf das Makrolacton übertragen worden ist. Die im Erythromycin-Weg gefundenen Homologen zu den Enzymen der Biosynthese von **71** müssen identische Reaktionen wie ihre Gegenstücke im Tylosin-Weg katalysieren.

Der Biosyntheseweg für 4-*O*-Acetyl-L-arcanose (**70**), das im Makrolid-Antibiotikum Lankamycin aus *Streptomyces rochei* vorkommt, wird als analog zu dem von **71** angenommen.^[56] Tatsächlich wurden im Lankamycin-Gencluster Gene mit hoher Sequenzidentität (40–75 %) zu den Biosynthesegenen von **71** gefunden, was im Einklang ist mit einem Weg, in dem alle Reaktionen (außer der abschließenden 4-Ketoreduktion) denen der Biosynthese von **71** gleichen. Die 4-Ke-

toreduktion durch Lkm41 würde das C-4-Epimer von **71**, TDP-L-Axenose (**69**), liefern – ein geeignetes Substrat für den Glycosyltransfer. 3-*O*-Methylierung, möglicherweise durch Lkm28, und 4-*O*-Acetylierung durch ein unbekanntes Enzym würden die Biosynthese von **70** abschließen.

2-Desoxy-L-fucose (**75**), L-Oleandrose (**77**), L-Digitoxose (**78**), D-Olivose (**79**), 4-*O*-Carbamoyl-D-olivose (**80**), D-Oliose (**81**), 4-*O*-Acetyl-D-olivose (Chromose D, **82**), 4-*O*-Methyl-D-olivose (Chromose A oder Olivomose, **83**), D-Mycarose (**85**), L-Chromose B (oder Olivomycose, **87**) und 2-Desoxy-D-olivose (**90**) sind alle 2,6-Didesoxyzucker, die zumeist eine äquatoriale 3-OH-Gruppe tragen. Sie werden aus TDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose (**73**) biosynthetisiert, das aus **21** durch 2,3-Dehydratisierung und anschließende stereospezifische 3-Ketoreduktion erhalten wird. Verbindung **73** wurde als Substrat für den Glycosyltransfer in der Biosynthese von Mithramycin, einem Antitumormittel, und Granaticin, einem Benzoisochromanchinon-Antibiotikum, vorgeschlagen. Granaticin enthält einen ungewöhnlichen Aryl-C-L-olivosyl-Rest (**74**), der wahrscheinlich unter Verwendung von **73** als Zuckerdonor durch oxidative Vernetzung zwischen dem Aglycon und dem C-4-Carbonylkohlenstoff des Zuckerrests gebildet wird.^[93]

Eine Mutante von *Streptomyces argillaceus*, in der ein C-Methyltransferasegen (*mtmC*) inaktiviert war, produzierte Mithramycinderivate mit einer 4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose-Einheit (vermutlich von **73** abgeleitet) anstelle von D-Olivose (siehe **79**). Seltsamerweise stellte die heterologe Expression von *mtmC* in dieser Mutante die Produktion von Mithramycin wieder her.^[94] In einer späteren Studie schlugen die Autoren vor, dass das MtmC-Protein vorhanden sein muss und mit einer ebenfalls im Cluster codierten 4-Ketoreduktase (entweder MtmTI oder MtmTII) in Wechselwirkung tritt.^[95] Diese 4-Ketoreduktase könnte **73** nach dessen Transfer zum Mithramycin-Aglycon reduzieren.

2-Desoxy-L-fucose (siehe **75**) ist eine Zuckerkomponente der Anthracyclin-Antibiotika Aclarubicin (Aclacinomycin) und Rhodomycin und wird wahrscheinlich als TDP-2-Desoxy-L-fucose (**75**) in zwei Schritten (3,5-Epimerisierung und 4-Ketoreduktion) aus **73** synthetisiert. Obwohl die Gencluster für Aclarubicin^[77] und Rhodomycin^[96] teilweise sequenziert worden sind, sind Gene für diese Aktivitäten noch in keinem Gencluster zugeordnet worden. L-Oleandrose (**77**) kommt im Makrolid-Antibiotikum Oleandomycin aus *Streptomyces antibioticus* und in Avermectin aus *Streptomyces avermitilis* vor. Interessanterweise wird L-Oleandrose in diesen beiden Biosynthesewegen über verschiedene Routen aufgebaut. Über heterologe Expression der Oleandomycin-Biosynthesegene^[97] wurde gezeigt, dass **77** aus **73** gebildet wird: 3,5-Epimerisierung (OleL) und 4-Ketoreduktion (OleU) liefern TDP-L-Olivose (**76**), den Donor für den Glycosyltransfer. Die 3-*O*-Methylierung durch OleY geschieht nach der Zuckerbindung, was in vitro bestätigt wurde.^[98] Dies unterscheidet sich von der Biosynthese von L-Oleandrose im Avermectin-Weg, wo TDP-L-Oleandrose (**66**) aus **64** über 5-Epimerisierung, 4-Ketoreduktion und 3-*O*-Methylierung am Nucleotidzucker vor dem Glycosyltransfer gebildet wird.^[86]

TDP-L-Digitoxose (**78**) ist die Vorstufe für die L-Digitoxose-Einheit, die in den durch *Streptomyces venezuelae*

ISP5230 und *Actinomadura kijaniata* produzierten Antibiotika Jadomycin bzw. Kijanimicin vorkommt. Studien an gereinigten Zuckerbiosyntheseenzymen aus *A. kijaniata* haben den Syntheseweg für TDP-L-Digitoxose (**78**) vollständig aufgeklärt. Die Umwandlung von **21** in **73** wird durch KijB1 und KijD10 katalysiert und die Umwandlung von **73** in **78** durch die 5-Epimerase KijD11 und die 4-Ketoreduktase KijC2.^[99] Die gleichen Funktionen werden den zu KijD11 und KijC2 analogen Enzymen JadU und JadV in der Biosynthese von Jadomycin zugeschrieben.^[100] Die TDP-D-Olivose (**79**) ist ein verbreiteter Zuckerdonor, der in den Biosynthesen vieler Naturstoffe vorkommt, einschließlich Landomycin,^[101] Urdamycin,^[102] Mithramycin,^[103] Chromomycin,^[104] Chlorothricin,^[105] Avilamycin^[106] und Concanamycin.^[107] Die Biosynthesegencluster für diese Verbindungen sind identifiziert worden. Gene, die für Enzyme für die Umwandlung von **21** zu **79** codieren, wurden in jedem Cluster, außer dem von Mithramycin, festgestellt. Im Concanamycin-Gencluster wurde auch eine mutmaßliche Carbamoyltransferase, Con7, zugeordnet, die die 4-O-Carbamoylierung von TDP-D-Olivose (**79**) zu **80** katalysiert. Diese Reaktion könnte vor oder nach dem Glycosyltransfer stattfinden.

TDP-D-Oliose (**81**) ist die vermutete Vorstufe für die D-Oliose-Einheit in Mithramycin und die Chromose-D- und Olivomose-Reste in Chromomycin. Ergebnisse aus Gendisruptionstudien am Mithramycin-Produzenten *Streptomyces argillaceus* lieferten indirekte Beweise, dass MtmU als die 4-Ketoreduktase fungiert, die **73** in **81** umwandelt.^[94] MtmU zeigt jedoch eher Sequenzidentität (ca. 50 %) mit 3-Ketoreduktasen als mit 4-Ketoreduktasen. Wenn die für MtmU vorgeschlagene Aktivität zutreffend ist, wäre dies ein interessantes Beispiel für Regiopromiskuität eines Zuckerbiosyntheseenzym. Der Chromomycin-Gencluster codiert für zwei Homologe der 4-Ketoreduktase, CmmUI und CmmUII, von denen eines die Umwandlung von **73** zu **81** katalysieren sollte. Die 4-O-Acetylierung und 4-O-Methylierung der beiden D-Oliose-Einheiten von Chromomycin zu Chromose D (**82**) bzw. Olivomose (**83**) können von CmmA bzw. CmmMIII katalysiert werden, und beide Umsetzungen erfolgen wahrscheinlich nach dem Glycosyltransfer.^[104]

Mithramycin und Chromomycin enthalten auch D-Mycarose (**85**) und Olivomycose (**87**), die sich beide von **73** durch 3-C-Methylierung ableiten. Nach Geninaktivierungsstudien wurde diese Funktion der Methyltransferase MtmC in *S. argillaceus* zugeschrieben.^[94] Das im Chromomycin-Gencluster codierte homologe CmmC hat vermutlich die gleiche Funktion. Die resultierende Verbindung, TDP-4-Keto-D-mycarose (**84**), kann im Mithramycin-Weg als Substrat beim Glycosyltransfer verwendet werden, da die Disruption des für die C-4-Reduktase MtmTIII codierenden Gens zu Mithramycinderivaten führte, die eine 4-Keto-D-mycarose-Einheit (**84**) anstelle von **85** tragen.^[95] Die Olivomycose-Einheit (**87**) von Chromomycin wird voraussichtlich aus **84** durch 5-Epimerisierung und 4-Ketoreduktion unter Bildung von TDP-L-Chromose (**86**) und nachfolgend durch Glycosyltransfer und 4-O-Acetylierung aufgebaut. Es ist möglich, dass die 4-O-Acetylierung – wie im vorgeschlagenen Weg für **82** – ebenfalls von CmmA katalysiert wird.^[104]

Die 2-Desoxy-D-avalose-Einheit (**90**) der Heptasaccharidkette von Avilamycin A stammt vermutlich aus **73**, das durch 3-C-Methylierung (AviG2) **88** ergibt. Dieser Methylierungsschritt ist identisch zur TylC3/EryBIII/Lkm27/MtmC/CmmC-Reaktion. In der AviG2-katalysierten Reaktion bleibt jedoch die Konfiguration der 3-OH-Gruppe erhalten, während sie sich in den TylC3/EryBIII/Lkm27/MtmC/CmmC-katalysierten Reaktionen umkehrt. Im Anschluss an die C-Methylierung wird eine 4-Ketoreduktion durch AviZ1 oder AviZ2 erwartet, um TDP-2-Desoxy-D-avalose (**89**) zu bilden.^[106] Nach dem Glycosyltransfer wird eine Orthoesterbindung zwischen der 2-Desoxy-D-avalose-Einheit und dem benachbarten D-Olivose-Rest geknüpft. Dieser Schritt kann durch eines der drei im Avilamycin-Gencluster codierten Nicht-Häm-Eisenenzyme (AviO1, AviO2 oder AviO3) katalysiert werden.

Eine andere von **73** abstammende Untergruppe von TDP-Zuckern sind die 2,3,6-Tridesoxyzucker wie TDP-L-Amicetose (**92**) und TDP-L-Rhodinose (**94**) sowie der 4-Amino-2,3,4,6-tetradesoxyzucker TDP-D-Forosamin (**100**). Der Schlüsselschritt in ihrer Biosynthese ist die C-3-Desoxygenierung von **73** zum Intermediat TDP-4-Keto-2,3,6-tridesoxy-D-glucose (**91**).^[108] In der Biosynthese des Terpen-Antibiotikums Phenalinolacton, das eine 4-O-Methyl-L-amicetose-Einheit (**93**) trägt, wird Verbindung **92** als Zuckerdonor angenommen. Ein Reaktionsweg bestehend aus einer 3-Desoxygenierung durch PlaA1 zu **91**, 5-Epimerisierung durch PlaA8 und 4-Ketoreduktion durch PlaA7 führt wahrscheinlich zu **92**. Ein O-Methyltransfer durch PlaM1, der vermutlich nach dem Glycosyltransfer erfolgt, ergibt **93**.^[109]

L-Rhodinose (siehe **94**), das C-4-Epimer von L-Amicetose (siehe **92**), findet man in Urdamycin,^[102] Landomycin,^[101] Aclarubicin (Aclacinomycin),^[77] Rhodomycin^[96] und Granaticin,^[93] deren Gencluster alle sequenziert worden sind. TDP-L-Rhodinose (**94**) wird biosynthetisch aus **91** durch 5-Epimerisierung und 4-Ketoreduktion gebildet. Die Funktionen der 5-Epimerase (UrdZ1) und der 4-Ketoreduktase (UrdZ3) in der Biosynthese von **94** wurden bewiesen, indem ihre entsprechenden Gene im Urdamycin-Produzenten *Streptomyces fradiae* einzeln zerstört wurden und dieser anschließend keine Urdamycin-Derivate mit L-Rhodinose-Einheiten synthetisieren konnte.^[102] Gene, die für Enzyme dieser beiden Schritte codieren, sind im Landomycin- und im Granaticin-Gencluster bestimmt worden, nicht aber im Rhodomycin- oder im Aclacinomycin-Cluster. Auch im Nanchangmycin-Cluster wird das Epimerase-Gen nicht gefunden. Diese Aktivitäten können an anderer Stelle im Genom codiert sein oder werden im Fall von Rhodomycin und Aclacinomycin durch die promiskuitiven L-Rhodosamin-Biosyntheseenzyme übernommen. Im Polyether Nanchangmycin wird L-Rhodinose nach Anbindung durch NanM zu 4-O-Methyl-L-rhodinose (**95**) methyliert.^[110]

Die Hauptprodukte der Aclacinomycin-Biosynthese, Aclacinomycin A und B, enthalten L-Cinerulose (**96**) bzw. L-Cinerulose B (**98**), während das Nebenprodukt Aclacinomycin N L-Rhodinose (**94**) aufweist. Vorliegende Befunde deuten darauf hin, dass extrazelluläre Oxidasen die L-Rhodinose-Einheit schnell in **96** überführen, das außerhalb der Zelle zu L-Aculose (**97**) und dann zu **98** weiteroxidiert wird.

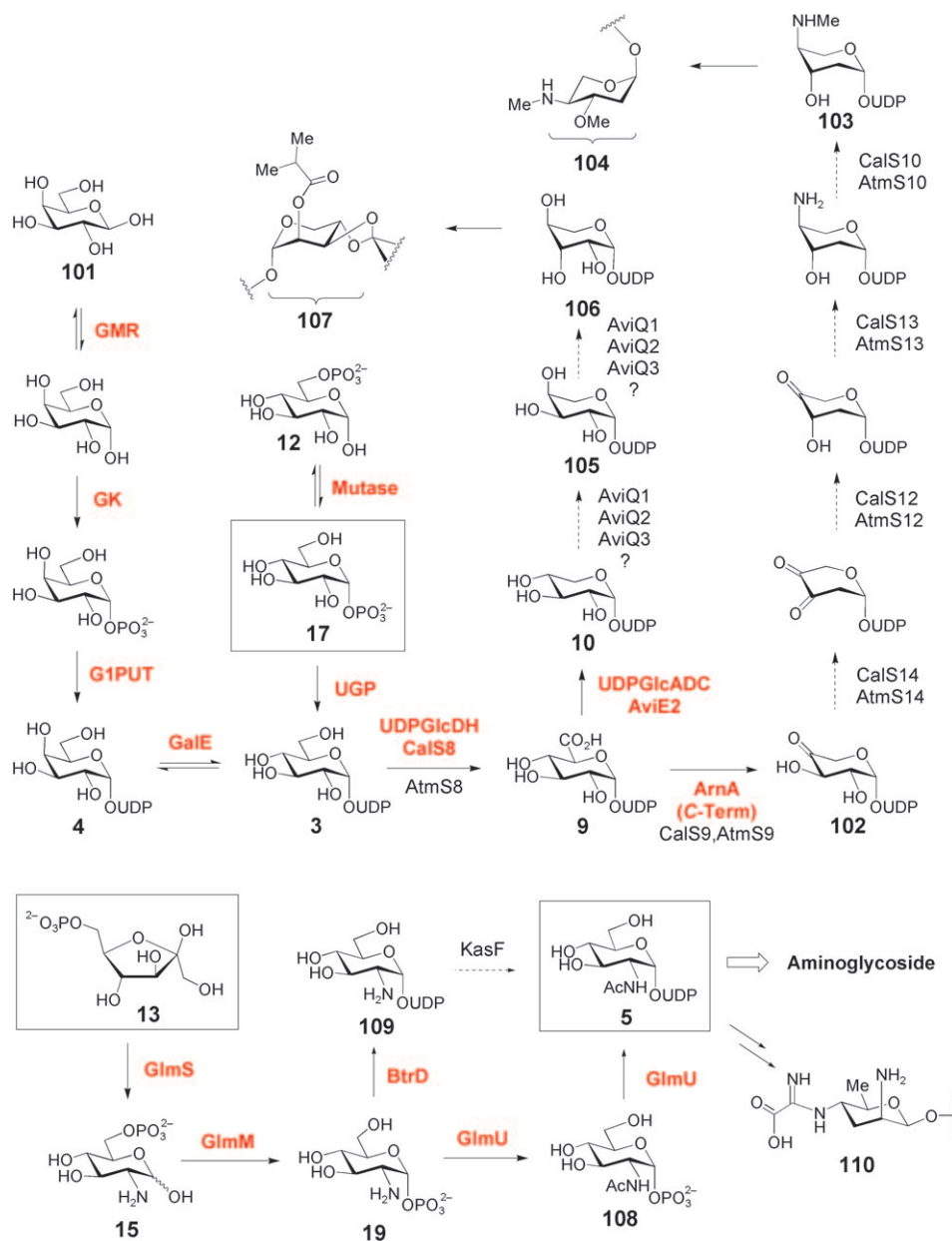
Es existiert auch ein intrazelluläres System, um diese Zwischenstufen von **96** zurück zu reduzieren, aber der Grund für diese Umwandlungen ist nicht ersichtlich.^[111] Der 4-Amino-2,3,4,6-tetradesoxyzucker D-Forosamin (**100**) kommt in den Makrolid-Antibiotika Spinosyn, Butenylspinosyn und Spiramycin vor. Bis jetzt ist dies der am stärksten desoxygenierte Zucker, der in der Natur gefunden wurde. Die Biosynthese von TDP-D-Forosamin (**100**) im Spinosyn-produzierenden Stamm *Saccharopolyspora spinosa* ist in vitro vollständig aufgeklärt worden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SpnQ die 3-Dehydrase ist, die **73** in **91** überführt,^[112] und SpnR wurde als die 4-Transaminase identifiziert, die das SpnQ-Produkt **91** in TDP-4-Amino-2,3,4,6-tetradesoxy-D-glucose (**99**) umwandelt.^[113] Die N₂-Dimethylierung von **99** wird von SpnS katalysiert. Interessanterweise hat SpnQ, anders als das Homologe E₁ (siehe Abschnitt 3.1.5 für eine Besprechung des Mechanismus), keinen zugehörigen Reduktase-partner im Gencluster codiert, sondern nutzt stattdessen allgemeine zelluläre Reduktasen wie Ferredoxin und/oder Flavodoxin für den Elektronentransfer.^[112–114]

2.3. UDP-Zucker

In der Natur gibt es vielfältige UDP-Zucker. Hierzu gehören sechs der neun gewöhnlichen eukaryotischen Zuckerdonoren und viele Zuckerdonoren, die an der Synthese von Polysacchariden bakterieller Zelloberflächen beteiligt sind. Biosynthetisch gliedern sich die UDP-aktivierten Zucker in zwei Gruppen (Schema 7): solche, die sich aus α -D-Glucose-1-phosphat (**17**) über die Glycolysezwischenstufe α -D-Glucose-6-phosphat (**12**) herleiten, und solche, die aus Fructose-6-phosphat (**13**) über UDP-N-Acetyl- α -D-glucosamin (**5**) entstehen. Verbindung **17** wird durch die α -D-Glucose-1-phosphat-Uridylyltransferase (UGP), einem für alle Organismen essenziellen Enzym, in UDP- α -D-Glucose (**3**) umgewandelt. Dagegen sind die vier Enzyme des Leloir-Reaktionswegs, Galactose-Muta-

rotase (GMR), Galaktokinase (GK), Galactose-1-phosphat-Uridylyltransferase (G1PUT) und UDP-Galactose-4-Epimerase (GalE) für die Umwandlung von β -D-Galactose (**101**) in **3** zuständig.

UDP- α -D-Glucuronsäure (**9**) wird durch die NAD⁺-abhängige UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDPGlcDH) aus **3** gebildet. Dieser UDP-Zucker ist ein Baustein für die Kapselpolysaccharide, die für die bakterielle Virulenz entscheidend sind.^[115] Kürzlich wurde gezeigt, dass die UDP-Glucose-Dehydrogenase (CalS8) an der Synthese der Desoxyaminopentose-Einheit (**104**) von Calicheamicin mitwirkt.^[116] Die



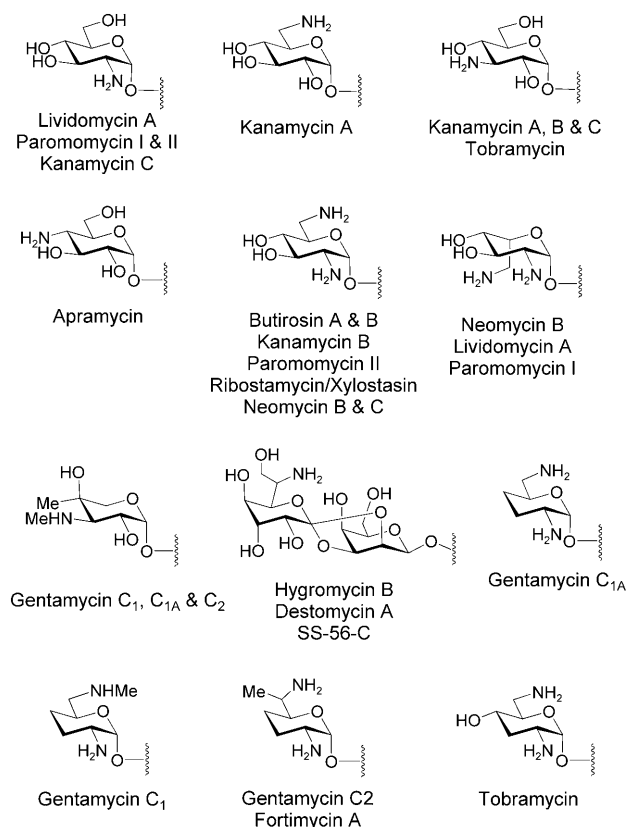
Schema 7. Biosynthese der UDP-Zucker. UDP- α -D-Glucose (**3**) leitet sich entweder von der Glycolysezwischenstufe **12** oder von der β -D-Galactose (**101**) über den Leloir-Weg ab. Die Pentosereste von Calicheamicin (**104**) und Avilamycin (**107**) stammen wahrscheinlich von einer Vorstufe der UDP- α -D-Glucose (**3**). Eine getrennte Gruppe von UDP-Zuckern wird aus der Glycolysezwischenstufe Fructose-6-phosphat (**13**) über UDP-N-Acetyl-D-glucosamin (**5**) erhalten. Verbindung **5** ist wahrscheinlich die Biosynthesevorstufe vieler Aminoglycosidzucker, von denen viele 2-Aminozucker sind (siehe Schema 8).

Bildung der UDP-Didesoxyaminopentose (**103**), die in der Biosynthese von Calicheamicin (Cal) und AT2433 (Atm) verwendet wird, beginnt vermutlich mit der Oxidation von **3** durch Cal/AtmS8 zu **9**, das anschließend oxidativ zu **102** decarboxyliert wird. Danach folgen C-2-Desoxygenierung (Cal/AtmS14), C-3-Ketoreduktion (Cal/AtmS12), C-4-Transaminierung (Cal/AtmS13) und 4-*N*-Monomethylierung (Cal/AtmS10).^[117] Interessanterweise gibt es für die beiden ersten Schritte dieses vorgeschlagenen Reaktionswegs (**3** → **9** → **102**) kein Beispiel in TDP-Zucker-Synthesewegen, während die letzten vier Schritte starke Ähnlichkeit zu Reaktionen aufweisen, die in der TDP-Zucker-Biosynthese verbreitet sind, aber einzigartig bei der Bildung von UDP-Zuckern sind. Es wurde vorgeschlagen, dass einige (z. B. CalS8) oder alle Enzyme in diesem Syntheseweg Pyrimidin nicht diskriminieren und sowohl UDP- als auch TDP-Zucker als Substrate akzeptieren. Dies wird durch eine In-vitro-Analyse von CalS8 bestätigt, die ergab, dass UDP-Glucose (**3**) zwar das bevorzugte Substrat ist, TDP-Glucose aber ebenfalls effizient oxidiert werden kann.^[116]

Für die Biosynthese der von L-Lyxose abstammenden Komponente **107** von Avilamycin in *Streptomyces viridochromogenes* wird die Verbindung **9** durch das SDR-Enzym AviE2, ein zur UDP-Glucuronat-Decarboxylase (oder UDP-Xylose-Synthase) homologes Enzym, in UDP-D-Xylose (**10**) überführt.^[118] Verbindung **10** ist der allgemeine Xylosedonor für die Proteinglycosylierung in Tieren und für die Biosynthese der Zellwandpolysaccharide in Pflanzen und Pilzen sowie der Zelloberflächenpolysaccharide in Bakterien. Mit Ausnahme von AviE2 sind Enzyme, die die Bildung von **10** katalysieren, in keinem anderen Biosyntheseweg von Sekundärmetaboliten in Actinomycetes gefunden worden.^[118] Es wird angenommen, dass **106** durch sequenzielle C-4- und C-3-Epimerisierungen aus **10** gebildet wird. Diese Reaktionen können durch zwei der drei Enzyme aus der SDR-Familie (AviQ1, AviQ2 oder AviQ3) mit unbekannten Funktionen, die im Gencluster codiert sind, katalysiert werden.^[118] Diese Enzymfamilie (Abschnitt 3.2) katalysiert bei verschiedenen NDP-Zuckern die Epimerisierung von Hydroxygruppen an nichtaktivierten C-2-, C-4- und C-6-Positionen. Die Mitwirkung dieser drei mutmaßlichen SDR-Enzyme bei der Synthese von **106** ist noch nicht belegt.

Eine zweite Gruppe von UDP-Zuckern, die in verschiedenen Biosynthesereaktionen verwendet wird, wird aus Fructose-6-phosphat (**13**) über UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin (**5**, Schema 6) erhalten. Im ersten Schritt wird **13** durch die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS) in Glucosamin-6-phosphat (**15**) umgewandelt. In Bakterien wird **15** durch die Phosphoglucosamin-Mutase (GlmM) zu Glucosamin-1-phosphat (**19**) umgesetzt.^[119] Danach folgt der *N*-Acetyltransfer, der von der C-terminalen Domäne von GlmU katalysiert wird und **108** liefert.^[120] Die N-terminale Domäne von GlmU katalysiert den letzten Schritt, der UDP-GlcNAc (**5**) ergibt. Kürzlich wurde im Biosyntheseweg von Butirosin, einem Aminoglycosid-Antibiotikum aus *Bacillus circulans*, eine Nucleotidyltransferase (BtrD) entdeckt, die entweder die Uridylierung oder die Thymidylrierung von **19** zu **109** katalysiert.^[121] In einigen Bakterien könnte die Acetylierung von **109** eine alternative Biosyntheseroute zu **5** liefern.

Die meisten Aminoglycosid-Antibiotika mit von 2-Desoxy-*scyllo*-inosose oder 2-Desoxy-*myo*-inositol abgeleiteten Aglyconen sind mit Aminozuckern vielfältiger Struktur versehen (Schema 8).^[122] Die Biosynthesegencluster für mehrere Mitglieder dieser Aminoglycosidklassen sind identifiziert worden. Dazu gehören Butirosin, Kanamycin, Apramycin, Lividomycin, Paromomycin, Neomycin, Tobramycin, Gentimycin, Ribostamycin, Fortimicin und Kasugamycin.^[122] Da in den meisten dieser Gencluster Nucleotidyltransferasegene fehlen, stammen die für die Biosynthese verwendeten Vorstufen der NDP-Zucker (wie **3** oder **5**, Schema 7) wahrscheinlich aus dem allgemeinen Pool von NDP-Zuckern.^[121, 122] Gene, die für NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen, Oxidoreduktasen und PLP-abhängige Aminotransferasen codieren, sind in diesen Genclustern erwartungsgemäß weitverbreitet. Sie sind vermutlich an der Einführung von Aminogruppen in die Zuckerprodukte über verschiedene Oxidations-/Transaminierungsreaktionen beteiligt. Zum jetzigen Zeitpunkt weiß man jedoch wenig über die Biosynthese dieser Zucker, und in den meisten Fällen ist nicht klar, ob die Biosyntheseenzyme ihre Reaktionen an NDP-Zuckersubstraten ausführen oder ob sie modifizierende Reaktionen nach der Glycosylierung katalysieren. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist der Kasugamin-Rest (**110**, Schema 7) von Kasugamycin, dessen Biosynthesegencluster für mehrere Enzyme mit hoher Homologie zu bekannten UDP- und TDP-Zucker-modifizierenden Enzymen codiert.^[123] Die Aminoglycosidzucker sind reich an atypischen Strukturmerkmalen

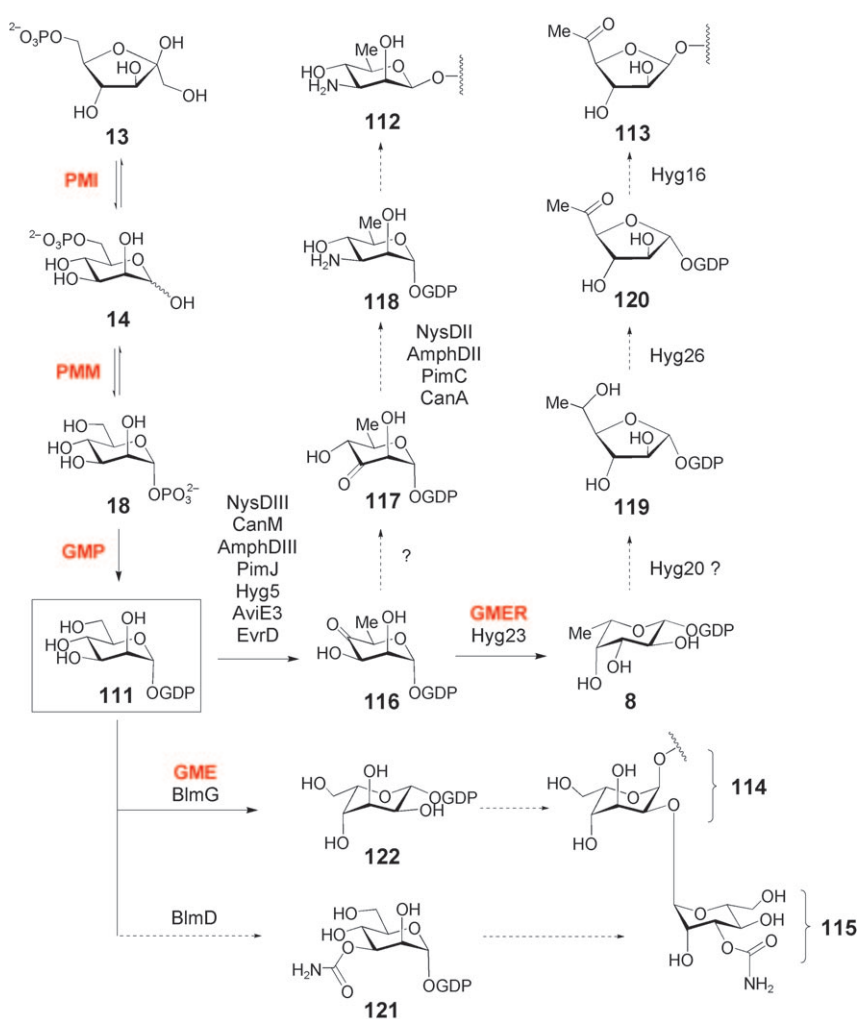


Schema 8. Repräsentative Aminoglycosidzucker. Die Aminozucker-Substituenten vieler Aminoglycoside enthalten ungewöhnliche Modifikationen, deren Biosynthese zumeist nicht gut verstanden ist.

(Schema 8), z.B. ungewöhnlichen Desoxygenierungsmustern wie in Tobramycin, Gentamycin und Fortimycin, den ungewöhnlichen C-Methyl-Seitenketten in Gentamycin und Fortimycin und der axialen Konfiguration der C-5-Aminomethylgruppen in Neomycin B, Lividomycin A und Paromomycin I. Die vorgeschlagenen Mechanismen für einige dieser Modifikationen werden in Abschnitt 3.3 genauer besprochen.

2.4. GDP-Zucker

GDP-aktivierte Zucker (Schema 9) sind allgemein an der Biosynthese von Polysacchariden bakterieller Zelloberflächen und von eukaryotischen Glycanen beteiligt. Die GDP-Mannose (**111**) ist die vorgeschlagene Vorstufe für die Zuckerreste in den Polymakroliden Nystatin, Amphotericin, Pimaricin und Candicidin (die alle D-Mycoamin **112** enthalten), im Aminoglycosid-Antibiotikum Hygromycin A (enthält 5-Dehydro- α -L-fucofuranose **113**) und im Antitumorwirkstoff Bleomycin (enthält L-Gulose **114** und 3-O-Carbamoyl-D-mannose **115**).^[124–126] GDP- α -D-Mannose (**111**) wird aus Fructose-6-phosphat (**13**) durch die Wirkung dreier Enzyme erhalten: Phosphomannose-Isomerase (PMI), die die reversible gegenseitige Umwandlung von **13** und D-Mannose-6-phosphat (**14**) katalysiert, Phosphomannomutase (PMM), die die reversible gegenseitige Umwandlung von **14** und α -D-Mannose-1-phosphat (**18**) katalysiert, und Mannose-1-phosphat-Guananylyltransferase (auch als GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (GMP) bekannt), die die GTP-abhängige Bildung von GDP- α -D-Mannose (**111**) aus **18** katalysiert. Die Umsetzung von **111** zur GDP-4-Keto-6-desoxy- α -D-mannose (**116**) wird anschließend durch die GDP-Mannose-4,6-dehydratase (GM-4,6-D, ein Mitglied der SDR-Superfamilie) vermittelt, die im Wesentlichen die gleiche Reaktion wie ihre Gegenstücke in den ADP-, CDP-, UDP- und TDP-Zucker-Biosynthesen katalysiert.^[127] Die GM-4,6-D-Gene (NysDIII/CanM/AmphDIII/PimJ) sind in den Genclustern von Nystatin, Candicidin, Amphotericin und Pimaricin identifiziert worden. Es wird angenommen, dass im Anschluss an die Umwandlung von **111** zu **116** eine 3,4-Zuckerketoisomerase, die bisher noch nicht bestimmt wurde, **116** in **117** überführt. Nachfolgende C-3-Transaminierung durch eine Aminotransferase, die in jedem der Gencluster codiert ist, führt zu GDP-D-Mycoamin (**118**),^[124] dem voraussichtlichen Zuckerdonor in der Biosynthese dieser Verbindungen.



Schema 9. Biosynthese der GDP-Zucker. GDP-Zucker werden von der GDP- α -D-Mannose (**111**) abgeleitet, die wiederum aus Fructose-6-phosphat (**13**) gebildet wird. Die Biosynthesegencluster für Nystatin (*nys*), Amphotericin (*amph*), Pimaricin (*pim*), Candicidin (*can*), Hygromycin A (*hyg*), Avilamycin (*avi*) und Evernimicin (*evr*) codieren jeweils für mutmaßliche GDP-Mannose-4,6-Dehydratasen, die **111** in **116** überführen. Der Gencluster für Hygromycin A codiert für ein mutmaßliches Homologes (Hyg23) der GDP-6-Desoxy-4-keto-D-mannose-Epimerase/-Reduktase (GMER oder GDP-Fucose-Synthase), von denen bekannt ist, dass sie **116** in **8** überführen. Für die L-Gulose-Reste (**114**) und 3-O-Carbamoyl-D-mannose-Reste (**115**) von Bleomycin wird vorgeschlagen, dass sie aus **111** über die zur GDP- α -D-Mannose-3,5-Epimerase (GME) homologe BlmG bzw. die Carbamoyltransferase BlmD synthetisiert werden.

Eine Analyse des kürzlich sequenzierten Genclusters von Hygromycin A hat zu einem Vorschlag für die Biosyntheseroute seiner 5-Dehydro- α -L-fucofuranose-Einheit (**113**) geführt.^[125] Der Biosyntheseweg beginnt mit der Umwandlung von **111** zu **116** durch Hyg5 mit anschließender 3,5-Epimerisierung und C-4-Reduktion zur GDP-L-Fucose (**8**) durch Hyg23, einem SDR-Enzym. Wie in der Biosynthese der D-Fucofuranose- (**24**) und D-Streptose-Reste (**26**) von Gilvocarcin V und Streptomycin (siehe Schema 4), ist der Mechanismus für die Ringverengung von **8** zu **119** unbekannt. Die Autoren schlugen vor, dass dieser Schritt durch Hyg20, das Sequenzidentität (31 %) mit Transglucosylasen aufweist, vermittelt werden könnte. Obschon nicht klar ist, wie dieses Enzym agieren sollte, ist ein Hyg20-Homologes (Ata16) auch

loges Enzym, eine *N*-Monomethyltransferase, die im Streptomycin-Gencluster von *Streptomyces griseus* vorkommt, aber im Gencluster von *S. glaucescens* fehlt. StrF, das Teil einer konservierten Kasette ist, die in allen Streptomycin-Genclustern die *strFGH*-Gene aufnimmt, könnte die Kuppung von **130** an die D-Streptose-Einheit (**26**) von **131** katalysieren. Die Expression eines DNA-Fragments, das *strFG* und einen Teil des *strH*-Gens enthielt, führte zur Wiederaufnahme der Streptomycin-Produktion in einer Mutante von *Streptomyces bikiniensis*, die sonst **131** akkumulierte.^[135] Die Analyse der Gencluster für die Biosynthese von Streptomycin und Bluensomycin weist darauf hin, dass sich die Wege zur Bildung von **125** zwischen den produzierenden Stämmen unterscheiden.^[122] Offenkundig ist mehr Forschungsarbeit nötig, um den Biosyntheseweg zu **125** genau zu klären.

2.6. Zusammenfassung der Biosynthesewege zu NDP-Zuckern

Durch die Kombination genetischer, biochemischer und bioinformatischer Methoden wurden beträchtliche Fortschritte beim Verständnis der Biosynthese von NDP-Zuckern erzielt. Obwohl viele der Reaktionsstufen nicht experimentell belegt sind, haben sich die folgenden allgemeinen Prinzipien herauskristallisiert: 1) Außer bei den wenigen Zuckern, die wie die *N*-Methyl-L-glucosamin-Einheit (**125**) von Streptomycin keine 6-Desoxyhexosen sind, erfolgt in allen bisher untersuchten Reaktionswegen die 4,6-Dehydratisierung als erster Schritt nach dem Nucleotidyltransfer und ist für alle nachfolgenden Reaktionen erforderlich. Viele der folgenden enzymatischen Modifizierungen (diskutiert in Abschnitt 3) in diesen Reaktionswegen geschehen tatsächlich entweder direkt an der 4-Ketoposition (wie die 4-Ketoreduktion und 4-Transaminierung), oder sie beruhen auf der Aktivierung durch die 4-Ketofunktion, die den pK_s -Wert der C-3- und C-5-Protonen herabsetzt (3-, 5- oder 3,5-Epimerisierung, 3- und 5-C-Methylierung, 3,4-Ketoisomerisierung, 3- und 2-Dehydratisierung). 2) In allen Biosynthesewegen von 2,6-Didesoxyzuckern erfolgt die Desoxygenierung an C-2 nach der an C-6 (**21** → **59**, Schema 5 und 6), wonach sich entweder eine 3-Ketoreduktion (**59** → **64** oder **59** → **73**, Schema 6) oder ein 3-Aminotransfer (**59** → **60**, Schema 5) anschließt. Die C-3-Ketoreduktasen, die äquatoriale (**59** → **73**) oder axiale (**59** → **64**) Produkte liefern, können durch Aminosäuresequenzalignment unterschieden werden. Im Fall der 2,3,6-Tridesoxyzucker findet die C-3-Desoxygenierung nach der C-2-Desoxygenierung/C-3-Ketoreduktion statt (**21** → **59** → **73** → **91**, Schema 6). Bei den 4,6-Didesoxyzuckern (z. B. D-Desosamin und D-Chalcose) erfordert die C-4-Desoxygenierung vorher einen 4-Aminotransfer und erfolgt nach der C-6-Desoxygenierung (**21** → **44** → **45**, Schema 5). Die Reihenfolge der Desoxygenierungsschritte ist daher C-6 → C-2 für 2,6-Desoxyzucker, C-6 → C-2 → C-3 für 2,3,6-Tridesoxyzucker und C-6 → C-4 für 4,6-Didesoxyzucker.

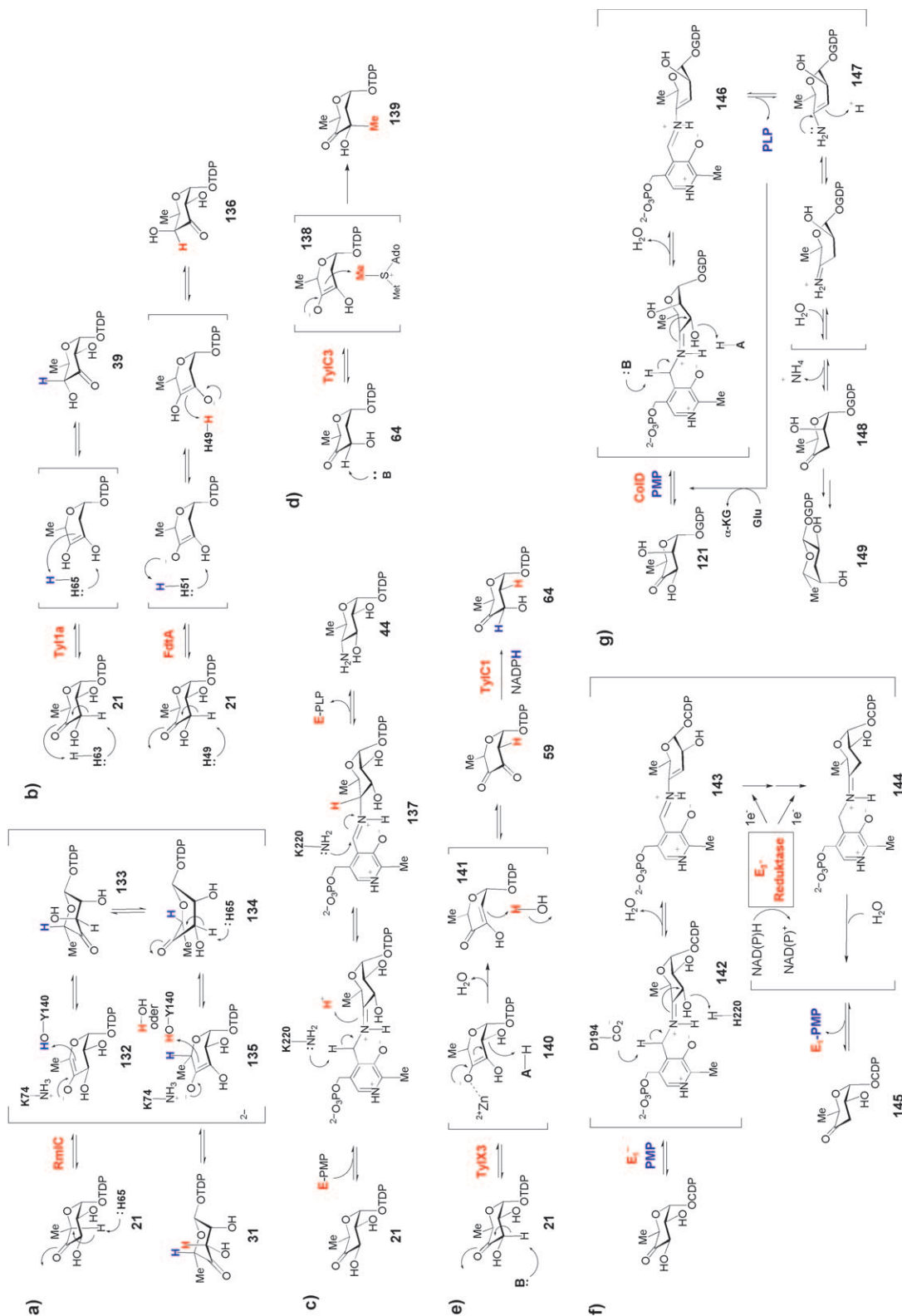
Weitere Modifizierungen wie Ketoreduktion, C-Methylierung, Epimerisierung und Transaminierung (außer vor C-4-Desoxygenierung) scheinen im Anschluss an alle Desoxygenierungsreaktionen abzulaufen. Die C-4-Ketoreduktionen und *N*-Methylierungen finden im Allgemeinen in späten

Stufen dieser Synthesewege statt, während die *O*-Methylierung gewöhnlich erfolgt, nachdem der TDP-Zuckerdonor an seinen Aglycon-Akzeptor gebunden worden ist. Die aus diesen Studien gewonnenen Erkenntnisse können als Leitfaden für die genclustergestützte oder De-novo-Vorhersage von Biosynthesewegen für Naturstoffzucker genutzt werden. Jedoch sollte diese Form der sequenzbasierten Funktionsvorhersage mit Vorsicht vorgenommen werden. In vielen Fällen bleiben die biochemische Charakterisierung der verschlüsselten Proteine und mechanistische Studien der beteiligten Schlüsselenzyme unvermeidlich, um die Biosynthesewege eindeutig aufzuklären.

3. Enzymchemie in der Biosynthese von NDP-Zuckern

Trotz der beträchtlichen Anzahl ungewöhnlicher Zuckerstrukturen in bakteriellen Sekundärmetaboliten (siehe Abschnitt 2) verwendet die Natur nur fünf allgemeine Typen von Enzymreaktionen, um die meisten dieser Strukturvarianten zu erzeugen. Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen fasst diese Reaktionen zusammen und führt repräsentative Enzyme auf, von denen aus Gendisruptions- oder Expressionsstudien bekannt ist, dass sie diese Reaktionen in vitro oder in vivo katalysieren. Da mehrere umfassende Übersichten zur Enzymchemie in der Biosynthese von Desoxyzuckern vorliegen,^[136–139] betrachten wir in diesem Abschnitt nur die allgemeinen Reaktionsprinzipien dieser Enzyme zur Erzeugung von Diversität bei Zuckern.

Da die meisten Naturstoffzucker 6-Desoxyhexosen sind, wird NDP-4-Keto-6-desoxyhexose (**21**, Schema 11) besonders häufig als Zwischenstufe bei der Desoxyzucker-Biosynthese beobachtet. Viele der anschließenden Umwandlungen wie Ketoreduktion, Transaminierung, Epimerisierung, Isomerisierung, Methylierung, Dehydratisierung und Desoxygenierung beruhen auf der Aktivierung dieser Zwischenstufe aufgrund der 4-Ketogruppe. Die Mechanismen einiger der Enzyme, die an diesen Umwandlungen beteiligt sind, werden in Abschnitt 3.1 besprochen. Die wichtige Rolle der Keto-Gruppe in der Desoxyzucker-Biosynthese wird durch das Vorhandensein kurzkettiger SDR-Enzyme in vielen Zuckerbiosynthesewegen weiter unterstrichen. Diese vielseitig verwendbare Enzymgruppe nutzt ein fest gebundenes NAD^+ -Coenzym, um ein transientes NDP-Ketozuckerintermediat zu bilden, das dann im selben aktiven Zentrum weiter umgesetzt wird, um die gewünschte chemische Umwandlung zu erreichen. Die vorgeschlagenen Mechanismen für mehrere ausgewählte zuckermodifizierende SDR-Enzyme werden im Abschnitt 3.2 erörtert. Im letzten Teil dieses Abschnitts untersuchen wir einige ungewöhnliche Modifikationen, die in manchen Desoxyzuckern von Naturstoffen vorkommen und deren Bildungsmechanismen noch nicht gut verstanden werden.



Schema 11. Viele Enzyme der Desoxyzucker-Biosynthese nutzen die 4-Ketogruppe, die in der ersten Biosynthesestufe (20 → 21, Schema 3) eingebaut wird. Beispiele sind a) die TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-3,5-Epimerase (RmlC) aus *Pseudomonas aeruginosa*, b) die TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-3,4-Ketoisomerasen (Ty11a und FdaA) aus *Streptomyces fradiae* bzw. *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, c) die TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-4-Aminotransferase (E = Desl) aus *Streptomyces venezuelae*, d) die TDP-4-Keto-2,6-dideoxy-D-glucose-3-C-Methyltransferase (Ty11c) aus *Streptomyces fradiae*, e) die TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-2-Dehydratase (Ty11X) aus *S. fradiae*, f) die CDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-3-Dehydratase (E.) aus *Yersinia pseudotuberculosis* und g) die GDP-4-Keto-6-desoxy-D-manose-3-Dehydratase (ColD) aus *Y. pseudotuberculosis*.

3.1. Allgemeine Reaktionstypen der Zuckerbiosyntheseenzyme

3.1.1. Reduktion

Ketoreduktasen sind die am weitesten verbreitete Gruppe von Enzymen bei der Desoxyzucker-Biosynthese, und etliche ihrer Funktionen sind biochemisch nachgewiesen (siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Die im Biosyntheseweg der NDP-Zucker vorkommenden Ketoreduktasen katalysieren die NAD(P)H-abhängige Reduktion (Hydrid-Übertragung) von 3- und 4-Ketozuckern zu den entsprechenden sekundären Alkoholen. Viele Biosynthesegencluster der 2,6-Dideoxyzucker codieren für eine 3-Ketoreduktase, deren Aktivität benötigt wird, um den instabilen NDP-3,4-Diketozyucker aus der 2-Dehydratase-katalysierten Reaktion zu reduzieren (siehe Abschnitt 3.1.5). Eine andere, sehr einfache Erklärung für die große Anzahl an Ketoreduktasen in diesen Biosynthesewegen wäre, dass an den Biosynthesen der meisten Desoxyzucker Ketozyucker-Zwischenstufen beteiligt sind, die für die unten beschriebenen enzymkatalysierten Reaktionen essenziell sind. Nach den nötigen chemischen Umwandlungen könnten Ketoreduktasen (von denen angenommen wird, dass viele in den letzten Stufen der NDP-Desoxyzucker-Biosynthese auftreten) dazu dienen, das NDP-Zucker-Endprodukt zu stabilisieren. Interessanterweise deuten multiple Aminosäuresequenzalignments bekannter und vermuteter NDP-Zucker-Ketoreduktasen auf eine evolutionäre Divergenz zwischen den 3- und 4-Ketoreduktasen hin, da die beiden Gruppen keine signifikante Sequenzähnlichkeit aufweisen. Innerhalb der Gruppe der 3-Ketoreduktasen können Enzyme, die axiale und äquatoriale C-3-Hydroxygruppen einführen, ohne weiteres unterschieden werden, während der stereochemische Verlauf der durch die 4-Ketoreduktase katalysierten Reaktion allein auf Basis der Aminosäuresequenz schwieriger vorherzusagen ist. Angesichts der Auswahl an C-2-, C-3-, C-4- und C-5-Substituenten, die von den einzelnen Ketoreduktasen eingeführt werden, sollte es möglich sein, die Struktur- und Substratspezifität dieser Enzyme für die In-vitro-Synthese von NDP-Zuckern und für Anwendungen im Glycoengineering zu nutzen.

3.1.2. Epimerisierung/Isomerisierung

Die Epimerase RmlC, die die Umwandlung von TDP-4-Keto-6-desoxy- α -D-glucose zur TDP-4-Keto-6-desoxy-L-mannose (**21** \rightarrow **31**, Schema 11 a) in der Biosynthese von L-Rhamnose in Bakterien katalysiert, ist eine der am häufigsten untersuchten Zucker-Epimerasen/-Isomerasen und kann als Prototyp für andere NDP-Ketozyucker-Epimerasen gelten. Studien an RmlC aus *Pseudomonas aeruginosa* deckten einen Mechanismus auf, demzufolge die 3- und die 5-Epimerisierung von **21** über die Deprotonierung an C-3 bzw. C-5 durch His65 verlaufen, das eine katalytische Dyade mit einem konservierten Asp171 bildet.^[19] Die resultierenden Enolat-Zwischenstufen (**132**, **135**) werden durch Lys74 stabilisiert, und die nachfolgende Protonierung wird von Tyr140 (oder bei der C-3-Epimerisierung vielleicht von einem Wassermolekül) vermittelt. Deuteriumaustauschstudien haben ergeben, dass die Epimerisierung an C-5 sehr viel leichter erfolgt als an C-3 und daher wahrscheinlich zuerst stattfindet. Nach der C-5-

Epimerisierung wird angenommen, dass sich eine Zwischenstufe **133** mit umgeklapptem Ring in der für L-Zucker typischen ¹C₄-Konformation bildet, um die sterische Hinderung zwischen der 5-Methylgruppe, dem O1-Atom und His65 zu vermeiden. Die Zwischenstufe **133** steht vermutlich im Gleichgewicht mit einer Twist-Boot-Konformation **134**, worin das Wasserstoffatom an C-3 orthogonal zur Ebene der 4-Keto-Funktion steht, wodurch die Abstraktion dieses Protons erleichtert wird. Die meisten anderen RmlC-Homologen in Naturstoffbiosynthesen (siehe Schema 4) sind nicht so gut charakterisiert wie RmlC aus *Pseudomonas aeruginosa*, allerdings zeigen Sequenzalignments, dass all diese Enzyme das konservierte His-Lys-Tyr-Katalysemotiv aufweisen, sodass sie wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus agieren.

TDP-4-Keto-6-desoxyglucose (**21**) ist auch das Substrat für Tyl1a (Schema 11 b), die TDP-4-Keto-6-desoxy-3,4-Ketoisomerase aus *Streptomyces fradiae*, die im D-Mycaminose-Weg die Umwandlung von **21** zu **39** katalysiert.^[54,55] Während in den Biosynthesegenclustern von Naturstoffen wenige Gene gefunden wurden, die für Tyl1a-Homologe codieren, sind sie in den Biosynthesegenclustern für die Polysaccharide äußerer Bakterienmembranen reichlich vorhanden. Ein Beispiel ist FdtA aus *Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91^T, das kürzlich strukturell und mechanistisch charakterisiert wurde.^[140] Vermutlich katalysiert ein konserviertes Histidinpaar (His49 und His51) in FdtA die Isomerisierung (Schema 11 b), wobei His49 für die C-3-Deprotonierung zuständig ist und His51 die Protonenübertragung zwischen O3 und O4 vermittelt. Die nachfolgende Protonierung an C-4 durch His49 führt zur Bildung von **136**. Man geht davon aus, dass die entsprechenden Reste in Tyl1a, His63 und His65 bei der Umwandlung von **20** in **39** ähnliche Funktionen übernehmen (Schema 11 b).

3.1.3. Transaminierung

Eine andere allgemeine Enzymreaktion in diesen Biosynthesewegen ist die von Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) bzw. Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) abhängige Transaminierung. Die Kristallstrukturen mehrerer Zuckeraminotransferasen wurden bestimmt, einschließlich der 4-Aminotransferase (DesI)^[72] und der 3-Aminotransferase (DesV), die an der Biosynthese von D-Desosamin in *Streptomyces venezuelae* beteiligt sind.^[141,142] Die Strukturanalyse von DesI (in Gegenwart von PLP und dem Aminozyuckerprodukt **44**; Schema 11 c) deckte eine externe Aldimin-Zwischenstufe **137** auf, in der sich Lys220, der Rest, der normalerweise PLP im aktiven Zentrum durch Bildung einer Schiff-Base verankert, in enger Nachbarschaft zu C-4' von PLP (3.4 Å) und zum C-4 des Zuckersubstrats (3.0 Å) befindet. Die Aldimin-Zwischenstufe ist wahrscheinlich an den Protonenübertragungen während der Transaminierung beteiligt. Verglichen mit der Struktur von PseC aus *Helicobacter pylori*,^[143] einer 4-Aminotransferase, die eine axiale Aminogruppe in einen 4-Ketozyucker einführt, ist der in DesI beobachtete Hexoserest um etwa 180° umgeklappt. Auf diesem bedeutenden Unterschied in der Orientierung der Hexose beruht wahrscheinlich die entgegengesetzte Konfiguration beim Einbau der Aminogruppen, der durch diese beiden Enzyme katalysiert wird.^[141]

3.1.4. Methylierung

TylC3 katalysiert den 3-C-Methyl-Transfer in der Biosynthese der L-Mycarose-Einheit von Tylosin in *Streptomyces fradiae* (Schema 11 d). Es war die erste NDP-Zucker-C-Methyltransferase, die in vitro charakterisiert wurde.^[90] Wie viele andere C-, O- und N-Methyltransferasen benötigt dieses Enzym ein S-Adenosylmethionin(SAM)-Cosubstrat zur Katalyse. Wie bei den durch 3,5-Epimerasen und 3,4-Ketoisomerasen katalysierten Reaktionen, wird die Katalyse durch die Abstraktion des C-3-Protons von **64** initiiert, das eine Twist-Konformation (ähnlich wie bei der Umwandlung von **133** in **134** in Schema 11 a) annehmen muss, um den Deprotonierungsschritt, der durch eine Base des aktiven Zentrums vorgenommen wird, zu erleichtern. Die naszierende Endiolat-Zwischenstufe **138** reagiert dann mit der elektrophilen Methylgruppe von SAM zu **139** unter Umkehrung der Konfiguration an C-3. Interessanterweise wird kein Metallatom für diese Umwandlung benötigt, was darauf schließen lässt, dass das aktive Zentrum von TylC3 die Endiolat-Zwischenstufe **138** hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Die Aktivitäten einiger anderer C-3- und C-5-Methyltransferasen wurden in vitro ebenfalls bestätigt (Tabelle S1). Ihnen wird eine ähnliche Wirkungsweise wie TylC3 zugeschrieben.^[39, 40, 82, 94]

3.1.5. Desoxygenierung

Die 2,6-Didesoxyzucker, die in Schema 5 und 6 dargestellt sind, bilden die größte Gruppe ungewöhnlicher Naturstoffzucker. Ihre Bildung erfordert einen durch 2-Dehydratasen katalysierten 2-Desoxygenierungsschritt in einer frühen Stufe der Biosynthese. Gra-Orf27 des Granaticin-Wegs in *Streptomyces violaceoruber* Tü22 und die begleitende 3-Ketoreduktase (Gra-Orf26) waren die ersten an der 2-Desoxygenierung von NDP-Zuckern beteiligten Enzyme, die untersucht wurden.^[144] Eine weitere Studie an TylX3 und TylC1, der entsprechenden 2-Dehydratase bzw. 3-Ketoreduktase im L-Mycarose-Weg in *Streptomyces fradiae*, lieferte zusätzliche Einblicke in den Mechanismus der 2-Desoxygenierung.^[84] Es wurde nachgewiesen, dass für die TylX3-Aktivität ein Zn²⁺-Ion benötigt wird, das sehr wahrscheinlich an der Aktivierung eines Wassermoleküls beteiligt ist, damit dieses als Base für die C-3-Deprotonierung fungieren kann, oder es stabilisiert das Enolat-Intermediat (**140**). Nach β -Eliminierung der 2-OH-Gruppe wird das entstehende Enolprodukt **141** zu **59** ketonisiert, wobei ein Wasserstoffatom aus dem Lösungsmittel stereospezifisch in die äquatoriale Position an C-2 eingeführt wird. Anschließende Reduktion der 3-Ketogruppe durch die NADPH-abhängige TylC1 ergibt **64** mit einer axialen 3-OH-Gruppe. In der Biosynthese von Granaticin überträgt die 3-Ketoreduktase Gra-Orf26 das Hydrid-Ion von NADPH auf die entgegengesetzte Seite der 3-Ketohexose (**59**), was zu einer äquatorialen 3-OH-Gruppe führt.

Der Mechanismus der 3-Desoxygenierung illustriert abermals die vielfältigen Umwandlungen, die unter Beteiligung der 4-Keto-6-desoxy- α -D-glucose in der Biosynthese von NDP-Desoxyzuckern möglich sind. Die Reaktion erfordert zwei Enzyme, wobei der Mechanismus ursprünglich für

die CDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose-3-Dehydrase (E₁) und ihre Reduktase (E₃) aus dem Ascarylose-Biosyntheseweg in *Yersinia pseudotuberculosis* eingeführt wurde.^[145–148] E₁ ist homolog zu PLP-abhängigen Aminotransferasen, enthält aber PMP anstelle von PLP als Coenzym und besitzt außerdem einen Histidinrest anstelle des konservierten Lysinrests, der normalerweise von Aminotransferasen zur Verankerung des PLP-Coenzym im aktiven Zentrum verwendet wird. E₁ enthält auch einen katalytisch essenziellen [2Fe-2S]-Cluster und braucht einen [2Fe-2S]-enthaltenden Flavodoxin-NADP⁺-Reduktasepartner, E₃, für die Aktivität. Der E₁-Mechanismus beginnt mit der Bildung einer Schiff-Base zwischen PMP und der 4-Ketogruppe des Substrats, wobei **142** entsteht (Schema 11 f). Als nächstes wird das C-4'-Proton von PMP abgespalten, das die Verdrängung der 3-OH-Gruppe auslöst und das $\Delta^{3,4}$ -Glucoseen **143** als Zwischenstufe bildet. Dieses wird dann durch zwei aufeinanderfolgende Eielektronentransfers vom NADH-reduzierten E₃-gebundenen FAD über den [2Fe-2S]-Cluster von E₃ und den [2Fe-2S]-Cluster von E₁ zu **144** reduziert. Die anschließende Hydrolyse ergibt Produkt **145** und regeneriert PMP.

Kürzlich wurde die 3-Dehydrase-Aktivität von SpnQ aus *Saccharopolyspora spinosa* im Biosyntheseweg von TDP-D-Forosamin (**100**) in vitro nachgewiesen.^[112] Im *spn*-Gencluster ist kein E₃-Homologes vorhanden, und die effiziente Umwandlung von **59** \rightarrow **91** (Schema 6) wurde nur in Gegenwart reduzierender zellulärer Enzymsysteme beobachtet, was darauf schließen lässt, dass SpnQ, wie E₁, sehr wahrscheinlich eine Reduktase aus dem zellulären Pool nutzt, um die 3-Desoxygenierungsreaktion abzuschließen. Die 3-Dehydrase (ColD) aus dem Biosyntheseweg der L-Colitose (**149**) in *Yersinia pseudotuberculosis* ist ebenfalls ein PMP-abhängiges Enzym, aber es fehlt ihr der in E₁ vorhandene [2Fe-2S]-Cluster.^[149] Es wurde gezeigt, dass die erste Hälfte der ColD-Katalyse die E₁-Reaktion durch Bildung einer Schiff-Base und Dehydratisierung nachahmt, wodurch eine zu **143** ähnliche Zwischenstufe (**146**, Schema 11 g) entsteht. Die zweite Hälfte der ColD-Reaktion umfasst die Hydrolyse der $\Delta^{3,4}$ -Aminomannosen-Zwischenstufe (**146**) zur Bildung von PLP und einem Enaminzucker (**147**), der dann tautomerisiert und anschließend unter Abgabe von Ammoniak zur 4-Keto-3,6-didesoxymannose (**148**) hydrolysiert wird. Anders als bei der E₁-Reaktion, in der PMP durch sequenzielle Eielektronenreduktion von E₃ regeneriert wird, muss das PMP-Coenzym in ColD nach jedem Katalysezyklus durch PLP mittels einer Transaminierung in Gegenwart von Glutamat regeneriert werden. Die kombinierte Desoxygenierungs-/Transaminierungsaktivität macht ColD zu einem einzigartigen Enzym.

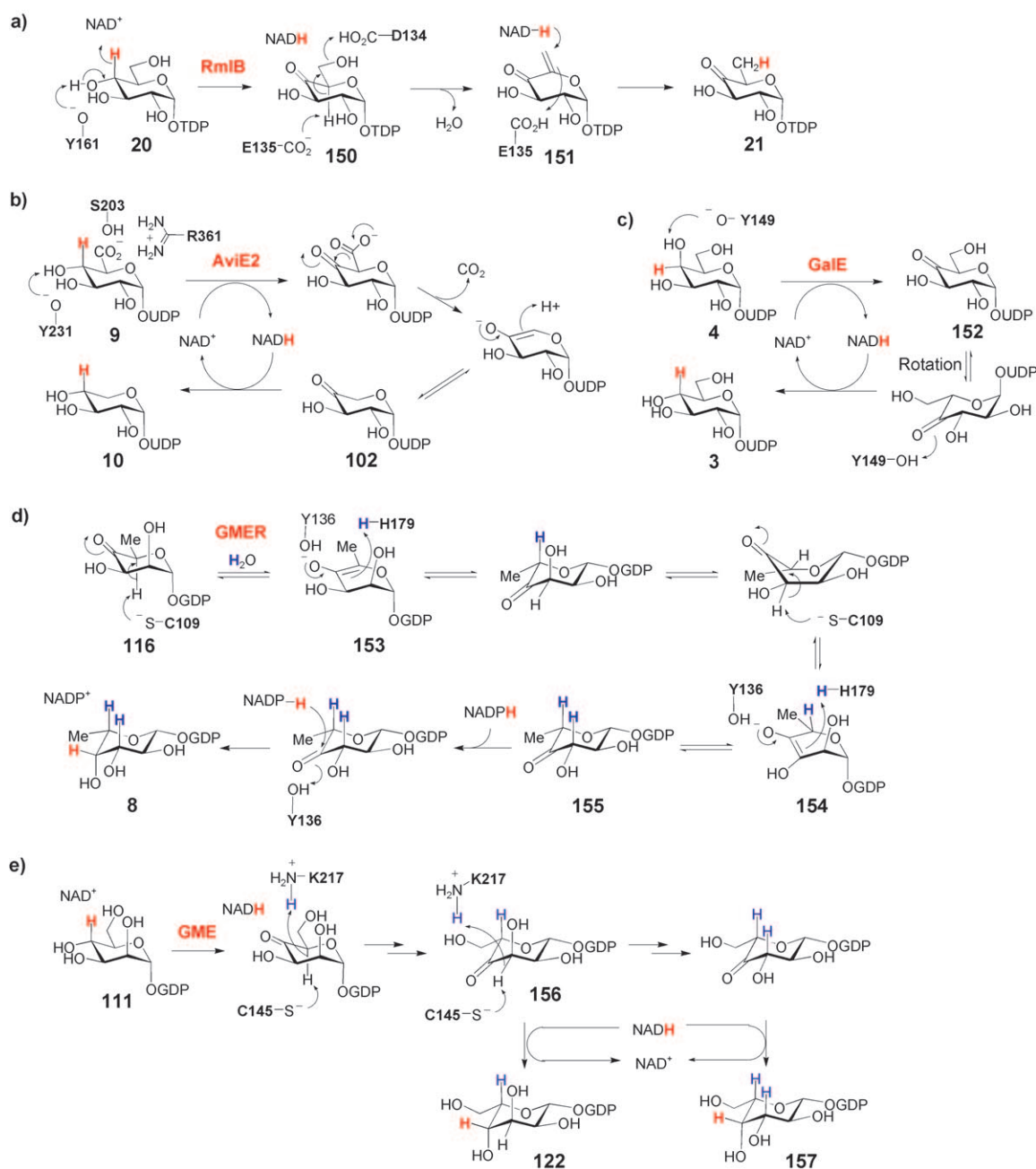
3.2. Die vielseitigen Funktionen der SDR-Enzyme bei der Biosynthese ungewöhnlicher Zucker

Die Bedeutung von Ketozucker-Zwischenstufen in der Zuckerbiosynthese wird durch das umfangreiche Auftreten der SDR-Enzyme in vielen Biosynthesewegen von NDP-Zuckern unterstrichen.^[150] Proteinfaltung und Geometrie des aktiven Zentrums dieser „nucleotidzuckermodifizierenden“ SDR-Enzyme sind konserviert, und sie verwenden in viel-

fältigen Reaktionen – darunter Ketoreduktionen, Oxidationen/Dehydratisierungen, Epimerisierungen an nichtaktivierten Kohlenstoffzentren, α -Epimerisierungen/Ketoreduktionen und Oxidationen/Decarboxylierungen – einen NAD(P)⁺-Cofaktor oder vereinzelt ein NAD(P)H-Cosubstrat. Bei den meisten dieser Reaktionen oxidiert das SDR-Enzym im ersten Schritt eine der Zuckerhydroxygruppen zu einer Ketofunktion und erzeugt so eine reaktive Zwischenstufe, die im aktiven Zentrum für zahlreiche chemische Umwandlungen weiter zur Verfügung steht.

Die durch SDR-Enzyme katalysierte 4,6-Dehydratisierung ist eine der wichtigsten Reaktionen in der Zuckerbio-

synthese. Wie in Abschnitt 3.1 erläutert wurde, ist das Produkt dieser Reaktion, ein NDP-4-Keto-6-desoxyzucker, eine Schlüsselzwischenstufe in der Desoxyzucker-Biosynthese. Die Mechanismen und Strukturen verschiedener NDP-D-Glucose-4,6-Dehydratasen sind sehr ausführlich charakterisiert worden.^[151–154] Die durch 4,6-Dehydratasen katalysierte Reaktion wird durch die Deprotonierung der 4-OH-Gruppe der NDP-Glucose durch einen konservierten Tyr-Rest mit gleichzeitiger Übertragung des 4-H als Hydrid auf NAD⁺ eingeleitet (Schema 12 a). Kristallographische Untersuchungen an 4,6-Dehydratasen aus *Salmonella enterica*,^[151] *Streptococcus suis*^[153] und *Streptomyces venezuelae*^[154] sowie meh-



Schema 12. Wirkungsweisen zuckermodifizierender SDR-Enzyme. Vorgeschlagene Mechanismen der a) TDP- α -D-Glucose-4,6-Dehydratase (RmlB) aus *Salmonella enterica*, b) UDP- α -D-Glucuronat-Decarboxylase (AviE2) aus *Streptomyces viridochromogenes*, c) UDP- α -D-Galactose-4-Epimerase (GalE) aus *E. coli*, d) GDP-4-Keto-6-desoxy- α -D-mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase (GMER oder GDP-Fucose-Synthase) aus *E. coli* und e) GDP- α -D-Mannose-3,5-Epimerase (GME) aus *Arabidopsis thaliana*.

anderen anderen zuckermodifizierenden SDR-Enzymen^[128,155–158] haben das Vorhandensein konservierter Ser/Thr- und Lys-Reste aufgezeigt, die wahrscheinlich den pK_s -Wert der Zucker-C4-OH- bzw. der Tyr-Hydroxygruppen senken. Zusammen bildet diese konservierte Ser/Thr-Tyr-Lys-Triade eines der Signaturmotive in SDR-Enzymen, und es wird vermutet, dass sie an der Vermittlung der Hydridtransferschritte in allen Enzymen dieser Gruppe beteiligt ist. Die Dehydratisierung von **150** über die C5-C6-Bindung wird durch einen Glu-Rest erleichtert, der in NDP-Zucker-4,6-Dehydratasen konserviert ist und der C-5 deprotoniert, was zu einer Enon-Zwischenstufe (**151**) führt. Man geht davon aus, dass in vielen 4,6-Dehydratasen, wie RmlB von *S. enterica*, ein Asp-Rest die Protonierung der C6-OH-Gruppe bewirkt, um so die Wasserabspaltung zu erleichtern.^[153] Dieser Asp-Rest fehlt jedoch in den GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratasen, was die Beteiligung einer anderen katalytischen Säuregruppe in diesen Enzymen impliziert. Die Verbindung **151** wird dann an C-6 durch das vom 4-H abstammende Hydrid reduziert und dann durch den Glu-Rest am C-5 unter Bildung von **21** protoniert. Die interne Rückkehr des Hydrids vom transienten NAD(P)H zum Produkt ist ein Schlüsselmerkmal im Mechanismus der meisten SDR-Enzyme in Zuckerbiosynthesen. Daher fungiert NAD⁺ in den SDR-Enzymen eher als ein fest gebundenes Coenzym statt als Cosubstrat.

Die UDP-Xylose (**10**, Schema 12b) wird im Primärmetabolismus aller Organismen benötigt, allerdings kommen verwandte Pentosen nur selten als Bestandteil von Naturstoffen vor. Im Primärmetabolismus entsteht UDP-Xylose aus der Decarboxylierung von UDP- α -D-Glucuronsäure (UDP-GlcA, **9**) durch die NAD⁺-abhängige UDP-Glucuronat-Decarboxylase (auch als UDP-Xylose-Synthase bekannt). Frühe mechanistische Studien an diesem Enzym zeigten, dass die Reaktion durch Oxidation der 4-OH-Gruppe von **9** eingeleitet wird und nachfolgende Decarboxylierung und Protonierung zu **102** führen.^[159] Reduktion von **102** mit dem vorübergehend gebildeten NADH liefert UDP-Xylose (**10**). Strukturuntersuchungen und Aminosäuresequenzalignments der ArnA-Decarboxylase-Domäne von *E. coli* (einem verwandten Enzym, das die Reaktion **9** \rightarrow **102** katalysiert) weisen darauf hin, dass ein in dieser Enzymklasse konserviertes Arg/Ser-Paar für die Katalyse der Decarboxylierungsreaktion wichtig ist.^[157] Vor kurzem wurde gezeigt, dass AviE2 – ein an der Biosynthese des von L-Lyxose abgeleiteten Zuckerrests (**107**, Schema 7) von Avilamycin mitwirkendes Enzym – eine UDP-GlcA-Decarboxylase ist; damit ist es das erste Enzym dieses Typs, das in einem Biosyntheseweg von Naturstoffzuckern in Actinomycetes gefunden wurde.^[118] Gene, die für putative Homologe der UDP-GlcA-Decarboxylase (Cals9 und AtmS9) codieren, sind auch in den Genclustern für das Endiin-Antibiotikum Calicheamicin und das Indolocarbazol-Antibiotikum AT2433 vorhanden.^[33,117] Die Aktivitäten von Cals9/AtmS9 sind bisher nicht biochemisch verifiziert, man nimmt aber an, dass sie eher die Bildung von **102** katalysieren als die von **10**, was sie mehr in die Nähe der ArnA-Decarboxylasen als der UDP-Xylose-Synthasen rückt.

Die Bildung des von L-Lyxose abgeleiteten Zuckerrests (**107**) von Avilamycin erfordert die Epimerisierung an einem nichtaktivierten Kohlenstoffatom. Dieser Reaktionstyp wird häufig von einer Gruppe SDR-Enzyme katalysiert, die zur gut untersuchten UDP-Galactose-4-Epimerase (GalE) im Leloir-Weg des Primärmetabolismus homolog sind.^[160] GalE-Homologe, die die Epimerisierung von Pyranosehydroxygruppen an C-2, C-4 und C-6 katalysieren, sind charakterisiert worden.^[160–165] Strukturuntersuchungen an GalE aus *E. coli* haben gezeigt, dass im Anschluss an die Oxidation der 4-OH-Gruppe der UDP-Galactose (**4**; Schema 12c) der Hexosering der Zwischenstufe **152** um die C¹O-P-Bindung rotiert.^[156] Dies ermöglicht den Transfer des Hydrids vom NADH auf die entgegengesetzte Seite von **152** an C-4, um so UDP-Glucose (**3**) zu bilden und NAD⁺ zu regenerieren. Bei der Avilamycin-Biosynthese muss UDP-Xylose (**10**) sowohl an C-3 als auch an C-4 epimerisiert werden, um **106** zu bilden (Schema 7). Zwei mutmaßliche SDR-Enzyme, AviQ1 und AviQ2, die homolog zu GalE sind, sind im Avilamycin-Gencluster codiert und könnten die Epimerisierung katalysieren.^[118] Falls sich bestätigt, dass dies der Fall ist, wäre es das erste Beispiel für eine durch ein SDR-Enzym katalysierte Epimerisierung der 3-Hydroxygruppe eines NDP-Zuckers.

Interessanterweise zeigen mehrere SDR-3,5-Epimerasen auch die Aktivität einer 4-Reduktase (Schema 12d). Die GDP-6-Desoxy-4-keto-D-mannose-Epimerase/Reduktase (GMER oder GDP-Fucose-Synthase), die in allen Organismen in die Biosynthese der GDP-Fucose eingebunden ist, ist ein Beispiel eines solchen Enzyms mit doppelter Funktion. Das Enzym aus *E. coli* katalysiert die 3,5-Epimerisierung unter Verwendung eines His179/Cys109-Paars in Abwesenheit von NADPH.^[158,166–168] Der konservierte Tyr136-Rest des Ser/Thr-Tyr-Lys-Motivs stabilisiert die Enolat-Zwischenstufen (**153** und **154**). In der reduktiven Reaktion protoniert Tyr136 die 4-Ketofunktion von **155** durch Hydridtransfer von NADPH. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass ein GMER-Homologes (Hyg23) eine identische Reaktion im Biosyntheseweg von Hygromycin A in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 2388 katalysiert (Schema 9).^[125] Interessanterweise verwendet das verwandte SDR-Enzym, GDP-Mannose-3,5-Epimerase (GME), das NAD⁺-Coenzym, um die 4-OH-Gruppe der GDP-D-Mannose (**111**) vor der 3,5-Epimerisierung zu oxidieren (Schema 12e).^[128] Insgesamt ist die Katalyse durch GME sehr ähnlich zu der durch GMER, außer dass GME ein Lys/Cys-Säure/Base-Paar anstelle eines His/Cys-Paares einsetzt. Nach der 5-Epimerisierung kann das Intermediat **156** an C-4 zu GDP- β -L-Gulose (**122**) reduziert werden oder an C-3 epimerisiert und dann an C-4 zur GDP- β -L-Galactose (**157**) reduziert werden. Der L-Guloserest von Bleomycin (**114**, Schema 9) wird vermutlich analog synthetisiert, höchstwahrscheinlich durch BlmG.^[126]

3.3. Ungewöhnliche Modifikationen in der Biosynthese von Naturstoffzuckern

Die meisten Biosynthesen ungewöhnlicher Zucker verlaufen über die in Tabelle S1 aufgeführten „allgemeinen“ Enzymreaktionen. Darüber hinaus gibt es aber noch andere

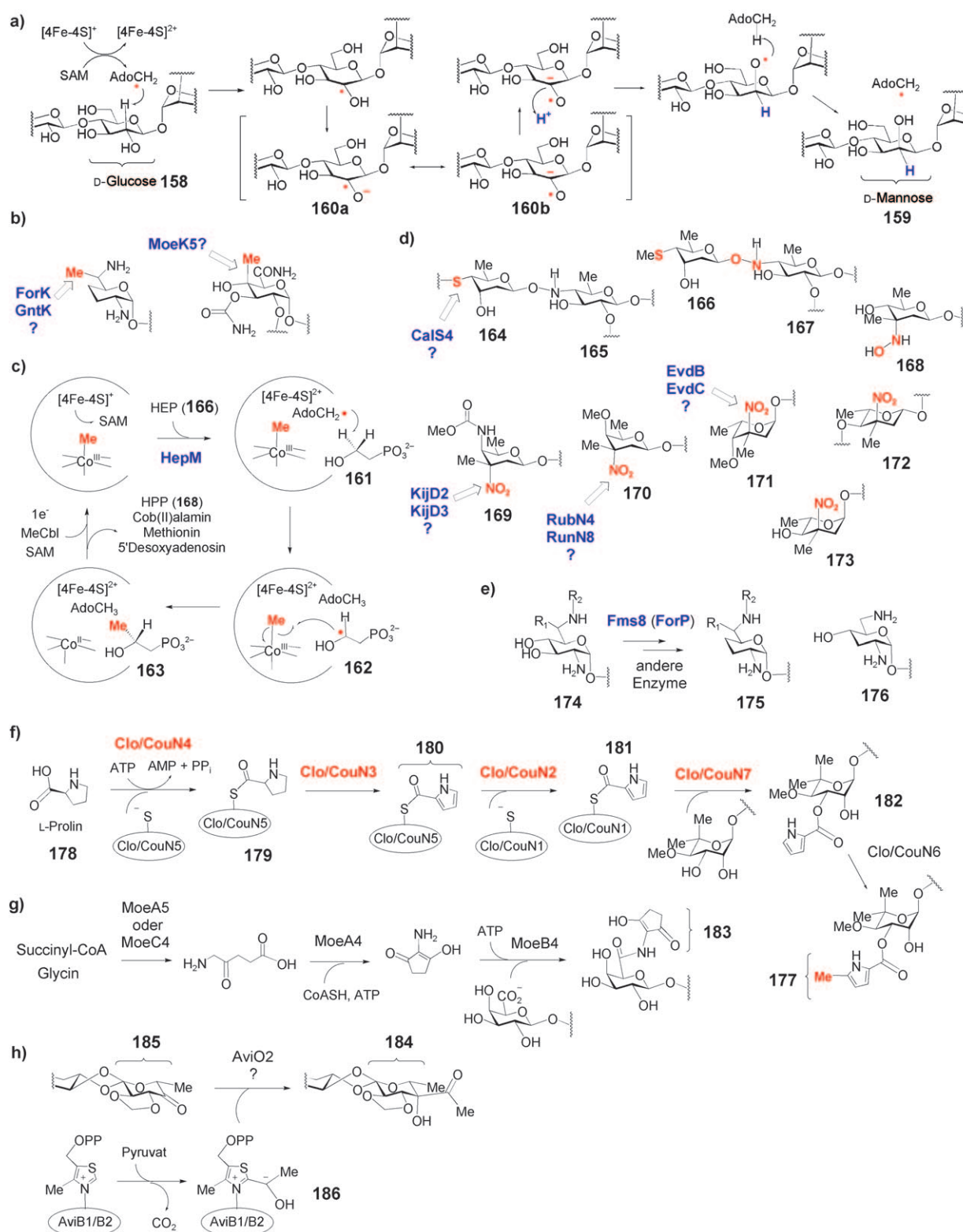
diversifizierende Reaktionen, z.B. Epimerisierung und Methylierung an nichtaktivierten Kohlenstoffzentren, Sulfurylierung, Bildung von Nitro- und Hydroxylaminogruppen, Ringverengungen usw. Die meisten dieser seltenen Modifizierungen sind experimentell noch nicht untersucht worden.

Boll et al. zeigten kürzlich, dass das Entfernen eines einzigen Gens, *aviX12*, aus dem Gencluster von Avilamycin A aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 ein inaktives Avilamycinderivat ergibt (Gavibamycin N1), in dem ein Glucosester (siehe **158**) den normalerweise vorhandenen Mannoserest (siehe **159**) ersetzt (Schema 13a).^[169] Diese überraschende Beobachtung wies darauf hin, dass sich der Mannoserest nicht, wie zuvor vermutet, direkt von der GDP-Mannose herleitet.^[106] Stattdessen könnte er durch *AviX12*-vermittelte C-2-Epimerisierung einer Glucoseeinheit (**158** → **159**) gebildet werden und so zur aktiven Form von Avilamycin A führen. Die Untersuchung der vorhergesagten *AviX12*-Aminosäuresequenz deckte ein CxxxCxxC-Motiv auf, das für ein radikalisches SAM-Enzym charakteristisch ist.^[170] Für die *AviX12*-katalysierte Reaktion wird daher vorgeschlagen, dass sie durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms am C-2 der Glucoseeinheit (**158**) durch das 5'-Desoxyadenosylradikal (AdoCH_2^\cdot), das durch reduktive Spaltung von SAM mit dem reduzierten $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster (Schema 13a) entsteht, eingeleitet wird. Deprotonierung könnte dann zum Ketylradikal **160a** führen, das eine Resonanzform von **160b** ist. Die erneute Protonierung könnte von der entgegengesetzten Seite des Zuckerrings erfolgen wie der Wasserstofftransfer durch AdoCH_3 und das Mannoseprodukt (**159**) ergeben. Falls sich dieser Mechanismus bestätigt, hätte man es in der Tat mit einer ungewöhnlichen radikalisch initiierten Epimerisierungsreaktion zu tun.

Ein neuer Methylierungstyp, der durch Methylcobalamin-abhängige radikalische SAM-Enzyme vermittelt wird, ist vermutlich an der Bildung mehrerer Antibiotika beteiligt, darunter Moenemycin A aus *Streptomyces ghanaensis*,^[171] Fortimycin A aus *Micromonospora olivasterospora* und Gentamycin aus *Micromonospora echinospora*.^[172] Jeder der entsprechenden Gencluster enthält ein Gen für ein putatives Methylcobalamin-abhängiges radikalisches SAM-Enzym (MoeK5, ForK bzw. GntK), das eine Methylgruppe an einem nichtaktivierten Kohlenstoffzentrum des jeweiligen Zuckersubstrats einführen könnte (Schema 13b). Diese SAM-Enzyme sind nicht untersucht worden, allerdings konnte ein ähnliches Enzym (Fom3) der Fosfomycin-Biosynthese identifiziert werden, für das außerdem ein Mechanismus vorgeschlagen wurde.^[173] Fom3 katalysiert die Umwandlung von 2-Hydroxyethylphosphonat (HEP, **161**) zu (S)-2-Hydroxypropylphosphonat (HPP, **163**). Wie in Schema 13c dargestellt, erzeugt der reduzierte $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zuerst das 5'-Desoxyadenosylradikal (AdoCH_2^\cdot), das ein Wasserstoffatom vom Substrat (**161**) aufnimmt und die radikalische Zwischenstufe **162** bildet. Das Substratradikal abstrahiert dann Me^\cdot von Methylcobalamin unter Bildung der methylierten Verbindung **163** und Cob(II)alamin. Dieser mögliche Mechanismus ist metabolisch aufwendig, da 2 Äquivalente SAM pro Zyklus verbraucht werden. Auch ist die Rolle des Methylcobalamins als Methylradikaldonor höchst ungewöhnlich.

Die Biosynthesen weiterer ungewöhnlicher Zucker – z.B. die Thiozucker in Calicheamicin (**164**) und Esperamicin (**166**), der Hydroxylaminzucker in Calicheamicin (**165**), Esperamicin (**167**) und Viriplanin A (**168**) sowie der Nitrozucker in Kijanamicin (**169**), Rubradirin (**170**), Evernimicin (**171**), Cororubicin (**172**) und Decilorubicin (**173**) – erfordern ebenfalls besondere Enzymaktivitäten (Schema 13d). Die Enzyme, die diese Modifikationen verursachen, nicht bislang unbekannt, und nur die Biosynthesegencluster von Calicheamicin,^[33] Evernimicin,^[129] Rubradirin^[174] und Kijanamicin^[99] sind identifiziert worden. Bemerkenswerterweise codiert der Calicheamicin-Gencluster für eine putative Cystein-Desulfurase (CalS4), die an der Biosynthese der Thiozuckereinheit von Calicheamicin (**164**) beteiligt sein könnte.^[175] Ein Cytochrom-P450-Enzym oder eine Flavin-abhängige Monooxygenase ist vermutlich für die Bildung des Hydroxylaminrests zuständig.^[175] Die Nitrozucker **169–173** entstehen am plausibelsten durch Oxidation der entsprechenden Aminozucker. Tatsächlich enthalten die Gencluster für Evernimicin,^[129] Rubradirin^[174] und Kijanamicin^[99] alle eine Drei-Gen-Kassette, die für eine NDP-3-C-Methyltransferase (EvdA/RubN5/KijD1), eine NDP-3-Aminotransferase (EvdB/RubN4/KijD2) und eine Flavin-abhängige Oxidoreduktase (EvdC/RubN8/KijD3) codiert, die an der Biosynthese der 3-Methyl-3-nitrozucker beteiligt sein könnten.^[99] Der O-Methylcarbamaterest von Kijanose (**169**) ist ebenfalls ungewöhnlich. Für seine Bildung wurde eine Reaktionsfolge aus N-Methylierung, Oxidation der Methylgruppe zu einer Carboxylatgruppe und O-Methylierung vorgeschlagen, vermittelt durch KijD8, KijB3 bzw. KijD9.^[99] Wie bereits bei den Thio-, Nitro- und Hydroxylaminzuckern betont wurde, sind noch viele interessante Modifizierungen in der Biosynthese von Naturstoffzuckern unentdeckt und unerforscht.

Erste Studien haben bereits fundierte Einblicke in die enzymatischen Mechanismen der C-O-Spaltung in der Desoxyzucker-Biosynthese erbracht,^[136–138] einige entscheidende Fragen konnten aber noch nicht geklärt werden. Ein Problem ist, dass recht viele Desoxygenierungen (etwa zur Bildung der 2,6-Diamino-2,3,4,6-tetradesoxyzucker-Einheit (**175**) von Gentimicin und Fortimicin sowie der 2,6-Diamino-2,3,6-tridesoxy-neosamin-Einheit (**176**) von Tobramycin; Schema 13e) über deutlich unterschiedliche Mechanismen ablaufen könnten. Um Aufschluss zu erhalten, wurden Mutanten von *Micromonospora olivasterospora* untersucht, bei denen die Biosynthese von Fortimicin A in unterschiedlichen Stadien blockiert war. Man beobachtete die Anreicherung verschiedener 3,4-Dihydroxy- (**174**) und 3,4-Didesoxyzucker-Zwischenstufen (**175**), aber keine Bildung 3- oder 4-monohydroxylierter Spezies.^[176] In Komplementierungsstudien mit Fragmenten des Fortimicin-Genclusters wurde schließlich das Genprodukt Fms8 als möglicher Katalysator des Didehydroxylierungsschritt identifiziert,^[177] da dieses Enzym den Didehydroxylierungsphänotyp wiederherstellte, wenn es heterolog in *M. olivasterospora* exprimiert wurde.^[177,178] Der Mechanismus der Didehydroxylierung bleibt unklar, ebenso wie die Frage, ob andere Enzyme benötigt werden. Man vermutet aber, dass die Phosphorylierung einer Zwischenstufe ausschlaggebend sein könnte, da Fms8 homolog zu der an der Neomycin-B-Resistenz beteiligten Phosphotransferase



Scheme 13. Auswahl ungewöhnlicher Zuckermodifizierungen. a) Umwandlung von D-Glucose zu D-Mannose (**158** → **159**) in der Biosynthese von Avilamycin durch AviX12, ein radikalisches SAM-abhängiges Enzym. b) Methylierung an nichtaktivierten Kohlenstoffzentren in der Biosynthese von Gentamycin, Fortimycin und Moenomycin durch eine Gruppe radikalischer SAM/Cobalamin-abhängiger Enzyme. c) Vorgeschlagener Mechanismus für Fom3, ein radikalisches SAM/Cobalamin-abhängiges Enzym im Fosfomycin-Biosyntheseweg in *Streptomyces wedmorensis*. d) Repräsentative Thio-, Nitro- und Hydroxylaminzucker, die in mehreren bakteriellen Naturstoffen vorkommen. e) Mutmaßliche Beteiligung von Fms8 bei der 3,4-Didehydroxylierung einer Zwischenstufe der Fortimycin-Biosynthese und des 2,3,6-Tridesoxyzuckerrests (**176**) von Tobramycin. f) Aufbau des 5-Methylcarboxypyrrol-Substituenten **177** von Cloromycin und Coumermycin. g) Biosynthese des ungewöhnlichen Zuckersubstituenten **183** von Moenomycin. h) Ungewöhnliche Modifizierungen, die zur Synthese des Methyleurekanrests **184** von Avilamycin A benötigt werden.

NmrA ist. Die Bildung von Gentamicin könnte nach einem ähnlichen Didehydroxylierungsmechanismus erfolgen. Die Biosyntheseroute zum Tobramycin-Zucker **176** ist ebenfalls rätselhaft, denn die charakterisierten Mechanismen der 3-Desoxygenierung erfordern die Bildung einer 4-Keto-6-desoxyzucker-Zwischenstufe durch eine 4,6-Dehydratase und anschließend eine 3-Dehydratisierung, die entweder durch ein E₁- oder ein ColD-Homologes katalysiert wird (siehe Schema 11 f,g). Jedoch enthält der beschriebene Tobramycin-Gencluster keines der Gene für diese Enzyme, was auf einen anderen Mechanismus für die 3-Desoxygenierung im Tobramycin-Weg schließen lässt.

Die Bindung einer 5-Methylpyrrol-2-carboxyl-Einheit (**177**) an den 4-O-Methylnoviose-Rest in den Antibiotika Clorobiocin und Coumermycin A₁ ist eine weitere bemerkenswerte Modifizierung (Schema 13 f). Sie erhöht sehr stark das Vermögen dieser Wirkstoffe, die bakterielle Typ-II-Toxoisomerase DNA-Gyrase zu hemmen. Die Biosynthese von **177** und seine Anbindung an den Grundkörper der Antibiotika ist sowohl in vivo als auch in vitro untersucht worden.^[43,45] Es wurde festgestellt, dass sich **177** von L-Prolin (**178**) ableitet, das als Acyladenylat aktiviert und dann durch Clo/CouN4 an das Clo/CouN5-Peptidylcarrierprotein (PCP) geknüpft wird. Anschließend Oxidation von **179** durch Clo/CouN3 ergibt einen PCP-gebundenen Pyrrol-2-carboxyl-Substituenten (**180**), der durch die Acyl-ACP-Synthase (Clo/CouN2) auf ein separates PCP (Clo/CouN1) übertragen wird und **181** liefert. Die letzten Schritte umfassen den Transfer von **181** zum 4-O-Methylnoviose-Rest durch eine Thioesterase (Clo/CouN7) unter Bildung von **182** und die C-Methylierung durch eine Methylcobalamin-abhängige radikalische SAM-Methyltransferase (Clo/CouN6) zu **177**. Die Biosynthese der C₅N-Einheit **183** von Moenomycin, das von *Streptomyces ghanensis* produziert wird, ist ebenfalls faszinierend (Schema 13 g). Eine Aminolävulinat-Synthase (MoeA5), eine Acyl-CoA-Ligase (MoeA4) und eine Amid-Synthetase (MoeB4), die im Gencluster zusammen lokalisiert sind, wurden als Enzyme für die Umwandlung von Succinyl-CoA und Glycin zu **183** vorgeschlagen.^[171] Tatsächlich produzierte eine *moeA4*⁻-Knockout-Mutante eine Moenomycinvariante, der der Rest **183** fehlte.

Der Methyleurekanatrest (**184**) in Avilamycin aus *Streptomyces viridochromogenes* erfordert mehrere interessante Modifizierungsschritte: Die Bildung der Orthoesterbindung an C-1, die Einführung der Methyleinheit zwischen O2 und O3 und die Anlagerung der 4-C-Acetylgruppe (Schema 13 h). Als Vorstufe von **184** kommt der 4-Ketozucker **185** in Betracht. Die Kondensationsreaktion von **185** mit der Thiaminpyrophosphat(TPP)-gebundenen Acetylcarbanion-Einheit **186** ergäbe hierbei das Produkt **184**.^[179] Die Acetylcarbanion-Einheit wird wahrscheinlich aus Pyruvat durch einen AviB1/B2-Komplex erzeugt, dessen Untereinheiten homolog zu den α - und β -Ketten der Pyruvat-Dehydrogenase sind. Welche Enzyme für den Einschub der Methyleinheit zwischen O2 und O3 und für die Bildung der Orthoesterbindung zuständig sind, ist unbekannt. Zwei der drei im Avilamycin-Gencluster codierten Nicht-Häm-Eisenenzyme könnten diese Umwandlung katalysieren.

3.4. Ausblick

Die in den vorangehenden Abschnitten vorgestellten Arbeiten lassen erkennen, wie erfindungsreich die Natur einen kleinen Satz an Enzymaktivitäten nutzt, um eine beträchtliche strukturelle Diversität bei Zuckern zu erzeugen. Die meisten dieser Enzyme verarbeiten ähnliche Substrate, können aber über ihr jeweils einzigartig strukturiertes aktives Zentrum und mithilfe spezieller Cofaktoren sehr verschiedenartige Reaktionen katalysieren. Zukünftige Struktur- und Mechanismusstudien an Zuckerbiosyntheseenzymen können helfen, das Potenzial dieser Enzyme als synthetische Katalysatoren für die Glycodiversifizierung auszuloten. Besonders die Mitglieder der SDR-Enzymfamilie sind interessante Ausgangspunkte für die gezielte Entwicklung von Enzymfunktionen, da sie mit einer konservierten Proteinfaltung und ähnlichen, aber jeweils charakteristischen Reaktivitäten im aktiven Zentren viele unterschiedliche Reaktionen an strukturell diversen Zuckersubstraten katalysieren. Eine weitere Diversifizierung der Zuckerstrukturen könnte durch die Verwendung von Enzymen erreicht werden, die ungewöhnliche Umwandlungen oder Modifizierungen katalysieren. Die Aufklärung der Biosynthesewege ungewöhnlicher Zucker und der Wirkungsweisen der beteiligten Enzyme haben zu enormen Fortschritten bei der Anwendung von Glycoengineering-Methoden (siehe Abschnitt 5) zur Synthese neuer Glycoformen von Naturstoffen geführt.

4. Glycosyltransferasen

4.1. Die „Türhüter“ der Glycodiversität

Glycosyltransferasen (GTs) katalysieren die Anknüpfung der Zuckerreste an die Akzeptormoleküle und sind eine entscheidende Enzymgruppe in biologischen Systemen. Zurzeit befinden sich mehr als 15800 vermutete Glycosyltransferasen in der Proteindatenbank, wenngleich in den meisten Fällen die Funktionen noch nicht belegt sind.^[180] Von mehreren hundert GTs wird vermutet, dass sie an der Biosynthese von bakteriellen und pflanzlichen Naturstoffen mitwirken. Diese GT-katalysierten Reaktionen finden an einer entscheidenden Schnittstelle in der Naturstoffbiosynthese statt, wo sich die Produkte der Zucker- und Aglycon-Biosynthesewege treffen. In den letzten Jahren waren GTs daher Gegenstand vieler Untersuchungen, die zum Ziel hatten, ihre biochemischen Eigenschaften zu verstehen und gezielt abstimmen zu können.^[181] Schließlich könnten diese Enzyme nützlich sein, um „nichtnatürliche“ Kupplungsreaktionen zu katalysieren und damit neue Glycoformen von Naturstoffen zu synthetisieren. Die Forschungen in diesem Bereich haben sich auf zwei Hauptgebiete konzentriert: 1) die Nutzung der breiten Substratspezifität vieler Wildtyp-GTs für die Synthese und 2) die gentechnische Veränderung der GT-Spezifität. Die hierbei verwendeten Strategien beruhen auf genetischen, genomischen, molekularbiologischen, biochemischen und chemischen Methoden.

Die meisten GTs verwenden NDP-Zucker als Donorsubstrate, in einigen Fällen werden jedoch auch NMP- und

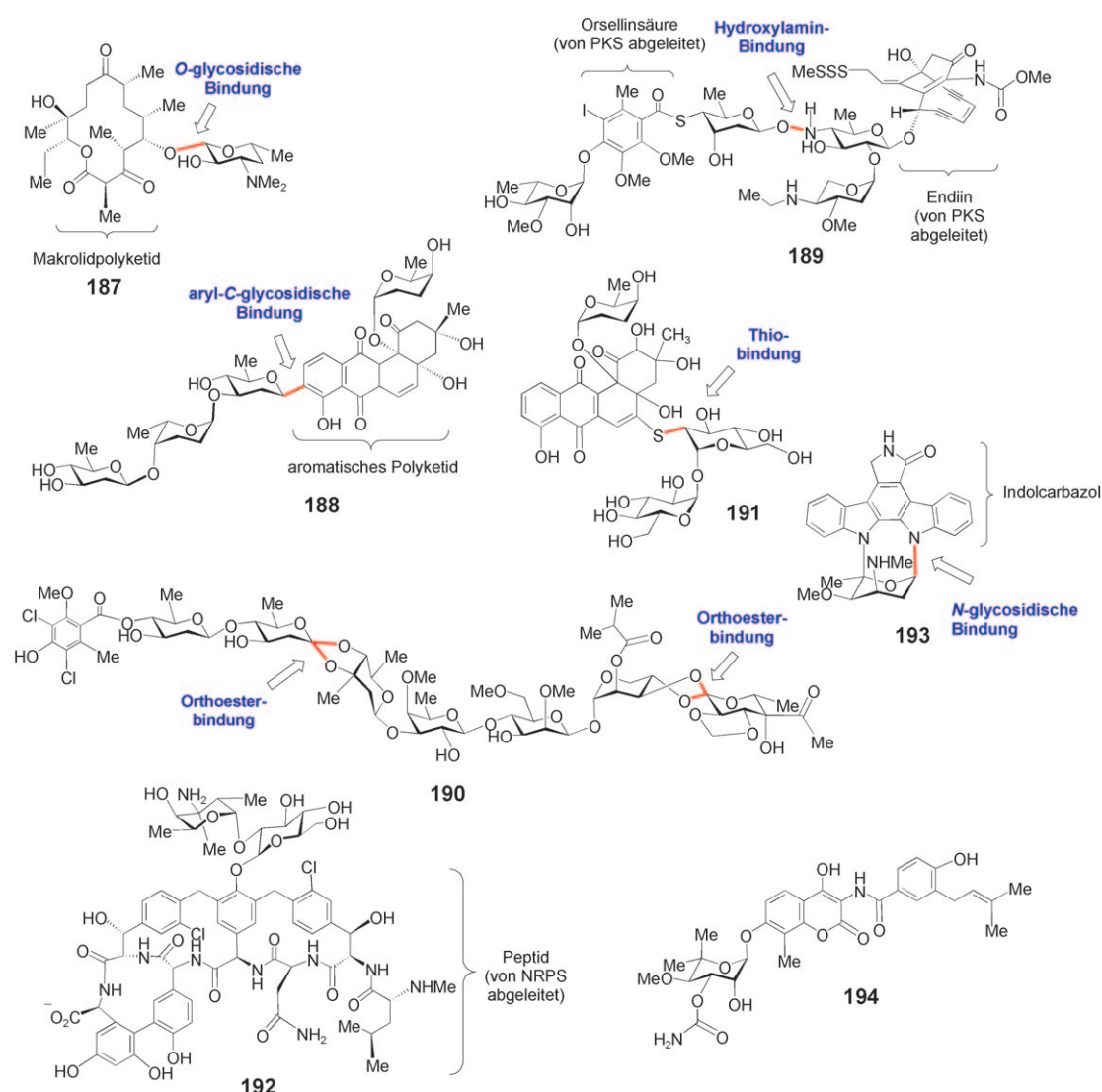
Polyprenyldiphosphatzucker herangezogen. Man hat gefunden, dass eine Phosphoribosyltransferase (PRTase),^[182,183] die 5-Phosphoribosediphosphat (PRPP) als Donor für den Transfer von 5-Phosphoribose auf ein Akzeptorsubstrat verwendet, an der Biosynthese des Aminoglycosid-Antibiotikums Butirosin beteiligt ist.^[184] Dies ist die erste charakterisierte PRTase in einer Naturstoffbiosynthese.

Auch die Akzeptorsubstrate der GTs haben vielfältige Strukturen und stammen aus einer Vielzahl von Substanzklassen (Schema 14). Beispiele sind die von einem Polyketid abgeleiteten Aglycone von Pikromycin (**187**), Urdamycin A (**188**), Calicheamicin (**189**), Avilamycin (**190**) und BE-7585 A (**191**),^[185] das von einem nichtribosomalen Peptid (NRP) abgeleitete Aglycon von Vancomycin (**192**), das Indolcarbazol-Aglycon von Staurosporin (**193**), das Aminocumarin-Aglycon von Novobiocin (**194**) und viele mehr. In der Kupplungsreaktion verdrängt eine nucleophile funktionelle Gruppe des

Akzeptors den anomeren Substituenten des Zuckerdonors, um die Glycosidbindung zu knüpfen. Als Nucleophil fungiert am häufigsten eine Hydroxygruppe. In einigen Naturstoffen werden auch *N*- und *C*-glycosidische Bindungen (wie in **193** bzw. **188**) sowie die ungewöhnlichen Orthoester- (wie in **190**), Hydroxylamin- (wie in **189**) und Thio-Verknüpfungen (wie in **191**) beobachtet. Die Mechanismen für die Bildung der letzten drei Verbindungstypen sind noch nicht erforscht.

4.2. Strukturen von Glycosyltransferasen

Seit 1994 die erste Kristallstruktur einer GT beschrieben wurde,^[186] sind 35 GT-Strukturen bestimmt worden.^[187] Mit Ausnahme einer bifunktionellen Transpeptidase-Glycosyltransferase aus der Peptidoglycan-Biosynthese (die eine spezielle Struktur aufweist),^[188] gliedern sich die GT-Struk-



Schema 14. Beispiele glycosylierter mikrobieller Naturstoffe: Pikromycin (**187**), Urdamycin A (**188**), Calicheamicin (**189**), Avilamycin (**190**), BE-7585 A (**191**), Vancomycin (**192**), Staurosporin (**193**), Novobiocin (**194**). Glycosidische Bindungen sind normalerweise O-verknüpft, daneben gibt es auch C-glycosidische (**188**), N-glycosidische (**193**), Hydroxylamin- (**189**) und Orthoesterbindungen (**190**). Die Disaccharideinheit von **191** ist über eine ungewöhnliche Thiobindung an das aromatische Aglycon gekuppelt.

turen in zwei Klassen – die GT-A- und GT-B-Familien –, deren Eigenschaften schon mehrfach besprochen wurden.^[150, 180, 181, 189–194] Die GT-A-Superfamilie ist durch eine einzige Domäne mit einer α, β, α -Topologie entsprechend einer Rossmann-Faltung gekennzeichnet.^[191–193] Die Zuckerbindungsregion der GT-A-Enzyme enthält ein konserviertes DXD(Asp-X-Asp)-Motiv zur Bindung eines zweiwertigen Metalls (gewöhnlich Mn^{2+}), das die Diphosphateinheit des NDP-Zuckers verankert^[195, 196] und die NDP-Abgangsgruppe stabilisiert.^[195–200] Interessanterweise gibt es ein neueres Beispiel für ein Metallion-unabhängiges GT-A-Enzym, dem das DXD-Motiv fehlt.^[201] Umgekehrt besitzen Mitglieder der GT-B-Superfamilie zwei Domänen mit Rossmann-Faltung mit einer tiefen Spalte zwischen den Domänen, in der die Donor- und Akzeptorsubstrate anbinden.^[193, 194] Sie sind von Metallionen unabhängig und weisen keine universell konservierten Aminosäurereste auf, obschon die C-terminale Nucleotidbindungsdomäne stärker konserviert ist als die N-terminale Akzeptorbindungsdomäne. Trotz der geringen Sequenzidentität (< 10 %) zwischen den GTs sind die Tertiärstrukturen innerhalb derselben Superfamilie recht ähnlich.

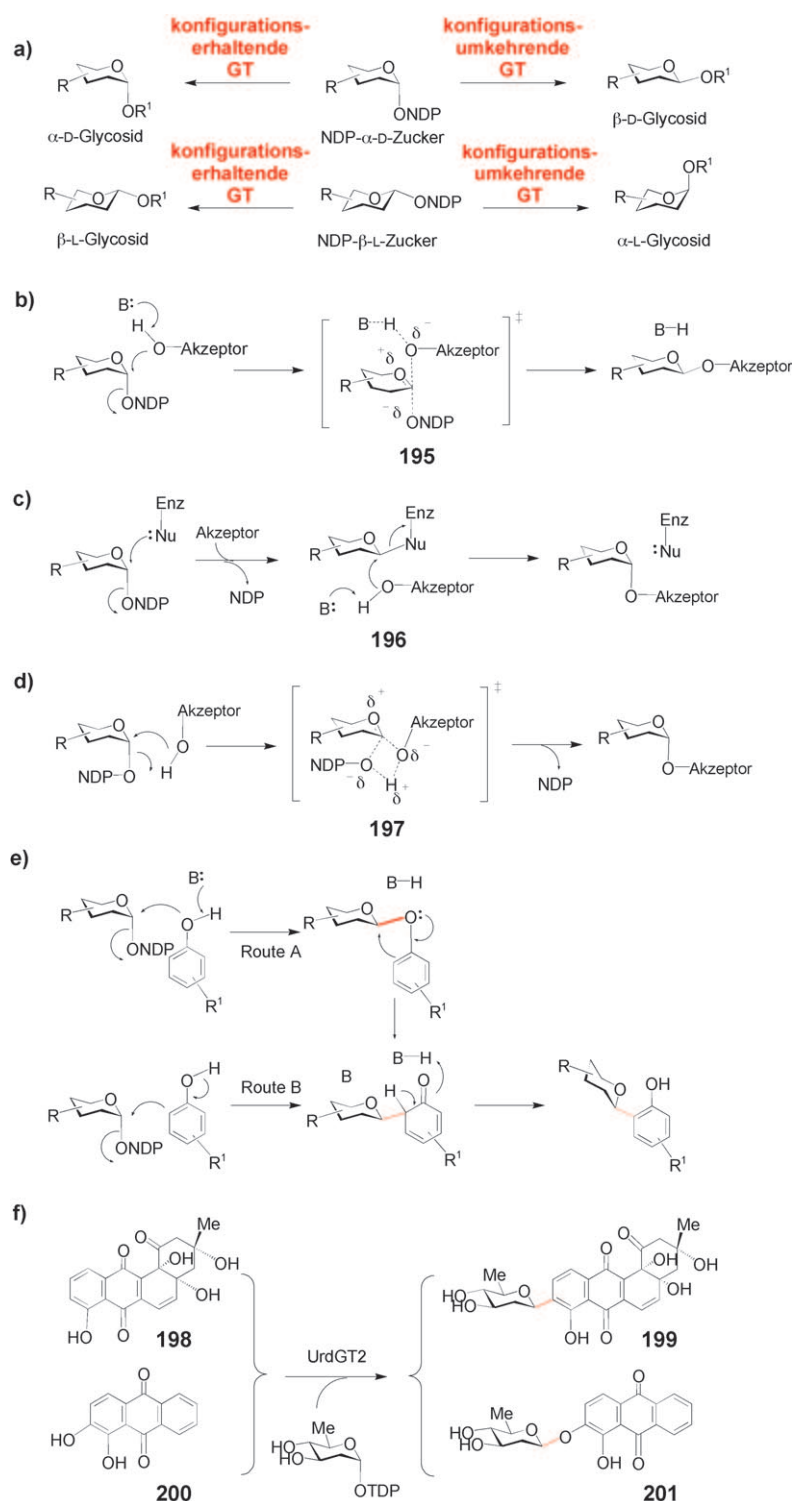
Fast alle bakteriellen GTs sind offenbar Mitglieder der GT-B-Superfamilie,^[194] bislang konnten aber nur einige wenige Kristallstrukturen bestimmt werden.^[202–207] Die erste beschriebene Struktur war die der GtfB aus dem Chloroeremomycin-Biosyntheseweg.^[202] Wie für Mitglieder der GT-B-Superfamilie typisch, weist GtfB zwei Domänen auf, die durch eine flexible Linkerregion getrennt sind, die eine tiefe Spalte zwischen den beiden Domänen bildet. Die N-terminale Domäne enthält die Aglyconbindungsstelle und die C-terminale Domäne die Zuckerbindungsstelle. Da die beiden Domänen im GtfB deutlich separiert scheinen, wurde die Möglichkeit gesehen, chimäre GTs mit Donor- und Akzeptorbindungsstellen von verschiedenen GTs herzustellen.^[202] Die Strukturen der L-Epivancosaminyltransferasen GtfA und GtfD aus den Chloroeremomycin- bzw. Vancomycin-Wegen sind im Komplex mit dem Akzeptorsubstrat und TDP untersucht worden.^[203, 204] Die GtfA kann einen offenen und einen geschlossenen Konformationszustand einnehmen, wobei im geschlossenen Zustand nur wenige Kontakte zwischen den Domänen vorliegen. Der offene Zustand wurde beobachtet, wenn nur das Akzeptorsubstrat gebunden war, während der geschlossene Zustand vorlag, wenn Akzeptor und TDP gebunden waren. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung des TDP-Zuckers die Bildung des katalytisch aktiven, ternären Michaelis-Komplexes auslöst. Im Unterschied zur GtfA wies die Struktur von GtfD in der geschlossenen Konformation mehrere deutliche Kontakte zwischen den Domänen auf. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Bildung chimärer oder gentechnisch modifizierter Varianten komplizierter sein könnte als aufgrund der GtfB-Struktur angenommen wurde. Bis heute gibt es nur zwei Beispiele dafür, wie durch gezielte Modifizierung eines GT-B-Enzyms dessen Substratspezifität verändert wurde (siehe Abschnitt 5.2.2).^[208–210] Entsprechende Experimente mit GT-A-Enzymen waren geringfügig erfolgreicher.^[211]

4.3. Wirkungsweisen von Glycosyltransferasen

Um das aktive Zentrum einer GT gezielt modifizieren zu können, um etwa die Substratspezifität zu verändern, muss die genaue Wirkungsweise des Enzyms bekannt sein. Je nach stereochemischem Verlauf der Glycosyltransferreaktion können GTs als konfigurationsumkehrend oder konfigurationserhaltend klassifiziert werden (Schema 15 a).^[212] Struktur-, Mechanismus- und Computerstudien an konfigurationsumkehrenden GTs sprechen für einen S_N2 -Mechanismus.^[197, 213–217] Wie in Schema 15 b gezeigt, erleichtern die einsamen Elektronenpaare des endocyclischen Sauerstoffatoms die Bildung einer Oxocarbenium-Zwischenstufe (oder eines Übergangszustands, siehe **195**), indem sie vor dem Angriff des Akzeptor-Nucleophils Elektronendichte in das σ^* -Orbital der anomeren C1-O1-Bindung schieben. Im Fall der konfigurationserhaltenden GTs ging man ursprünglich von einem zweifachen Verdrängungsmechanismus aus, der – analog zu den gut untersuchten konfigurationserhaltenden Glycosidasen^[218] – die anfängliche Bildung einer kovalenten Zucker-Enzym-Zwischenstufe (**196**, Schema 15 c) vorsah.^[212] Allerdings gelang es in Strukturuntersuchungen an mehreren konfigurationserhaltenden GTs nicht, geeignete Kandidaten für das vermutete Enzym-Nucleophil zu identifizieren.^[206, 219–223] Bei konfigurationserhaltenden GTs aus der GT-A-Familie wurde auch ein allgemeiner Mangel an konservierten Aminosäureresten auf der β -Seite des anomeren Kohlenstoffs festgestellt.^[224] Daher wurde ein alternativer Mechanismus vorgeschlagen, demzufolge der nucleophile Akzeptor den anomeren Kohlenstoff von derselben Seite des Zuckerrings angreift, an der die NDP-Abgangsgruppe austritt und einen asynchronen Übergangszustand mit hoch dissoziativem Oxocarbenium-Charakter erzeugt (**197**, Schema 15 d).^[219, 220, 224, 225]

4.4. Zusammenfassung der biochemischen Arbeiten zu Glycosyltransferasen

Trotz der Bedeutung der GTs für die Regelung der Glycosylierungsmuster von Naturstoffen wurden überraschend wenige GT-Aktivitäten *in vitro* bestimmt, obschon einige GT-Funktionen durch Gen-Knockout und heterologe Expression abgeleitet wurden. Eine Übersicht über 167 bekannte und vermutete bakterielle niedermolekulare GTs ist in Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen gegeben. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen GTs, die in Antibiotikabiosynthesen auftreten, wurde in einer früheren Übersicht zusammengefasst.^[226] Die meisten dieser Enzyme gehören zur Glycosyltransferasefamilie 1 (GT-1),^[190] bestehend aus GT-B-Enzymen, die die Glycosylierung unter Konfigurationsumkehr katalysieren. Die Makrolidresistenz-GT OleD, die UDP-Glucose als Zuckerdonor verwendet, war die erste Makrolid-GT, die *in vitro* charakterisiert wurde.^[227] Studien an OleD deuteten auf einen geordneten, sequenziellen kinetischen Mechanismus hin, demzufolge das Akzeptorsubstrat vor dem UDP-Zucker gebunden wird, um den ternären Michaelis-Komplex zu bilden. Nach dem Glycosyltransfer setzt das Enzym zuerst UDP frei und dann das glycosylierte Pro-



Schema 15. Mechanismen von Glycosyltransferasen. a) Mögliche stereochemische Verläufe GT-katalysierter Reaktionen. b) Direkter Verdrängungsmechanismus, wie er für konfigurierungsumkehrende GTs vorgeschlagen wurde. c) Doppelter Verdrängungsmechanismus, wie er für konfigurierungserhaltende GTs vorgeschlagen wurde. d) Alternativer Mechanismus für konfigurierungserhaltende GTs, der einen nucleophilen Angriff an derselben Seite des Zuckermoleküls vorsieht, an der die Abgangsgruppe austritt. e) Vorgeschlagene Mechanismen für die Bildung einer Aryl-C-glycosidischen Bindung. f) UrdGT2 katalysiert die Bildung von C- (198 → 199) und O-glycosidischen Bindungen (200 → 201).

dukt. Kristallographische Studien an anderen konfigurierungsumkehrenden GT-B-Enzymen, in denen die Bindung von NDP an den GT-Aglycon-Komplex einen Konformationswechsel zu einem geschlossenen Zustand bewirkt, stützen diesen kinetischen Mechanismus.^[202–205] Es wird erwartet, dass viele konfigurierungsumkehrende GT-B-Enzyme der GT-1-Familie nach einem ähnlichen kinetischen Mechanismus agieren.

Mehrere Makrolid-GTs benötigen ein Hilfsprotein für einen effizienten Glycosyltransfer.^[228,229] Die Gene für die Glycosyltransferase und ihr entsprechendes Hilfsprotein sind in den jeweiligen Biosynthesegenclustern fast immer in enger Nachbarschaft lokalisiert. Die translatierten Gensequenzen der Hilfsproteine zeigen moderate Homologie zu Cytochrom-P450-Enzymen, doch fehlt der konservierte Cys-Rest, der das Häm-Eisen koordiniert. Dass eine in Naturstoffbiosynthesen beteiligte GT ein Hilfsprotein benötigt, wurde erstmals für die Desosaminyltransferase DesVII und ihr Hilfsprotein DesVIII aus dem Methymycin/Pikromycin-Weg in *Streptomyces venezuelae* festgestellt.^[229] In einer anderen Studie wurde gefunden, dass die durch die Anthracyclin-GT AknS katalysierte Reaktion durch das Hilfsprotein AknT beschleunigt wird.^[230] Die Autoren schlugen vor, dass AknT als regulatorische Untereinheit fungiert, die vorübergehend mit AknS wechselwirkt, um es in einer aktiven Konformation zu halten oder den Übergangszustand für den Glycosyltransfer zu stabilisieren. Studien am EryCII/EryCIII-Glycosylierungssystem ergaben, dass die Erythromycin-GT (EryCIII) nach dem Entfernen ihres Hilfsproteins (EryCII) aus der Vorinkubationsmischung *in vitro* voll aktiv bleibt.^[231] Experimente mit dem DesVII/DesVIII-System lieferten ähnliche Ergebnisse.^[232] Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass die Hilfsproteine eine chaperonartige Funktion haben und einen einmaligen Konformationswechsel erleichtern, der ihre entsprechende GT aktiviert. Es sind weitere Untersuchungen an diesen Systemen erforderlich, um die genaue Funktion der GT-Hilfsproteine aufzuklären.

Obwohl die überwiegende Mehrheit der glycosylierten Naturstoffe O-Glycoside sind, findet man in Bakterien und Pflanzen auch Aryl-C-Glycoside.^[233] Für die C-GT-Katalyse sind zwei Mechanismen vorgeschlagen worden (Schema 15e).^[80] Im ersten Fall (Route A) wird zunächst ein O-Glycosid gebildet, das sich anschließend intramolekular zu einem *ortho*-C-Glycosid umlagert. Der zweite Mechanismus (Route B) beruht auf dem Angriff eines resonanzstabilisierten Phenolat-Anions am anome-

ren Kohlenstoffatom des NDP-Zuckerdonors, um die C-Glycosidbindung zu knüpfen. Obwohl keiner der Mechanismen experimentell nachgeprüft wurde, ist die direkte Bildung einer C-Glycosidbindung besonders interessant für Naturstoffe, die C-Glycosylsubstituenten sowohl *ortho* als auch *para* zur aktivierenden Phenolatgruppe tragen.^[233] Einige Naturstoffe, wie Gilvocarcin und Enterobactin, enthalten nur *para*-C-Glycoside, die über eine O-Glycosylierungs-/Umlagerungssequenz schwer zu bilden wären.^[18,234,235]

Neuere Studien mit UrdGT2, einer C-GT in der Biosynthese von Urdamycin in *Streptomyces fradiae* Tü2717, haben wichtige Erkenntnisse zum Mechanismus der C-Glycosylierung geliefert (Schema 15 f). Während die C-GT-Aktivität (**198** → **199**) von UrdGT2 bereits nachgewiesen worden war, führte die Fütterung des alternativen Aglycon-Substrats (**200**) an eine Mutante von *S. fradiae*, die das Wildtyp-Aglycon nicht biosynthetisieren konnte, aber noch UrdGT2 exprimierte, zur Produktion des O-Glycosids **201**.^[236] Diese Studie konnte erstmals nachweisen, dass eine Naturstoff-GT sowohl C- als auch O-Glycosidbindungen knüpfen kann. Zudem stützen diese Befunde den direkten C-Glycosylierungsmechanismus, weil die anfängliche O-Glycosylierung von **200** mit anschließender O-O-Umlagerung nicht begünstigt ist. Die vor kurzem aufgeklärte Röntgenkristallstruktur von UrdGT2 ließ erkennen, dass das anomere Kohlenstoffatom des NDP-Zucker-Substrats in enger Nachbarschaft zum C-9 des Aglycon-Substrats bindet und richtig positioniert ist für eine direkte Addition an den aromatischen Ring.^[207] Asp137 wurde als diejenige Base vorgeschlagen, die die Aglycon-Phenolatgruppe über ein im aktiven Zentrum fest gebundenes Wassermolekül deprotoniert.

Eine verblüffende Feststellung aus den GT-Studien ist, dass viele dieser Enzyme eine bemerkenswert breite Substratspezifität für ihre Aglycon- und NDP-Zucker-Substrate aufweisen. Zum Beispiel akzeptiert VinC, eine GT im Vicenistatin-Biosyntheseweg aus *Streptomyces halstedii* HC34, in vitro die α - und β -Anomere von D- und L-Zuckern.^[237] GtfE, die GT des Vancomycin-Biosynthesewegs, toleriert 30 unterschiedliche NDP-Zucker.^[238] Das DesVII/DesVIII-System akzeptiert ebenfalls zahlreiche cyclische und lineare Aglycon-Substrate^[239–241] sowie etliche NDP-Zucker.^[232] Die Substratflexibilität vieler GTs wurde auch in vivo nachgewiesen.

Insgesamt haben diese Studien für Fortschritte im Bereich des Stoffwechsel-Engineerings, der kombinatorischen Biosynthese und der enzymatischen Glycodiversifizierung in vitro gesorgt, was zum Aufbau neuer Naturstoffderivate mit veränderten Glycosylierungsmustern geführt hat. Einige dieser neueren Arbeiten zum Glycoengineering werden im nächsten Abschnitt behandelt.

5. Glycoengineering von Naturstoffen

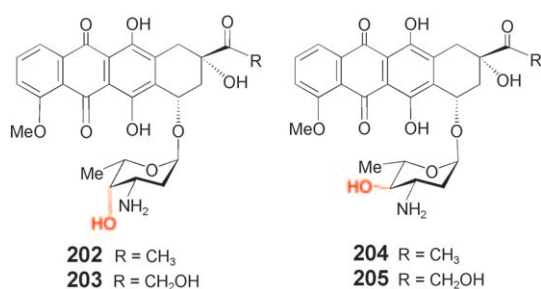
Ein großer Teil der biologisch aktiven Naturstoffe ist glycosyliert. Da die Zuckerreste häufig für die Bioaktivität wichtig sind,^[5,7] können durch Verändern der Glycosylierungsmuster der Ausgangsstrukturen (ein Vorgang, der als Glycodiversifizierung, Glycorandomisierung oder Glycooptimierung bekannt ist) modifizierte Moleküle mit neuen

Aktivitäten entstehen. Dementsprechend wurden in den letzten Jahren etliche Strategien (in vivo und in vitro) entwickelt, um die Biosynthesemaschinerie (d.h. die Enzyme) so zu manipulieren, dass neue Glycoformen erzeugt werden können. Gegenüber den konventionellen Methoden der chemischen Synthese und Derivatisierung haben diese Methoden einige Vorteile: 1) Die Stereo- und Regioselektivität enzymkatalysierter Reaktionen ergibt im Allgemeinen selektive Produkte mit definierter Konfiguration. 2) Der produzierende Organismus ist eine nachwachsende Quelle für das gewünschte Produkt. 3) Die Produktion der Zielverbindungen durch Fermentation kann leicht auf größere Maßstäbe übertragen werden. 4) Sowohl die In-vivo- als auch die In-vitro-Strategien sind für den Aufbau von kombinatorischen Verbindungsbibliotheken geeignet. In den folgenden Abschnitten werden einige ausgewählte In-vivo- und In-vitro-Experimente besprochen, die zur gezielten Modifizierung von Naturstoffzuckern entworfen wurden. Es gibt mehrere hervorragende Übersichten zu diesem Thema, die zur Vertiefung hinzugezogen werden können.^[150,181,242–253]

5.1. In-vivo-Glycodiversifizierung

Die Biosynthese ungewöhnlicher Zucker wurde in den letzten Jahren immer besser verstanden, wodurch sich neue Ansätze für die biosynthesebasierte Glycodiversifizierung ergeben haben, um Naturstoffe mit veränderten Zuckerstrukturen herzustellen. In frühen Studien zur Tylosin-Biosynthese in *Streptomyces fradiae* ergab z.B. die randomisierte Mutagenese Stämme von *S. fradiae* mit defekter Biosynthese oder defekter Anbindung der drei Tylosinzucker Mycamino- se, Mycarose und Mycinose.^[51] Die Erkenntnisse, die aus diesen Geninaktivierungsexperimenten erhalten wurden, ließen sich für die Herstellung neuer glycosylierter Naturstoffe nutzen. So entwickelte man verfeinerte In-vivo-Glycodiversifizierungsstrategien, die die heterologe Expression von Genen miteinbeziehen. Solche Strategien wurden im Stoffwechsel-Engineering und für kombinatorische Biosynthesen eingesetzt.^[254–256]

Die Verwendung von Zellen als Katalysatoren, um chemische Reaktionen an exogenen Molekülen durchzuführen, wird als Biotransformation bezeichnet. Vorstufengesteuerte Biosynthese^[257] und Mutasynthese^[258] sind zwei etablierte Biotransformationsprozesse, in denen eine Biosynthesevorstufe eines Naturstoffs durch ein Struktur analogon ersetzt wird, indem dieses an einen Wildtyp-Stamm (vorstufengesteuerte Biosynthese) oder eine Mutante mit Gendisruption (Mutasynthese) verfüttert wird. Zwei neuere Methoden sind das Stoffwechsel-Engineering^[259] und die kombinatorische Biosynthese.^[260] Das Grundprinzip dieser Methoden beruht darauf, Gene aus unterschiedlichen Organismen zu kombinieren und in einem einzigen Wirtstamm zu exprimieren, um so die biosynthetischen Zwischenstufen zu neuen Endprodukten umzuleiten. Derlei heterologe Expressionen können im Wildtyp-Stamm oder in Knock-out-Mutanten vorgenommen werden. In letzterem Fall bewirkt die Mutation die Anreicherung einer spezifischen Biosynthesezwischenstufe durch Unterbrechung einer nachgeschalteten Stufe des Re-



Schema 16. Entwurf für die Synthese eines nichtnatürlichen Zuckers in *Streptomyces peucetius*. Die axiale C4-OH-Konfiguration (rot hervorgehoben) der Daunosamineinheit von Daunorubicin (**202**) und Doxorubicin (**203**) wurde in den Verbindungen **204** und **205** in eine äquatoriale Konfiguration überführt, indem ein einzelnes Gen der L-Daunosamin-Biosynthese (*dnmV*) in *S. peucetius* gegen 4-Ketoreduktasegene der L-Oleandrose- (*avrE*) bzw. L-Mycarose-Biosynthese (*eryBIV*) ausgetauscht wurde.

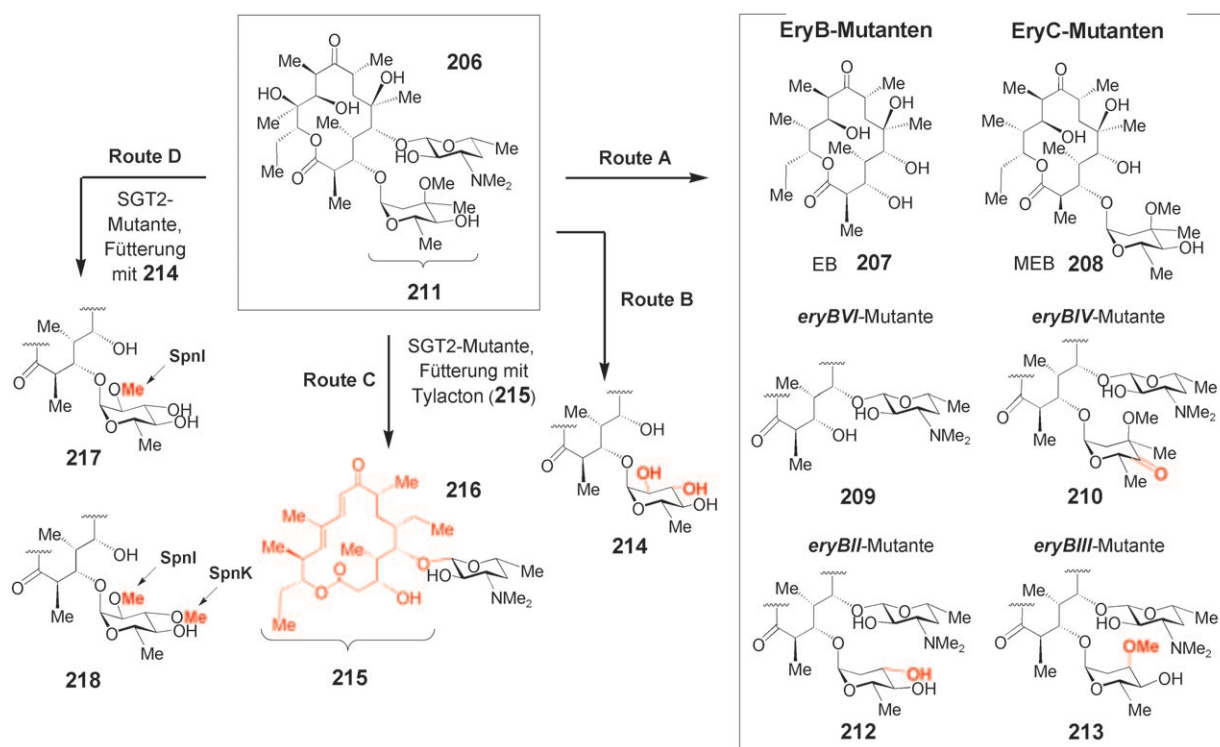
aktionswegs. Diese Zwischenstufe kann dann durch das heterolog exprimierte Enzym verarbeitet werden. Der Erfolg dieser Methoden ist der Substratpromiskuität der Zuckerbiosyntheseenzyme und GTs zu verdanken. Das Synthesepotenzial dieser Techniken kann weiter ausgearbeitet werden, wenn sie in Verbindung mit Vorstufenfütterung oder Bio-konversionsexperimenten durchgeführt werden.

Ein elegantes frühes Beispiel für Glycoengineering, das Gendisruption und heterologe Expression verbindet, war die

Herstellung von 4'-Epidaunorubicin (**204**) und 4'-Epidoxorubicin (oder Epirubicin, **205**),^[256] therapeutisch nützlichen Analoga der Tumortheraeutika Daunorubicin (**202**) bzw. Doxorubicin (**203**) (Schema 16). In dieser Studie wurde das 4-Ketoreduktase-Gen *dnmV* aus dem letzten Schritt der Biosynthese des TDP-L-Daunosamins (**53**, Schema 5) im *Streptomyces peucetius*-Wirt ausgeschaltet^[256] und durch *avrE* oder *eryBIV* ersetzt, die für die entsprechende epimere 4-Ketoreduktase aus den L-Oleandrose- (**66**) bzw. L-Mycarose-Wegen (**71**) codieren (Schema 6). Die beiden letztgenannten Zucker haben eine äquatoriale 4-OH-Gruppe aus der axialen Reduktion der 4-Ketogruppe durch *AvrE* oder *EryBIV*. Der Austausch von *dnmV* durch eines der beiden Reduktasegene lieferte eine zweckmäßige Route zum Epidaunosamin. Dies war das erste Beispiel für eine gezielte In-vivo-Biosynthese eines nichtnatürlichen Zuckers, d.h. eines Zuckers, der vordem nicht in der Natur beobachtet worden war.

5.1.1. Erythromycin

In einem ähnlichen Experiment wurden mehrere Zuckerbiosyntheseenzyme im Gencluster für Erythromycin (**206**) aus *Saccharopolyspora erythraea* einzeln ausgeschaltet (Schema 17). Je nachdem, ob sich Erythronolid B (EB, **207**) oder Mycarosylerythronolid B (MEB, **208**) anreicherte, wurden diese Gene als EryB- oder EryC-Gene klassifiziert.^[57,65] Neben den Hauptprodukten EB oder MEB wurden



Schema 17. Bildung von Erythromycinderivaten in *Saccharopolyspora erythraea* mittels Gendisruption, heterologer Expression und Fütterungsexperimenten. Route A: Disruption einzelner L-Mycarose- (*eryB*) oder D-Desosamin-Biosyntheseenzyme (*eryC*) ergibt **207–210**, **212** und **213**. Route B: Heterologe Expression der Oleandrosyl-Transferase (*OleG2*) aus *Streptomyces antibioticus* in einer Mutante von *S. erythraea* ohne endogene Mycarosyltransferase (*EryBV*). Route C: Die Expression der Mycaminosyl-Transferase (*TylM2*) vom Tylosinweg in *Streptomyces fradiae* in einer Dreifachmutante von *S. erythraea* (SGT2) mit fehlerhaftem Desosaminyltransfer (*eryCIII*), Mycarosyltransfer (*eryBV*) und fehlerhafter Polyketidsynthese (*eryA*) ergibt **216**, wenn der Stamm mit Tyllacton (**215**) gefüttert wurde. Route D: Neue Erythromycinderivate (**217** und **218**), die entstanden, wenn O-Methyltransferasegene (*spnI* und *spnK*) aus *Saccharopolyspora spinosa* in der *S. erythraea*-SGT2-Mutante exprimiert wurden.

in diesen gendisruptierten Mutanten auch andere Derivate produziert (Schema 17, Route A). Zum Beispiel wurden kleine Mengen an Desosaminylerythronolid B (**209**) in einer *eryBVI*-Disruptionsmutante gefunden, was darauf hindeutet, dass in den EryB-Mutanten zum Teil noch ein Desosaminyltransfer stattfinden konnte.^[64] Disruption des 4-Ketoreduktase-Gens, *eryBIV*, führte zu einem Erythromycinanalogon **210** mit 4-Ketomycarose anstelle von L-Mycarose (**211**),^[57] und Disruption des 3-Ketoreduktase-Gens *eryBII* lieferte mehrere Nebenprodukte (eines davon ist **212**) mit 2,6-Didesoxyglucose anstelle von L-Mycarose.^[65] Ferner ergab die Disruption des C-Methyltransferase-Gens *eryBIII* ein Erythromycinderivat **213**, das 3-Desmethylmycarose anstelle von L-Mycarose aufwies.^[66] Mehrere auf diese Weise erhaltene Erythromycinanaloge behielten ihre Bioaktivität, wenn auch mit geringerer Wirksamkeit als Erythromycin A.

Die heterologe Expression fremder Glycosyltransferasen in verschiedenen Mutanten von *S. erythraea* wurde auch eingesetzt, um neue glycosylierte Makrolidformen herzustellen. Nach Expression des für die Desosaminyltransferase (OleG1) aus dem Oleandomycin-Weg codierenden Gens in einer *S. erythraea*-Mutante ohne endogene Desosaminyltransferase (EryCIII) setzte die Produktion von Erythromycin A (**206**) wieder ein,^[261] was die vorgeschlagenen Funktionen für EryCIII und OleG1 belegte. Wenn das Gen, das für die Oleandrosyltransferase OleG2 des Oleandomycin-Wegs codiert, in einer *S. erythraea*-Mutante ohne Mycarosyltransferase EryBV exprimiert wurde (Schema 17, Route B), wurden neue Erythronolidderivate **214** gebildet, die eine mit dem O-3 des Aglycons verknüpfte L-Rhamnose-Einheit tragen. Interessanterweise werden diese 3-O-L-Rhamnosylerythronolidderivate auch gefunden, wenn OleG2 im Wildtypstamm exprimiert wurde, was nahelegt, dass die heterolog exprimierte OleG2 mit der endogenen GT um den Zuckertransfer zur 3-OH-Position des Aglycons konkurrieren könnte.

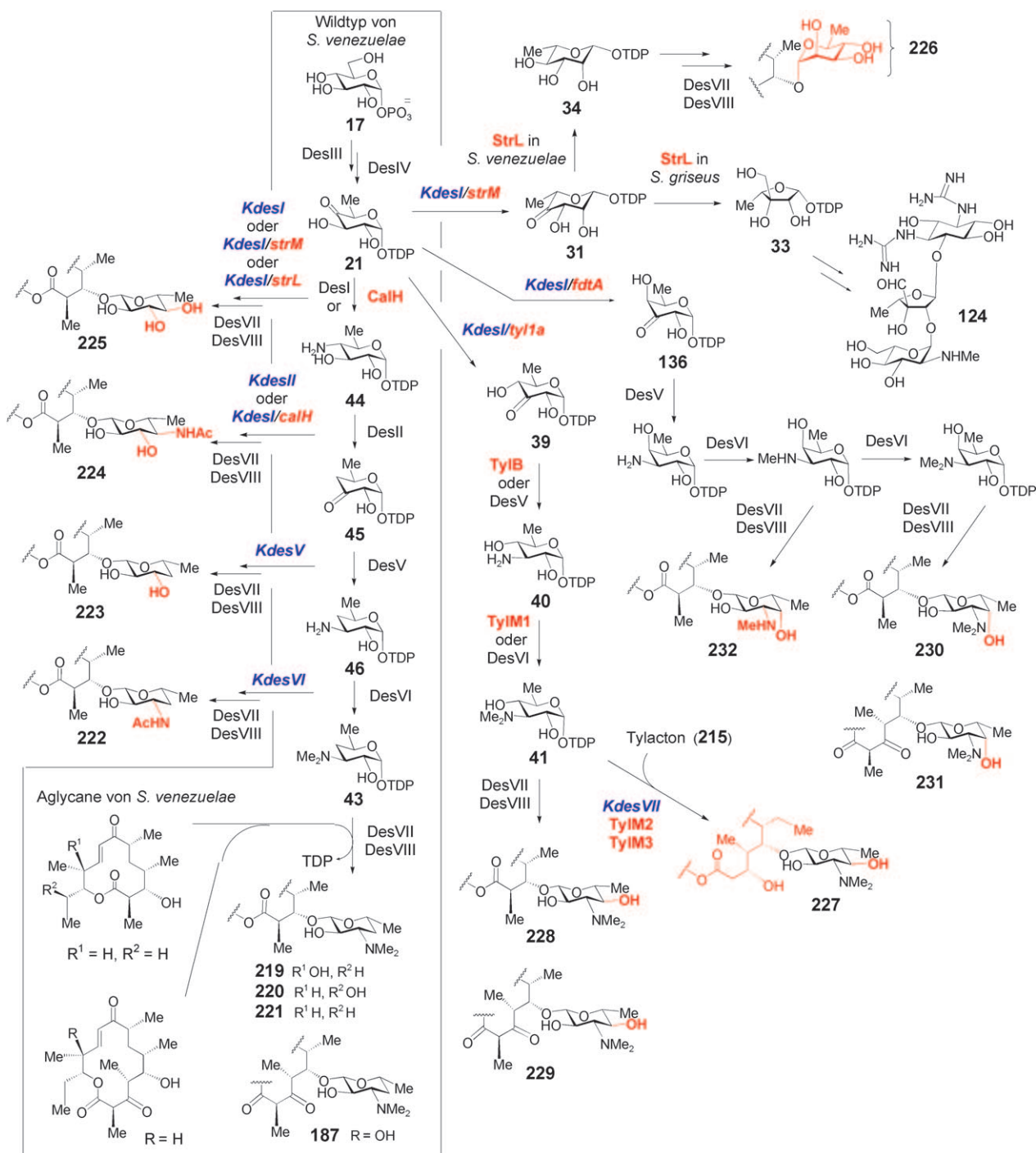
In einer anderen Studie wurde das für die Mycaminosyltransferase (TylM2) im Tylosin-Biosyntheseweg in *Streptomyces fradiae* codierende Gen in das Chromosom einer dreifachen *S. erythraea*-Mutante (als SGT2 bezeichnet) eingebaut, der die endogenen Glycosyltransferasegene *eryCIII* und *eryBV* sowie das Polyketidsynthasegen *eryA* fehlten.^[262] Wenn die Zellkulturen der Mutante mit Tyllacton (**215**) gefüttert wurden, produzierten sie 5-O-Desosaminyltyllacton (**216**) (Schema 17, Route C). Dies zeigt, dass die heterolog exprimierte TylM2 den von *S. erythraea* produzierten nichtnatürlichen Desosaminzucker erkennt und mit seinem natürlichen Aglycon (**215**) kuppelt. Schließlich bewies die einzelne Expression mehrerer L-Rhamnosyl-O-Methyltransferasen des Spinosyn-Biosynthesewegs in *Saccharopolyspora spinosa* in der SGT2-Dreifachmutante, dass zwei dieser Methyltransferasen (SpnI und SpnK) nacheinander die 2'- bzw. 3'-OH-Gruppen von exogen gefüttertem 3-Rhamnosylerythronolid B (**214**) unter Bildung von **217** und **218** am Sauerstoff methylieren konnten (Schema 17, Route D).^[263]

5.1.2. Methymycin/Pikromycin

TDP-D-Desosamin (**43**) ist der Zuckerdonor in der Methymycin- und Pikromycin-Biosynthese (**219–221**, **187**) in *Streptomyces venezuelae*. Wie in Schema 18 gezeigt, führte die Inaktivierung des Dimethyltransferasegens *desVI* zur Anreicherung von Makrolidanaloga mit 3-N-Acetylamino-3,4,6-tridesoxy-D-glucose (**222**) anstelle von D-Desosamin.^[67] Ähnlich führte die Disruption des Aminotransferasegens *desV* zu Analoga mit 4,6-Didesoxy-D-glucose (**223**).^[68] Disruption des *desII*-Gens ergab Analoga mit 4-N-Acetylamino-4,6-didesoxy-D-glucose (**224**)^[72] und Disruption des *desI*-Gens Analoga mit 6-Desoxy-D-glucose (D-Quinovose) (**225**).^[264] Die Ketoreduktion an C-4 und C-3, um die entsprechenden Hydroxygruppen in **223** und **225** zu erhalten, und die Acetylierung, um die N-Acetylaminogruppen in **222** und **224** zu bilden, werden durch Enzyme katalysiert, die nicht im *pik*-Cluster codiert sind. Diese Enzyme können Teil der Biosynthesemaschinerie der Zelloberflächenpolysaccharide sein, oder sie könnten an anderen Naturstoffwegen im Wirt beteiligt sein. Sie treten in Kraft, wenn sich die passenden „nichtnatürlichen“ Zwischenstufen anreichern. Offensichtlich ist die opportunistische Mitwirkung einiger Enzyme an Stoffwechselwegen eine gute Möglichkeit, die Diversität von Zuckerstrukturen zu erhöhen.

Wie oben beschrieben, reichert sich TDP-4-Keto-6-desoxyglucose (**21**), eine Zwischenstufe im Desosamin-Biosyntheseweg, in der *KdesI*-Mutante von *S. venezuelae* an. Wenn eine vorhergesagte 4-Aminotransferase (CalH) vom Calicheamicinproduzenten *Micromonospora echinospora* in der *KdesI*-Mutante exprimiert wurde, konnten Derivate mit dem 4-N-Acetyl-4,6-didesoxyzucker **224** isoliert werden.^[265] In einer separaten Studie wurde das gleiche Chinovosylmethinolidderivat **225** erhalten, wenn die putativen TDP-4-Keto-3,5-Epimerase- (*strM*) und TDP-Streptosesynthase-Gene (*strL*) aus dem Streptomycinproduzenten *Streptomyces griseus* einzeln in der *KdesI*-Mutante exprimiert wurden.^[27] Wenn jedoch beide Gene zusammen in dieser Mutante exprimiert wurden, wurden neue Makrolidderivate mit einem L-Rhamnose-Substituenten (**226**) gebildet. Diese Studie enthüllte nicht nur eine unerwartete 4-Ketoreduktase-Aktivität von StrL, sondern zeigte auch, dass die Desosaminyltransferase DesVII sowohl D- als auch L-Zuckerdonoren umsetzen kann.

Mehrere neue Makrolidderivate wurden hergestellt, indem unterschiedliche Kombinationen von D-Mycaminose-Biosynthesegenen (**21** → **41**, Schema 18) aus dem Tylosinproduzenten *S. fradiae* heterolog in Mutanten von *S. venezuelae* exprimiert wurden.^[55] Zuerst wurden die Gene *tylM1/B/M2/M3* in einer *KdesI/KdesVII*-Mutante exprimiert, der die Desosaminyltransferase (DesVII) fehlte und die daher **21** anreichern sollte. Von diesen vier *tyl*-Genen wurde ursprünglich angenommen, dass sie den vollständigen Satz an Mycamino-Biosynthesegenen umfassen. Wenn jedoch die Kulturen der Mutante mit Tyllacton (**215**) gefüttert wurden, erhielt man ein 5-O-Chinovosyltyllactonderivat.^[55] Dieser Befund spiegelte nicht nur die relaxierte Toleranz der Mycaminosyltransferase (TylM2) für ihren TDP-Zuckerdonor wider, sondern deutete außerdem darauf hin, dass der früher



Schema 18. Stoffwechsel-Engineering im Methymycin/Pikromycin-Produzenten *Streptomyces venezuelae*. Der natürliche Biosyntheseweg für TDP-Desosamin (**43**) und die glycosylierten Methymycin/Pikromycin-Derivate (**187**, **219–221**), die von *S. venezuelae* produziert werden, sind eingezeichnet. Die Disruption einzelner *des*-Gene (blau hervorgehoben) wurde mit der heterologen Expression fremder Gene (rot) kombiniert, um eine Vielfalt an neuen glycosylierten Makrolidderivaten (**222–232**) aufzubauen.

vorgeschlagene Mycaminose-Weg unvollständig war. Ein verwaister offener Leserahmen (ORF, open reading frame) im Tylosin-Gencluster *tylIIa* wurde später identifiziert und in der *KdesI/KdesVII*-Mutante von *S. venezuelae* zusammen mit *tylM1/B/M2/M3* exprimiert. Wurde dieser Stamm mit Tylacton (**215**) gefüttert, wurde ein neues Tylosinderivat **227** mit einem 5-*O*-Mycaminosyl-Substituenten erhalten.^[55] Wenn

tylla einzeln in der *KdesI*-Mutante exprimiert wurde, wurden interessanterweise neue Methymycin/Pikromycin-Derivate wie **228** und **229** isoliert, die einen Mycaminosylrest trugen. Diese Experimente bewiesen den TDP-D-Mycaminose-Weg (**21** → **39** → **40** → **41**) schlüssig und verwiesen auf die relative Substratspezifität der DesV, DesVI und DesVII/DesVIII.

Wenn schließlich in einer *KdesI*-Mutante *tyl1a* durch *fdtA* (eine 3,4-Ketoisomerase aus *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, die die Umwandlung **21** → **136** katalysiert) ersetzt wurde, entstanden neue Makrolidderivate, die entweder einen 4-*epi*-D-Mycaminose- (**230** und **231**) oder einen 3-*N*-Monomethyl-3-desoxy-D-fucose-Substituenten (**232**) enthielten.^[266] Da keiner dieser Zucker in der Natur vorkommt, veranschaulicht diese Arbeit abermals das Potenzial der Zuckerbiosyntheseenzyme zur Herstellung neuer nichtnatürlicher Zuckerstrukturen. Zusätzlich zeigen diese Resultate, dass viele Enzyme des Desosamin-Weges, einschließlich DesV, DesVI und DesVII/DesVIII, Zuckerdonoren mit einer axialen 4-OH-Gruppe tolerieren. Wie durch diese und andere Studien^[232, 239, 240, 267, 268] erwiesen ist, zeigt das DesVII/DesVIII-Paar eine bemerkenswert relaxierte Substratspezifität gegenüber seinen Zucker- und Aglycon-Substraten.

5.1.3. Elloramycin

Das erste beschriebene Beispiel für eine In-vivo-Glycodiversifizierung, die auf der heterologen Expression von Biosynthesegenen beruht, betraf die Expression eines Cosmids (16F4), das den größten Teil des Biosynthesegenclusters von Elloramycin (**233**, Schema 19a) aus *Streptomyces olivaceus* enthält, im Urdamycinproduzenten *Streptomyces fradiae* Tü2717.^[254] Der resultierende Stamm produzierte das hybride Elloramycinderivat 8-Demethyl-8-β-D-olivoyltetracenomycin C (**234**, Schema 19b). Der Zuckerdonor TDP-D-Olivose wurde über den Urdamycin-Weg geliefert und das Aglycon (8-DMTC, **235**) durch das heterolog exprimierte Cosmid 16F4 produziert. Spätere Experimente bestätigten, dass die substratflexible GT, die für die Bildung von **234** zuständig ist, die auf dem Cosmid 16F4 codierte ElmGT war. In dieser Arbeit wurde das Cosmid 16F4 in eine Mutante von *Streptomyces fradiae* Tü2717 transformiert, in der mehrere für die Bildung des Urdamycin-Aglycons essenzielle Gene entfernt waren (ΔPKS). Das Cosmid 16F4 wurde auch in einen Wildtyp und eine PKS-Mangelmutante der Mithramycin (**236**) produzierenden *Streptomyces argillaceus* transformiert.^[269] Expression des Cosmids 16F4 in *S. fradiae* ΔPKS führte zu erhöhten Ausbeuten an **234** und auch zu einer neuen Hybridverbindung (**237**), die den Urdamycinzucker L-Rhodinose enthielt. Wurde das Cosmid im Wildtyp oder ΔPKS *S. argillaceus* exprimiert, dann wurde wieder **234** gebildet, zusammen mit 8-Demethyl-8-β-D-mycarosyltetracenomycin C (**238**) und der Disaccharid-enthaltenden Verbindung 8-Demethyl-8-β-D-olivo-3'-1''-β-D-olivoyltetracenomycin C (**239**). Wenn Stämme von *S. fradiae* Tü2717/ΔPKS und *S. argillaceus* in Abwesenheit des Cosmids 16F4 mit **235** gefüttert wurden, erhielt man kein glycosyliertes Tetracenomycinderivat, was fest beweist, dass ElmGT (codiert durch das Cosmid 16F4) die für die Bildung der Tetracenomycinanaloge zuständige GT ist.

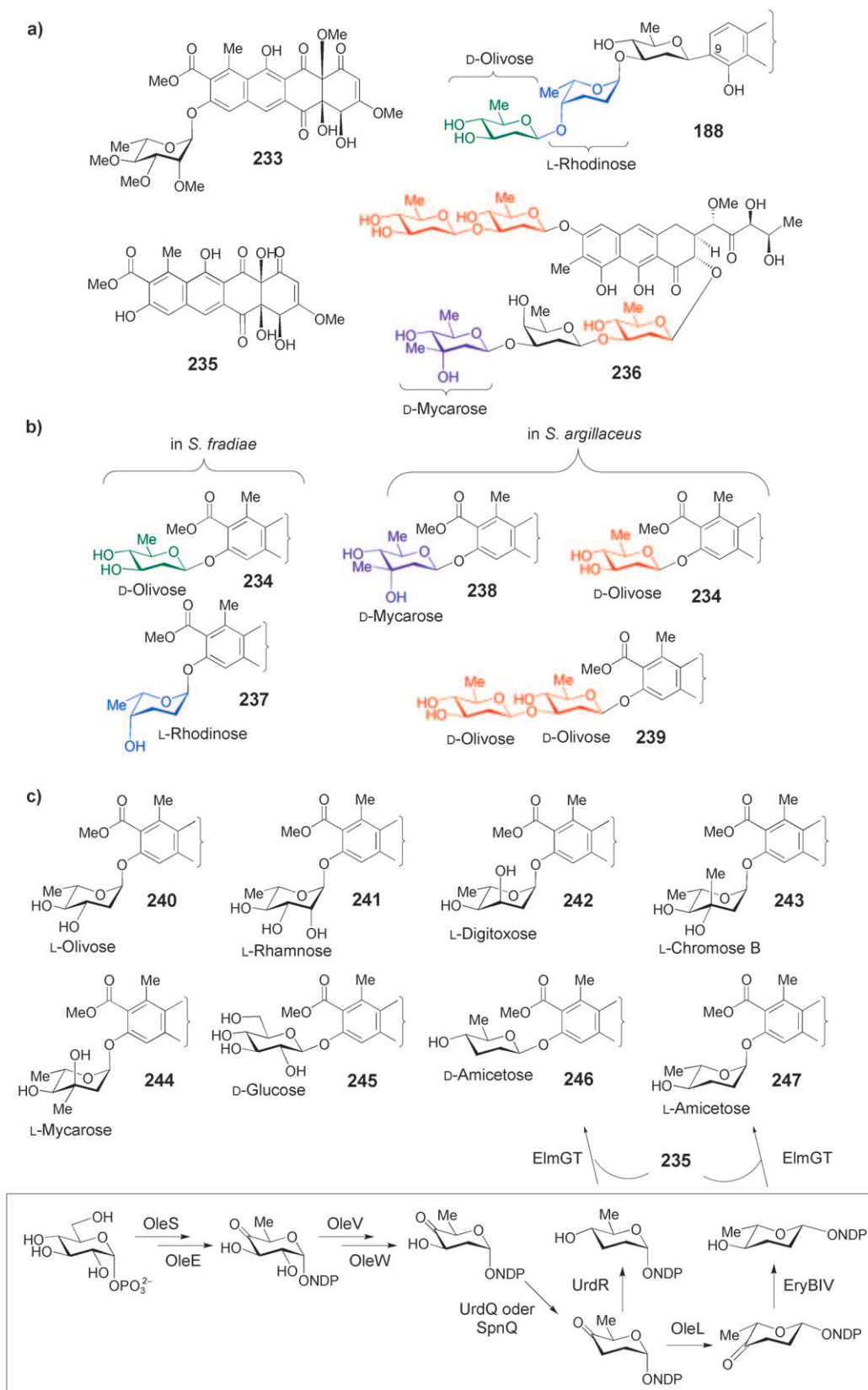
ElmGT wurde anschließend in das Chromosom von *Streptomyces albus*, einem nichtproduzierenden Stamm, eingebaut. Dieser Stamm wurde mit mehreren Plasmiden, die für die Produktion verschiedener NDP-Zucker codieren, transformiert, und jedem der resultierenden Stämme wurde dann 8-DMTC (**235**) verabreicht.^[270] In diesen Experimenten

wurde nachgewiesen, dass ElmGT L-Olivose und L-Rhamnose (ihr natürliches Zuckersubstrat) an **235** anlagert, wobei **240** bzw. **241** gebildet werden (Schema 19c). In einer anderen Serie kombinatorischer Biosynthesestudien wurde Cosmid 16F4 in *Streptomyces lividans* (auch ein nichtproduzierender Stamm) transformiert, zusammen mit Plasmiden, die für die Produktion von NDP-L-Digitoxose,^[271] NDP-4-Desacetyl-L-chromose B^[272] und NDP-L-Mycarose codieren.^[272] Jeder dieser Stämme produzierte die entsprechenden glycosylierten 8-DMTC-Analoga (**242–244**). Es wurde auch eine glucosylierte 8-DMTC-Verbindung (**245**) erhalten, was die ungewöhnliche Toleranz der ElmGT für einen Zucker mit einer 6-OH-Gruppe zeigt.^[271] In einem eindrucksvollen Experiment wurden schließlich Gene aus vier verschiedenen Desoxyzucker-Biosynthesewegen auf einem einzigen Vektor vereint und in *S. lividans* 16F4 co-exprimiert, um D- und L-Amicetosyl-8-DMTC-Derivate (**246** bzw. **247**) herzustellen.^[273] Insbesondere da Biosynthesegencluster für D-Amicetose nicht verfügbar sind, illustriert dieses Experiment die Leistungsfähigkeit der kombinatorische Biosynthese beim Aufbau von Zuckerstrukturen, basierend allein auf der Betrachtung anderer Biosynthesewege.

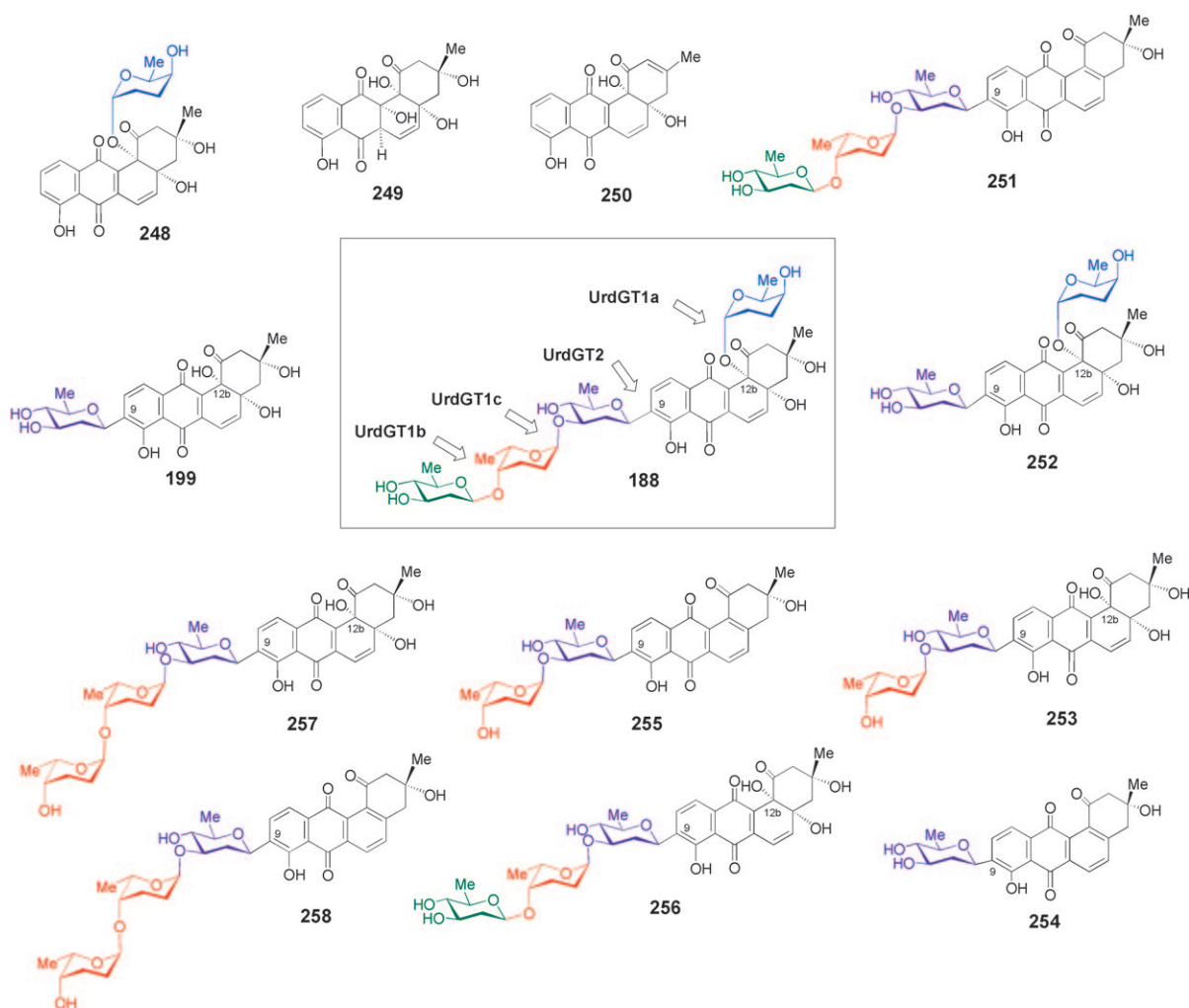
5.1.4. Urdamycin

Urdamycin A (**188**, Schema 20), produziert durch *Streptomyces fradiae* Tü2717, ist ein Antibiotikum und Antikrebsmittel vom Angucyclin-Typ. Das Urdamycin-Aglycon hat einen O-verknüpften L-Rhodinoserest an C-12b und ein C-gebundenes D-Olivose-L-Rhodinose-D-Olivose-Trisaccharid an C-9. Um die Funktionen der vier im Gencluster von Urdamycin A codierten GTs sowie die Reihenfolge der Glycosylierungsschritte aufzuklären, wurden einige Mutanten von *S. fradiae* entwickelt, in denen einzelne GTs oder Kombinationen von GTs inaktiviert waren. Dies führte zu mehreren Urdamycinderivaten (**248–258**) mit nichtnatürlichen Glycosylierungsmustern (Schema 20).^[274, 275] Wenn das *urdGT2*-Gen inaktiviert war, reicherten sich die Urdamycinmetabolite **248–250** an, denen die Trisaccharideinheit an C-9 fehlte, was darauf hinwies, dass UrdGT2 die C-GT ist. Interessanterweise zeigte **250** eine viel bessere Antitumoraktivität als die Stammverbindung Urdamycin A.^[274] In ähnlichen Knockout-Experimenten wurde UrdGT1a als die C-12b-L-Rhodinosyl-Transferase identifiziert, während UrdGT1c und UrdGT1b als die Rhodinosyl- bzw. Olivoyl-Transferasen erkannt wurden, die das Trisaccharid aufbauen. Wenn *urdGT1c* im *urdGT1c*-Knockout-Stamm überexprimiert wurde, baute UrdGT1c einen zweiten L-Rhodinoserest in die Trisaccharidkette ein und bildete **257** und **258**.

In einer anderen Studie wurden mehrere Desoxyzucker-Biosynthesegene von Urdamycin A in *S. fradiae* einzeln inaktiviert.^[102] Die Knockout-Stämme *urdZ3*, *urdQ* und *urdZ1* reicherten jeweils Urdamycinon B an (**254**, siehe Schema 20), was die essenziellen Funktionen dieser Gene in der Biosynthese von L-Rhodinose widerspiegelt (Schema 21). Überraschenderweise lieferte die Inaktivierung der für die Synthese von TDP-D-Olivose (**79**) notwendigen 4-Ketoreduktase (UrdR) Urdamycin M (**259**), das eine D-Rhodinose-Einheit (**260**) anstelle der normalerweise produzierten L-Rhodinose



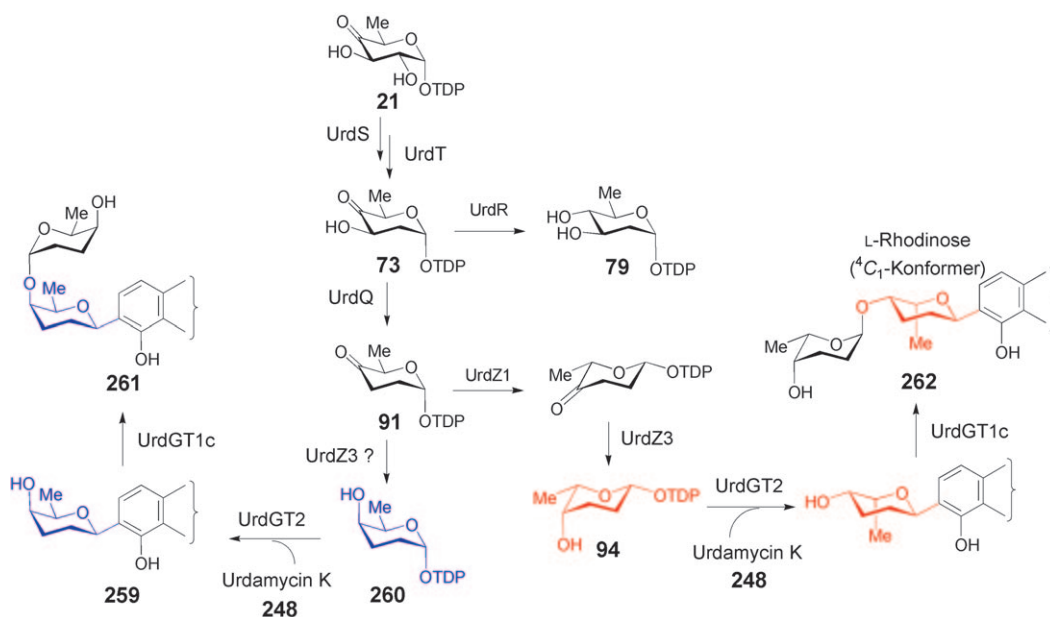
Schema 19. Relaxierte Substratspezifität von ElmGT, einer L-Rhamnosyl-Transferase der Elloramycin-Biosynthese in *Streptomyces olivaceus*, für NDP-Zucker. a) Natürlich vorkommende aromatische Polyketide: Urdamycin A (**188**), produziert durch *Streptomyces fradiae*, Elloramycin (**233**), produziert durch *Streptomyces olivaceus*, Mithramycin (**236**), produziert durch *Streptomyces argillaceus*, und das 8-DMTC-Aglycon (**235**), das durch das Cosmid 16F4 aus *Streptomyces olivaceus* codiert wird. b) Hybride aromatische Polyketide, in vivo synthetisiert durch ElmGT, die vom Cosmid 16F4 in den heterologen Wirten *Streptomyces fradiae* (**234** und **237**) und *Streptomyces argillaceus* (**234**, **238** und **239**) exprimiert wurden. c) Neue aromatische Polyketide durch kombinatorische Biosynthese.



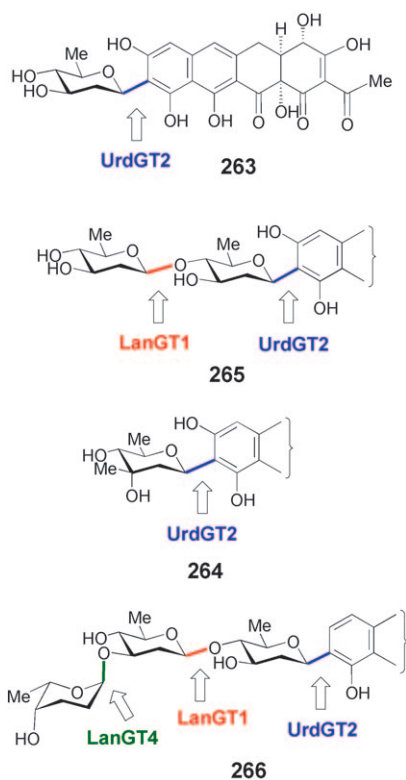
Schema 20. Flexibilität der Urdamycin-GTs gegenüber Akzeptorsubstraten, verdeutlicht am Beispiel von GT-Mutanten aus *Streptomyces fradiae*. Verschiedene Kombinationen der GTs von Urdamycin A (**188**) wurden deaktiviert, was zur Produktion unterschiedlich glycosylierter Derivate (**199**, **248–258**) in den entsprechenden GT-Mutantenstämmen in *S. fradiae* führte. Die Zuckerreste sind farblich gekennzeichnet, um zu verdeutlichen, welche Urdamycin-GT für die jeweilige Glycosylikupplung zuständig ist: blau UrdGT1a, grün UrdGT1b, rot UrdGT1c, violett UrdGT2.

(**94**) enthält, die über eine C-glycosidische Bindung an C-9 von **248** geknüpft ist. Es scheint daher, dass die Rhodinosyl-4-Ketoreduktase (UrdZ3) vor der UrdZ1-katalysierten C-5-Epimerisierung eine Rhodinosyl-Zwischenstufe (wie **91**) reduzieren kann. Die Zwischenstufe **91** kann sich in Abwesenheit von UrdR in unnatürlich großem Ausmaß anreichern, was zu erhöhten Konzentrationen von **260** führt, das dann durch UrdGT2 an **248** geknüpft werden kann. Diese Befunde ließen darauf schließen, dass UrdGT2 bezüglich seines NDP-Zuckerdonorsubstrats flexibel ist und sowohl TDP-D-Olivoose (**79**) als auch TDP-D-Rhodinoose (**260**) umsetzen kann. In einer späteren Studie mit der *urdR*[−]-Mutante aus *S. fradiae* wurde auch nachgewiesen, dass UrdGT1c einen L-Rhodinoose-Rest auf **259** übertragen kann, unter Bildung von Urdamycin R (**261**).^[276] UrdGT2 konnte auch L-Rhodinoose (**94**) an C-9 von **248** binden. Die resultierende Verbindung konnte dann durch UrdGT1c L-rhodinosyliert werden und ergab Urdamycin S (**262**). Folglich kann die UrdGT2 in vivo sowohl mit L- als auch mit D-Rhodinoose C-Glycoside synthetisieren.

UrdGT2 wurde in *Streptomyces-argillaceus*-Stämmen, denen die nativen Glycosyltransferasen für Mithramycin (**236**, Schema 19a) fehlten, heterolog exprimiert und war daraufhin befähigt, die Mithramycin-Desoxyzucker D-Olivoose und D-Mycarose an das Prämithramycinon-Aglycon zu koppeln (unter Bildung von **263** bzw. **264**, Schema 22). Die Kupplung erfolgte über C-glycosidische Bindungen an Positionen des Aglycons, die gewöhnlich nicht glycosyliert werden.^[277] Wenn UrdGT2 mit LanGT1 (einer D-Olivosyl-Transferase aus dem Landomycinproduzenten *Streptomyces cyanogenus* S136) im gleichen Stamm von *S. argillaceus* co-exprimiert wurde,^[277] entstand die Hybridverbindung **265**. Diese Verbindung bestand aus einem von *S. argillaceus* stammenden Aglycon und einem Disaccharid, das durch UrdGT2 und LanGT1 gemeinsam aufgebaut wurde. In einer separaten kombinatorischen Biosynthesestudie wurde die heterologe Expression von LanGT1 und LanGT4 (einer L-Rhodinosyl-Transferase) in einer dreifachen GT-Mutante von *S. fradiae* (*urdGT1a/-1b/-1c*) eingesetzt, um Urdamycin/Landomycin-Hybridverbindungen (wie **266**) herzustellen, die



Schema 21. Aus *Streptomyces fradiae* Tü2717 nach Disruption von Desoxyzucker-Biosynthesegenen isolierte Produkte.



Schema 22. Nach Expression in Glycosyltransferase-defizienten Mutanten des Mithramycinproduzenten *Streptomyces argillaceus* katalysierte UrdGT2 die Bildung von C-Glycosiden (**263** und **264**). Heterologe Expression von UrdGT2 und der D-Olivosyl-Transferase vom Landomycin-Weg in *Streptomyces cyanogenus* (LanGT1) in der gleichen Mutante von *S. argillaceus* lieferte Verbindung **265**. Expression von UrdGT2, LanGT1 und LanGT4 in einer Glycosyltransferase-defizienten Mutante von *S. fradiae* Tü2717 führte zur Produktion von **266**.

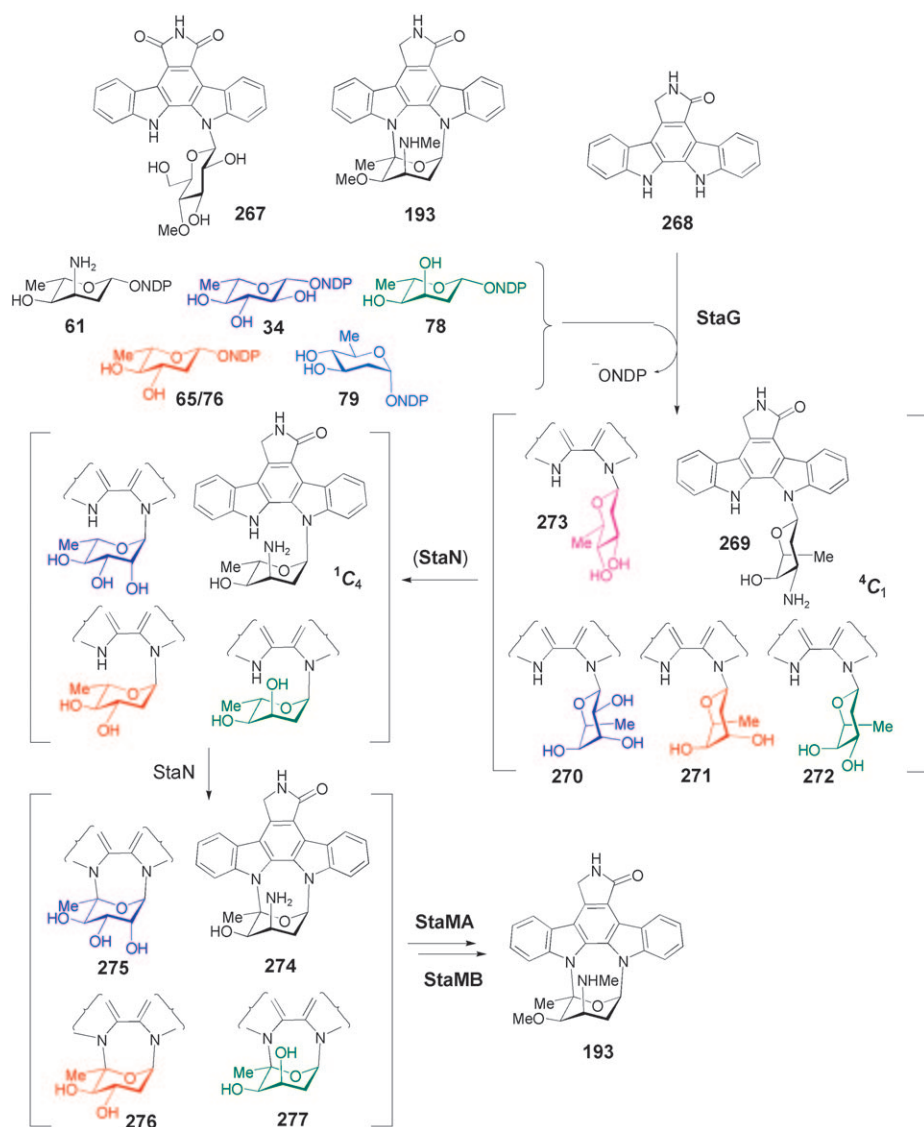
eine neue Trisaccharideinheit enthielten.^[278] Wie DesVII und ElmGT akzeptiert UrdGT2 eine Auswahl an NDP-Zucker- und Aglycon-Substraten und könnte sich daher als nützliches Werkzeug für die enzymatische Glycodiversifizierung von Aryl-C-Glycosiden herausstellen.

5.1.5. Indolocarbazole

Die Indolocarbazol-*N*-glycoside Rebeccamycin (**267**) aus *Saccharothrix aerocolonigenes* und Staurosporin (**193**), das von mehreren *Streptomyces*-Spezies produziert wird, sind Antitumorwirkstoffe mit

inhibierender Wirkung auf die DNA-Topoisomerase I bzw. die Proteinkinase (Schema 23). Durch heterologe Expression unterschiedlicher Kombinationen von *reb*- und *sta*-Genen im nichtproduzierenden Stamm *Streptomyces albus* konnte der Biosyntheseweg für die Rebeccamycin- und Staurosporin-Aglycone aufgeklärt werden. Mehrere neue Derivate wurden erhalten, von denen viele durch RebG *N*-glucosyliert waren.^[279] Neuere Experimente zeigten, dass in *E. coli* oder *S. lividans* exprimierte RebG mehrere exogen gefütterte Indolocarbazolderivate, darunter das Staurosporin-Aglycon (**268**), *N*-glucosylieren konnte.^[280] Interessanterweise katalysiert RebG nicht regioselektiv, da das Enzym jedes der N-Atome der asymmetrischen Indolocarbazole, die in dieser Studie verwendet wurden, glucosylieren kann.

In einer anderen Studie wurde die Biosynthese von Staurosporin in *S. albus* durch gemeinsame Expression der Biosynthesegene für das Staurosporin-Aglycon (**268**) und den Genen für L-Ristosamin und der putativen *N*-GT, StaG, rekonstituiert (Schema 23).^[74] Die transformierte *S. albus*-Mutante produzierte Holyrin A (**270**), eine Verbindung mit einer N-gebundenen 3-*N*-4-*O*-Didemethyl-L-ristosamin-Einheit in einer ⁴C₁-Konformation. Wenn *staN* (ein putatives Cytochrom-P450-Gen) in dieser *S. albus*-Mutante exprimiert wurde, produzierten die Zellkulturen Staurosporin, wodurch StaN als das für die Bildung der C5'-N-Bindung zuständige Enzym bestimmt wurde. Die Substratflexibilität der StaG wurde dann durch Transformation der Plasmide, die für die Produktion verschiedener Desoxyzucker (L-Rhamnose **34**, L-Digitoxose **78**, L-Olivose **65** und D-Olivose **79**) codieren, in den *S. albus*-Mutantenstamm überprüft. Eine HPLC-Analyse belegte, dass jeder der Stämme, die L-Desoxyzucker-Gene exprimierten, zwei neue Verbindungen produzierte, während der die D-Olivose-Gene exprimierende Stamm nur eine neue Verbindung synthetisierte. Spätere MS- und NMR-Analysen



Schema 23. Neue Indolocarbazole durch kombinatorische Biosynthese in *Streptomyces albus*. Die Indolocarbazole Rebeccamycin (**267**) und Staurosporin (**193**) enthalten ungewöhnliche N-Glycosid-Bindungen. Die Biosynthese von Staurosporin wurde in *S. albus* rekonstituiert, wenn die für die Bildung des Staurosporin-Aglycons (**268**), verschiedener Desoxyzucker (**34**, **61**, **65**, **78** und **79**) sowie die N-GT (StaG) und das P450-Enzym (StaN) codierenden Gene exprimiert wurden. N-GT (StaG) und das P450-Enzym (StaN) sind für die oxidative Vernetzung zwischen dem C5' des Zuckers und dem N12 des Aglycons zuständig. Während StaG sowohl L- als auch D-Zucker an **268** kuppelte, wurden durch StaN nur die L-Zucker oxidativ vernetzt (zur Bildung von **193** und **274–277**).

ergaben, dass alle fünf in dieser Studie getesteten Desoxyzucker ausschließlich über das N-13-Atom des Staurosporin-Aglycons (durch StaG) banden. Die Produkte **269–273** enthalten eine äquatoriale N-Glycosid-Bindung, die den Zucker in der 4C_1 -Konformation anordnet. Für L-Zucker ist die 4C_1 -Konformation ungewöhnlich, weil die voluminösen Substituenten an C-3, C-4 und C-5 die weniger günstige axiale Position einnehmen. Die Verbindungen mit L-Zuckern (**269–272**) konnten durch StaN zu den zweifach verknüpften Staurosporinanaloga **274–277** weiter umgesetzt werden. In den zweifach verknüpften Verbindungen nehmen die L-Zucker ausschließlich die 1C_4 -Konformation ein, was darauf hinweist, dass StaN vor der oxidativen Kupplung von C-5' an

N-12 des Indols die 4C_1 -Konformation der L-Zucker in eine 1C_4 -Konformation überführt.

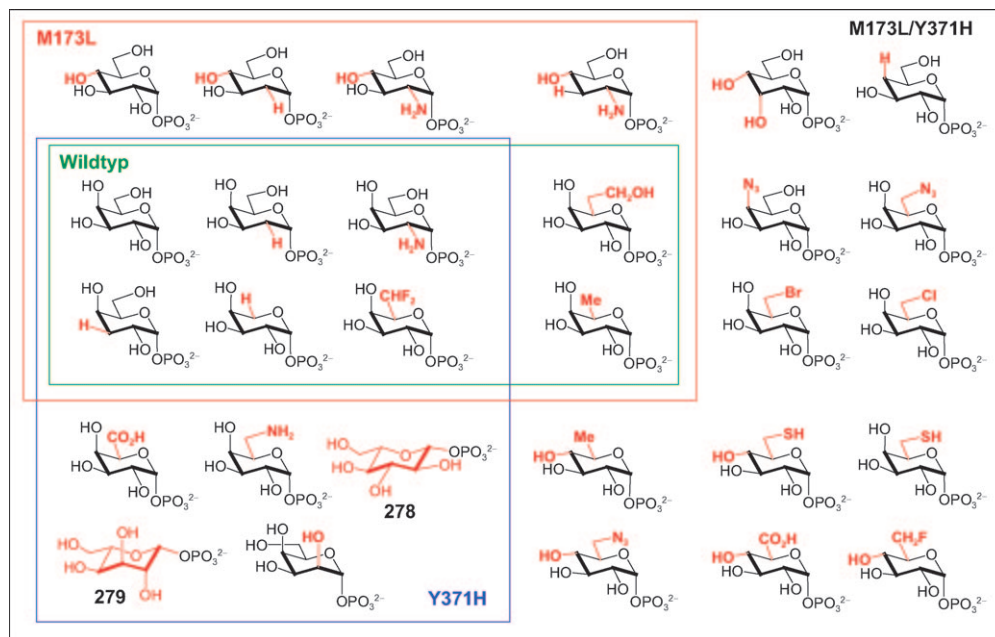
5.2. In-vitro-Glycodiversifizierung

Obwohl bei der In-vivo-Glycodiversifizierung durch kombinatorische Biosynthese und Stoffwechsel-Engineering beträchtliche Fortschritte erzielt worden sind, gibt es einige inhärente Nachteile, die die Anwendbarkeit dieser Methoden beschränken. Zum einen ist es schwierig, die Reaktionsbedingungen zu steuern und unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Auch wirken die neu hergestellten Metaboliten möglicherweise toxisch auf den Bakterienstamm, der als Wirt zur Expression der heterologen Gene eingesetzt wurde. Schließlich können nur solche Aglycon-Akzeptoren und Zucker-Donoren als mögliche Bausteine verwendet werden, die biosynthetisiert oder an den Wirt gefüttert werden können, was letztlich die strukturelle Vielfalt der zugänglichen Glycoformen einschränkt. Um einige dieser Probleme zu überwinden, haben sich neuere Arbeiten auf die Entwicklung von Methoden zur In-vitro-Glycodiversifizierung unter Verwendung gereinigter Zuckerbiosyntheseenzyme und Glycosyltransferasen konzentriert. Grundlage dieser Arbeiten waren die mittlerweile fundierten Erkenntnisse über Biosyntheseenzyme sowie die Entdeckung mehrerer substratflexibler anomerer Kinasen, Nucleotidyltransferasen und Glycosyltransferasen. Diese substratflexiblen Enzyme wurden genutzt, um Bibliotheken von NDP-Zuckern herzustellen (besprochen in Lit. [281]), die dann in vitro als Substrate für Glycosyltransferasen mit natürlicher oder künstlich erzeugter Substratflexibilität geprüft werden können. In diesem Abschnitt werden wir nur solche Glycoengi-

neeringstudien besprechen, die gereinigte Zuckerbiosyntheseenzyme und Glycosyltransferasen verwenden, um glycorandomisierte Naturstoffbibliotheken aufzubauen. Neuere Entwicklungen haben außerdem rein chemische Methoden für alternative Glycodiversifizierungsstrategien aufgezeigt.^[248, 249, 282–286]

5.2.1. Entwicklung von Kinasen für anomere Zucker

Die Hauptbeschränkung der enzymatischen Synthese von NDP-Zuckern ist die Verfügbarkeit der spezifischen Enzyme, die zum Aufbau der gewünschten NDP-Zucker benötigt werden. Um die Herstellung von NDP-Zuckern zu erleich-



Schema 24. Zucker-1-phosphate, die im Wildtyp und in gezielt hergestellten Galactokinase (GalK)-Mutanten von *E. coli* produziert werden. Die Substratspezifität der Wildtyp-GalK wurde durch Mutation der Methionin- (M173L) und Tyrosinreste (Y371H) des aktiven Zentrums erweitert. Die M173L/Y371H-Zweifachmutante behielt die Substratspezifität jeder einzelnen Mutante bei und akzeptierte auch eine Vielzahl anderer Zucker. Die Zucker-1-phosphate, die vom jeweiligen Enzym hergestellt wurden, sind eingerahmt, und die strukturellen Abweichungen vom Substrat der Wildtyp-GalK (D-Galactose) sind rot gekennzeichnet.

tern, wurden mit gerichteter Evolution und strukturbasiertem Protein-Engineering Zuckerbiosyntheseenzyme mit breiterer Substratspezifität entworfen. Zum Beispiel war eine einzige Runde einer Zufallsmutagenese des Galactokinasegens *galK* von *E. coli*^[287] ausreichend, um eine GalK-Variante (Y371H) zu erzeugen, die Substitutionen an C-2, C-3, C-5 und C-6 der D-Galactose toleriert, die aber die stringente Bedingung einer axialen 4-OH-Gruppe beibehält. Diese Mutante kann auch zwei L-Zucker (**278** und **279**, Schema 24) phosphorylieren. Basierend auf einem Strukturhomologiemodell mit Galactokinase aus *Lactococcus lactis* wurde vorgeschlagen, dass zwei konservierte Reste (Asp37 und Tyr223) im *E.-coli*-Enzym Wasserstoffbrücken mit der axialen 4-OH-Gruppe bilden.^[288] Allerdings änderte eine Mutation dieser Reste die C-4-Spezifität der GalK aus *E. coli* nicht. Dagegen konnte die Y385H-Mutante (äquivalent zu *E. coli* Y371H) der GalK aus *L. lactis* D-Glucose (sowie einige andere D-Zucker) mit äquatorialen 4-OH-Gruppen als Substrate umsetzen.^[289] Die weitere Analyse des GalK-Homologiemodells ließ darauf schließen, dass der Met173-Rest im *E.-coli*-Enzym (Leu182 in *L. lactis*) das Enzym daran hindert, D-Zucker mit einer äquatorialen 4-OH-Gruppe umzusetzen.^[290] Tatsächlich konnte die M173L-Mutante in *E. coli* D-glucokongurierte Zucker umsetzen. Überdies behielt die M173L/Y371H-Doppelmutante die Substratflexibilität der beiden Einfachmutanten bei und erkannte zusätzlich auch Azidozucker, die durch chemoselektive Ligationsreaktionen weiter modifiziert werden können. Die durch den Wildtyp und die GalK-Mutante in *E. coli* synthetisierten Zucker-1-phosphate sind in Schema 24 aufgeführt.

5.2.2. Modifizierung von Nucleotidyltransferasen

Der Aufbau natürlicher und nichtnatürlicher Zucker-1-phosphate bildet nur die erste Stufe in der Synthese von NDP-Zuckern. Die nächste Herausforderung ist, diese Verbindungen in die entsprechenden NDP-Derivate zu überführen. Die α -D-Glucosethymidyltransferase aus *Salmonella enterica* LT2 (RmlA oder E_p), die entweder TMP oder UMP an Zucker-1-phosphate koppelt, ist die am ausführlichsten untersuchte NDP-Zucker-Synthase.^[291] RmlA bevorzugt Pyranosylphosphate in der ⁴C₁-Sesselkonformation und ist weniger wirksam gegenüber 2-Desoxyzuckern. Sie kann auch Amino- und Acetamidozucker umsetzen.^[292] Die Position der Aminogruppe hat

keinen Einfluss auf den Umsatz, während voluminöse Acetamidogruppen nur an C-2 und C-3 toleriert werden. Die Kristallstruktur der RmlA im Komplex mit UDP-Glucose oder TTP^[293] zeigte, dass der Rest Trp224 im aktiven Zentrum bei der Thymidylierung von Zuckern, die voluminöse Substituenten an C-6 enthalten, stört. Der Trp224-Rest wurde später zu His mutiert, um die sterische Anhäufung um das C-6 des Substrats zu verringern. Diese Mutation kann auch eine positive Ladung einführen, die die Bindung von Zuckern mit einer Carboxylatgruppe an C-6 erleichtert. Die Substratflexibilität der RmlA wurde weiter vergrößert, indem durch Mutation von Leu89 zu Thr die sterische Hinderung um das C-2 des Substrats verringert wurde.^[294] In diesen Studien wurden über 30 Zucker-1-phosphate identifiziert, die als Substrate für RmlA oder ihren Varianten fungieren.

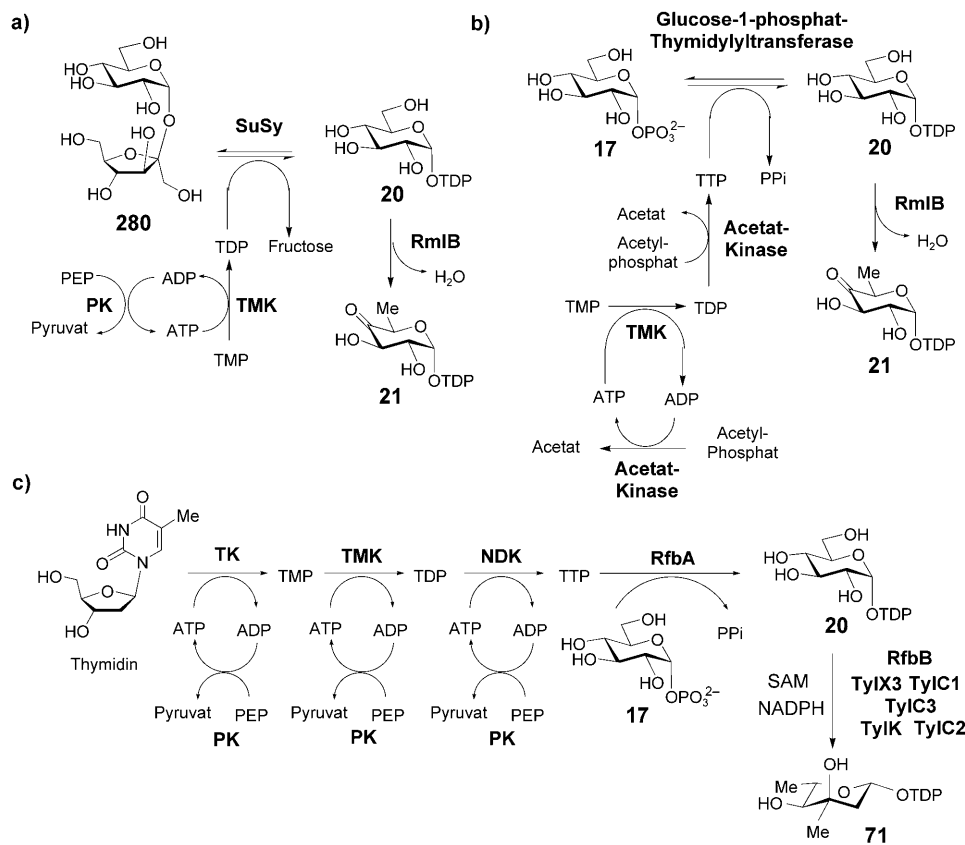
Bei der Suche nach alternativen Nucleotidyltransferasen mit breiter Substratspezifität stieß man auf eine hitzestabile Nucleotidyltransferase aus dem archaealen Organismus *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, die eine relativ breite Substratspezifität aufweist und sogar L-Fucose-1-phosphat (**8**, Schema 1) effizient uridylieren kann.^[295] Das Enzym ist bifunktionell und katalysiert den 2-N-Acetyltransfer zum Glucosamin-1-phosphat vor dem Uridyltransfer.^[296] Unter Verwendung von N-Acetylcysteaminthioestern anstelle von Acetyl-CoA wurden aus Glucosamin-1-phosphat mit diesem Enzym mehrere UDP-Glucosaminderivate synthetisiert. Für Nucleotidyltransferasen aus zwei anderen thermophilen archaealen Organismen wurde gefunden, dass sie ebenfalls Nucleosidtriphosphate (NTPs) heranziehen, darunter Purin- und 2'-Desoxyribonucleotide.^[297,298]

In einer neueren Studie wurde festgestellt, dass RmlA (eine Thymidyltransferase) jedes der acht natürlich vorkommenden NTPs (UTP, CTP, ATP, GTP, TTP, dCTP, dATP und dGTP; d = Desoxy) zur Aktivierung von zehn verschiedenen Zucker-1-phosphat-Substraten verwenden kann.^[299] Die katalytische Effizienz der Umsetzungen unterscheidet sich zum Teil drastisch. Kinetische Analysen ergaben, dass die Bevorzugung von Thymidin vor allem auf der niedrigen Michaelis-Konstanten (K_m) für TTP beruht, während TTP und UTP beide mit viel höheren k_{cat} -Werten als andere NTPs umgesetzt werden. Die Mutation des Gln83-Rests in RmlA, der mit der basenpaarenden Seite der Uridin/Thymidin-Einheit Wasserstoffbrücken bildet, zu Asp oder Ser ergab ein Enzym, das Purinnucleotide um drei Größenordnungen schneller transferierte als Pyrimidinnucleotide. Wenn mehr Strukturinformationen zu Nucleotidyltransferasen vorliegen, wird es möglich sein, die Substratspezifität für NTPs durch Protein-Engineering zu verändern und so das Repertoire verfügbarer NDP-Zucker für In-vitro-Glycosylierungsstudien zu erweitern.

5.2.3. In-vitro-Synthese von NDP-Zuckern

Um die enzymatische Synthese hochmodifizierter TDP-Zucker zu erleichtern, sind leistungsstarke Methoden zur Herstellung der universellen Zwischenstufe TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose (**21**) entwickelt worden. Zum Beispiel wurden gereinigte Sucrose-Synthase (SuSy) aus der Kartoffel, TDP-Glucose-4,6-Dehydratase (RmlB) aus *Salmonella typhimurium* und TMP-Kinase aus Hefe verwendet, um **21** aus den billigen Ausgangsverbindungen Sucrose (**280**) und TMP mit einer Ausbeute von ca. 70 % (bezogen auf TMP) zu synthetisieren (Schema 25 a).^[300] Ein ATP-Regenerationssystem, bestehend aus Pyruvat-Kinase (PK) und Phosphoenolpyruvat (PEP) wurde einbezogen, sodass nur katalytische Mengen an ATP benötigt wurden. Eine analoge Strategie unter Verwendung von SuSy ist ebenfalls genutzt worden, um andere NDP-Zucker herzustellen.^[281] In einem biosynthesebasierten Ansatz wurden TMP-Kinase (TMK), Acetat-Kinase und Glucose-1-phosphat-Thymidyltransferase aus *E. coli* mit RmlB aus *S. typhimurium* in *E. coli* BL21-Zellen exprimiert (Schema 25 b).^[301] Die Rohextrakte aus diesen Zellen wurden mit TMP, Acetylphosphat und Glucose-1-phosphat inkubiert, um **21** in 80 % Ausbeute (von TMP) zu synthetisieren.

Bislang wurden nur eine handvoll hochmodifizierter Naturstoff-TDP-Zucker durch Tandemreaktionen mit gereinigten Biosyntheseenzymen hergestellt. Hierzu gehören TDP-L-Mycarose (**71**) vom Tylosin-Weg,^[92] TDP-L-Epivancosamin (**56**) vom Chloroeremomycin-Weg,^[82] TDP-D-Forsamin (**100**) vom Spinosyn-Weg^[114] und TDP-L-Digitoxose (**78**) vom Kijanimicin-Weg.^[99] Für die Synthese von TDP-L-Mycarose (**71**) aus Thymidin und Glucose-1-phosphat (**17**, Schema 25 c) wurde ein zweistufiger Ansatz entwickelt. Das Ausgangsreaktionsgemisch bestand aus Thymidin, PEP, ATP und den vier Enzymen Thymidin-Kinase (TK), Thymidylat-Kinase (TMK), Nucleosiddiphosphat-Kinase (NDK) und Pyruvat-Kinase (PK). Nach Inkubation und anschließendem Entfernen der Enzyme durch Ultrafiltration wurde das Filtrat dann mit Glucose-1-phosphat, RfbA und RfbB (einer Thymidyltransferase bzw. einer TDP-Glucose-4,6-Dehydratase aus *Salmonella typhi*) sowie den Mycarose-Biosyntheseenzymen (TylX3, TylC1, TylC3, TylK und TylC2, siehe Schema 6), NADPH und SAM inkubiert. Die Ausbeute an **71** betrug 16 %. Interessanterweise zeigte das Multienzymsystem keine Unverträglichkeiten mit den Reaktionsbedingungen, und es traten auch keine Kreuzinhibierungen durch Substrate



Schema 25. Enzymatische Synthese von NDP-Zuckern. a) Eintopfsynthese der universellen Zwischenstufe TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose (**21**) in der Desoxyzucker-Biosynthese aus Sucrose (**280**) und Thymidinmonophosphat (TMP) unter Verwendung von TMP-Kinase (TMK), Sucrose-Synthase (SuSy) und RmlB. b) Biosynthesebasierter Ansatz für die Synthese von **21**. c) Zweistufige Eintopfsynthese der TDP-L-Mycarose (**71**). Im ersten Schritt wird Thymidin durch die Thymidylat-Kinase (TK), TMK und die Nucleosiddiphosphat-Kinase (NDK) in TTP überführt. Nach Reinigung von TTP durch Filtration wurde **17** durch die kombinierte Wirkung von sieben Enzymen in Gegenwart von S-Adenosylmethionin (SAM) und NADPH in **71** umgewandelt (16 % Ausbeute bezogen auf **17**).

oder Produkte auf, die im Verlauf dieses Eintopfsyntheseschemas gebildet werden. Die erfolgreiche enzymatische Synthese verschiedener TDP-Zucker schafft die Voraussetzungen, um die Glycosylierung von Sekundärmetaboliten *in vitro* zu erforschen.

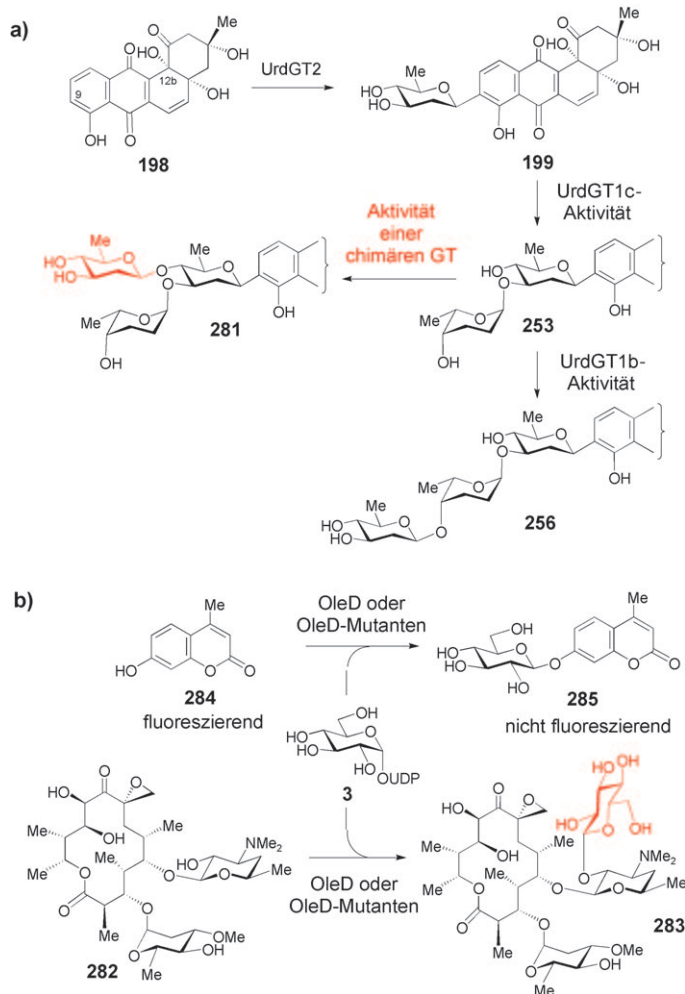
5.2.4. Protein-Engineering bei Glycosyltransferasen

Über ein elegantes Beispiel für GT-Engineering wurde kürzlich berichtet. UrdGT1b und UrdGT1c vom Urdamycin-Weg (siehe Abschnitt 5.1.4) haben eine Aminosäuresequenzidentität von 91 %, aber verschiedene Substratspezifitäten. Die Domäne jedes Enzyms, auf der die UrdGT1b-

oder UrdGT1c-spezifische Aktivität beruht, wurde in einer Region bestehend aus 31 Aminosäuren nahe dem N-Terminus beider Enzyme lokalisiert.^[208] Wenn diese Region in UrdGT1c gegen die entsprechende Region in UrdGT1b ausgetauscht wurde, zeigte das entstehende chimäre Enzym UrdGT1b-ähnliche Aktivität. Ein analoges Ergebnis wurde erhalten, wenn die Region in UrdGT1b durch die entsprechende Region in UrdGT1c ersetzt wurde. Von den 31 Aminosäuren in dieser Region unterscheiden sich 18 in den beiden Enzymen. Weitere Studien wiesen darauf hin, dass nur 10 von diesen 18 variablen Aminosäuren für die UrdGT1b- oder UrdGT1c-ähnlichen Aktivitäten entscheidend sind.^[209] Diese Reste wurden danach mutiert und die resultierenden

Konstrukte auf GT-Aktivität geprüft. Neben Mutanten, die entweder UrdGT1b- oder UrdGT1c-Aktivität beibehalten hatten, und solchen, die beide parentalen Aktivitäten aufwiesen, wurden auch Mutanten gefunden, die eine neue Reaktion katalysierten. In dieser neuen Reaktion wurde eine D-Olivose an das D-Olivose-L-Rhodinose-Disaccharid von 12b-Derhodinosylurdamycin G (**253**, Schema 26a) gebunden, woraus eine Verbindung mit verzweigter Zuckerkette, Urdamycin P (**281**), resultierte. Interessanterweise behielten einige der Mutanten mit der neuen Aktivität auch die normale UrdGT1b- und/oder UrdGT1c-Aktivität.

Im obigen Fall bedingen die hohe Sequenzidentität zwischen den beiden Urdamycin-GTs und die rationale Auswahl der Aminosäurereste für die Mutation eine relativ kleine Bibliothek von GT-Mutanten. Typische Engineering-Experimente auf der Basis von gerichteter Evolution und/oder Zufallsmutagenese sollten jedoch weit mehr Mutationen erzeugen. Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Assays zum Screening von Enzymaktivitäten ist daher eine entscheidende Voraussetzung für das Protein-Engineering.^[210,302–304] Kürzlich wurde die gerichtete Evolution von CstII, einer Sialyltransferase der GT-A-Familie,^[303] und von OleD, einer Makrolidresistenzglucosyltransferase der GT-B-Familie (die die Umsetzung **282** → **283** katalysiert, Schema 26b),^[210] beschrieben. Mittels fehlerhafter PCR wurde eine Bibliothek aus über 1000 OleD-Varianten erstellt, und die GT-Aktivitäten der Varianten wurden mit einem fluoreszierenden Aglyconsubstrat (**284**, Schema 26b) geprüft, dessen Fluoreszenz durch die Glycosylierung (**284** → **285**) gelöscht wird. Drei einfache OleD-Mutanten (Pro67Thr, Ser132Phe, Ala242Val) zeigten eine höhere Aktivität für **284** als die Wildtyp-OleD. Die entsprechende Dreifachmutante wurde konstruiert, und ihre Substratspezifität wurde in einer Bibliothek von 22 NDP-Zuckern mit **284** als Akzeptor untersucht. Die Dreifachmutante setzte 15 der 22 Zucker um, die Wildtyp-OleD dagegen nur deren drei. Zusätzlich zeigte die Dreifachmutante erhöhte GT-Aktivität für sechs weitere nichtnatürliche Akzeptoren. Interessanterweise befindet sich der Pro67-Rest der OleD in einer hypervariablen Schleife in der akzeptorbindenden Domäne nahe dem N-Terminus des Proteins. Die Mutation an der äquivalenten Position in den UrdGTs veränderte auch die Substratspezifität. In einer ganz neuen Studie wurde schließlich ein Hochdurchsatz-GT-Assay entwickelt, der



Schema 26. Protein-Engineering bei Glycosyltransferasen. a) Erzeugung von UrdGT1b/1c-Chimären mit neuartiger Aktivität. Die Biosynthese der Trisaccharideinheit von Urdamycin A beruht auf der aufeinanderfolgenden Wirkung von UrdGT2, UrdGT1c und UrdGT1b (**198** → **199** → **253** → **256**). Mehrere chimäre UrdGT1b/1c-Enzyme katalysierten eine neue Reaktion (**253** → **281**). b) Hochdurchsatz-Screening der GT-Aktivität. Mittels Zufallsmutagenese wurde eine Bibliothek aus OleD-Varianten (eine Makrolidresistenz-GT, die normalerweise die Reaktion **282** → **283** katalysiert) aufgebaut. Die Aktivität dieser Varianten wurde dann im Hochdurchsatz unter Verwendung des fluoreszierenden Akzeptors **284**, dessen Fluoreszenz durch Glycosyltransfer gelöscht wird, überprüft. Auf diese Weise wurden mehrere aktive Mutanten identifiziert, von denen einige eine breitere Substratspezifität zeigten.

darauf beruht, dass das vom Akzeptornucleophil beim Glycosyltransfer freigesetzte Proton durch einen pH-Indikator in schwach gepufferten Lösungen detektiert wird.^[304]

Obwohl sich das Gebiet noch in den Anfängen befindet, demonstrieren die hier beschriebenen Studien mit Urdamycin-GTs und OleD das Potenzial dieser Methoden zur Erzeugung von Enzymen mit erhöhter katalytischer Effizienz, breiterer Substratpromiskuität und/oder neuartigen Aktivitäten.

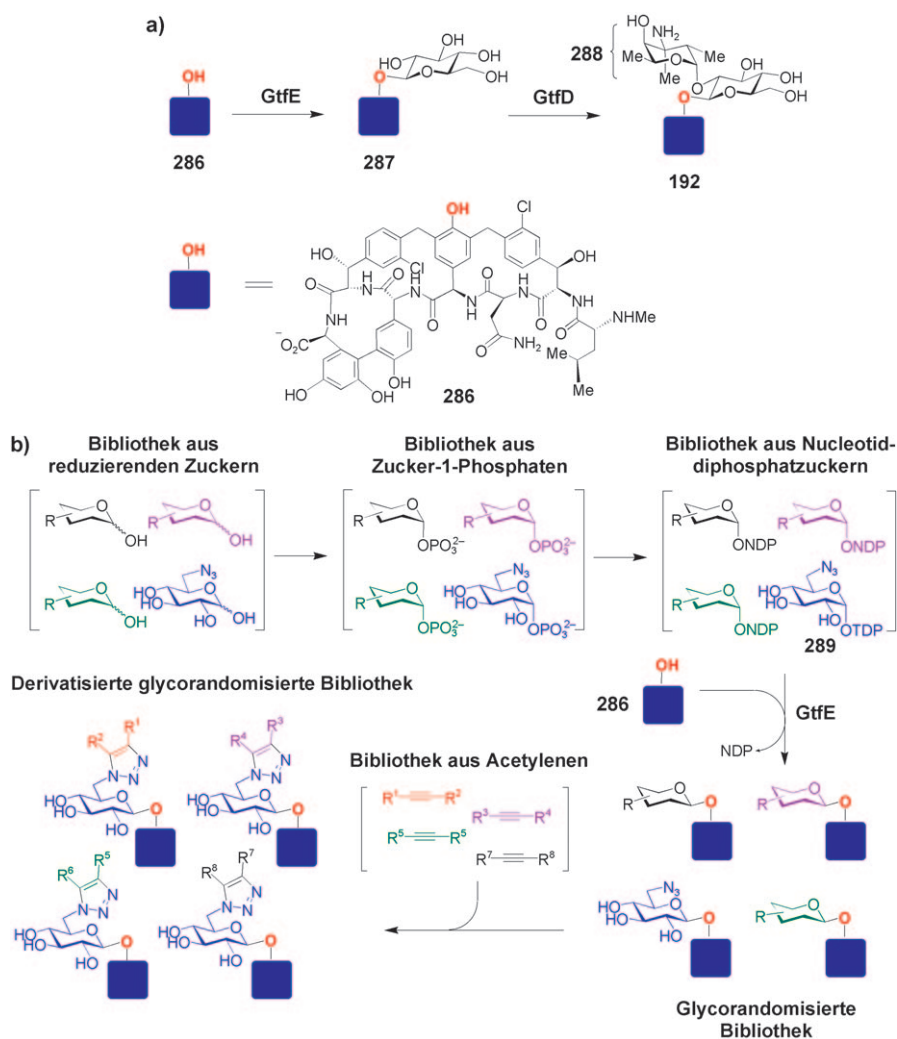
5.2.5. In-vitro-Glycoengineering

Mit dem inzwischen stark angewachsenen Pool an NDP-Zuckern und der Verfügbarkeit promiskuitiver GTs ist es

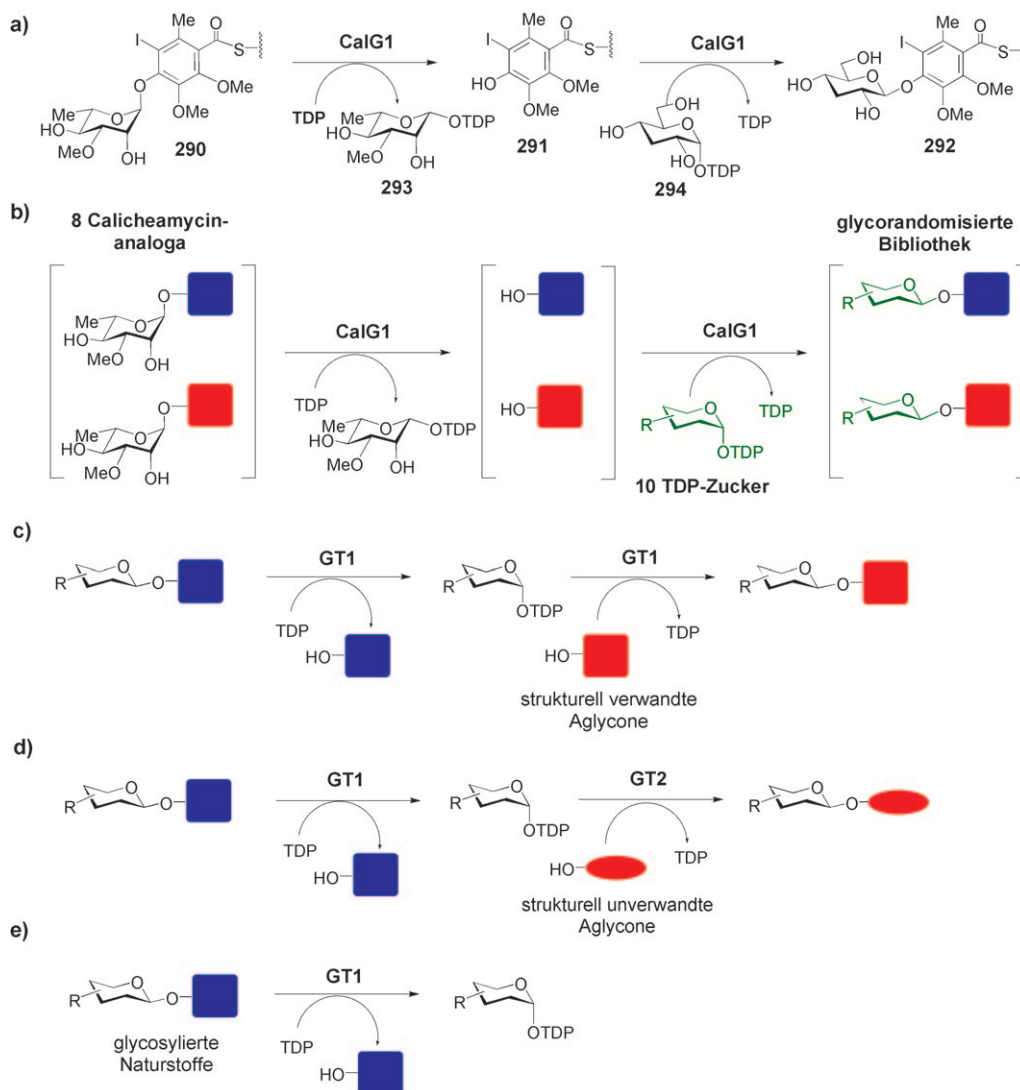
jetzt möglich, verschiedenste Aglycone mit einer Vielzahl von Zuckerresten zu derivatisieren. Es hat sich erwiesen, dass diese Methode der In-vitro-Glycodiversifizierung (oder Glycorandomisierung) einen schnellen Zugang zu neuen glycosylierten Naturstoffen bietet,^[248,249,286,305] und zahlreiche Derivate von Methymycin/Pikromycin^[232] (**187**, **219–221**, Schema 12) und Vancomycin (**192**, Schema 27a) wurden damit hergestellt.^[238] Das Vancomycin-Aglycon (**286**) wird am 4-Hydroxyphenylglycin-Rest (**286** → **287** → **192**) nacheinander durch die Glucosyltransferase GtfE und die Vancosaminyltransferase GtfD glycosyliert (Schema 27a).^[306] Wie schon früher gezeigt wurde, weisen GtfD und GtfE relaxierte Substratspezifitäten auf.^[255,306,307] Um diese Eigenschaften zu nutzen, wurde eine Bibliothek aus TDP-Zuckern (hergestellt

durch chemische Synthese unter Verwendung der in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 beschriebenen GalK- und RmlA-Mutanten) mit dem Vancomycin-Aglycon und GtfE inkubiert und die Reaktionsgemische über LC-MS analysiert (Schema 27b).^[238] 21 der 23 TDP-Zucker, die in dieser Studie analysiert wurden, erwiesen sich als Substrate für GtfE, darunter auch der TDP-Azidozucker **289**, der in Gegenwart von Alkinen durch Huisgen-Cycloaddition weiter modifiziert werden konnte und 39 weitere Vancomycinderivate ergab.^[238,308] Eine dieser neuen Verbindungen zeigte erhöhte antibiotische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecium*. In weiteren Studien zur Glycorandomisierung von Vancomycin wurden mehrere andere Naturstoff-GTs mit relaxierter Substratspezifität für ähnliche In-vitro-Glycodiversifizierungen verwendet.^[87,232,237,309–316]

Die Vielseitigkeit der In-vitro-Glycodiversifizierung wurde kürzlich in der Glycorandomisierung von Calicheamicin (**189**, Schema 14) demonstriert.^[310] Zuerst wurde nachgewiesen, dass die Calicheamicin-GT (CalG1) zehn verschiedene TDP-Zucker als Substrate erkennt. Einer dieser Zucker, TDP-3-desoxy- α -D-glucose (**294**, Schema 28a), wurde dann mit CalG1 und dem 3-O-methylrhamnosylierten Aglycon **290** inkubiert. Da die Glycosylierungsstelle für CalG1 in **290** schon besetzt war, wurde keine Reaktion erwartet. Dennoch wurde ein neues Produkt identifiziert (**292**), das eine 3-Desoxy- α -D-glucose enthält. Die Analyse der Kontrollreaktionen ergab, dass CalG1 in Gegenwart von TDP eine reverse



Schema 27. Chemoenzymatische Glycorandomisierung des Vancomycin-Aglycons. a) Die Disaccharideinheit von Vancomycin (**192**) wird durch Tandemaddition von D-Glucose und L-Vancosamin an **286** durch die Glycosyltransferasen GtfE bzw. GtfD aufgebaut. b) Eine Bibliothek reduzierender Zucker wurde entweder durch chemische Synthese oder Inkubation mit GalK-Mutanten und ATP in eine Bibliothek von Zucker-1-phosphaten überführt. Diese Bibliothek wurde wiederum unter Verwendung einer gentechnisch veränderten RmlA-Nucleotidyltransferase in eine Bibliothek von NDP-Zuckern umgewandelt. Die NDP-Zucker wurden als Substrate für GtfE in vitro getestet, was zu einer glycorandomisierten Bibliothek aus 21 Vancomycinanaloga führte. Eines dieser Analogia enthielt einen Azidozucker (**289**), der mit einer Vielzahl von Alkinen durch Cu^I-katalysierte Huisgen-[3+2]-Cycloaddition weiter modifiziert werden konnte und 39 weitere Vancomycinderivate ergab.



Schema 28. a) Die Calicheamicin-GT (CalG1) synthetisiert aus **290** in Gegenwart von TDP durch eine reverse Glycosyltransferreaktion sowohl **293** als auch **291**. Andere im Reaktionsgemisch vorhandene TDP-Zucker wie **294** konnten ebenfalls an das in situ erzeugte Aglycon **291** gekuppelt werden, um neue Glycoside wie **292** zu bilden. b) CalG1 wurde in Zuckeraustauschreaktionen eingesetzt und randomisierte acht glycosylierte Calicheamicinanaloga mit zehn verschiedenen Zuckern, sodass eine Bibliothek von 72 Verbindungen aufgebaut wurde. c) Aglycon-Austauschreaktionen unter Beteiligung einer einzelnen GT, die einen Zuckerrest von einem Aglycon auf ein strukturell ähnliches Aglycon überträgt. d) Werden zwei Enzyme verwendet, die den gleichen TDP-Zucker erkennen, kann ein Zuckerrest von einem Aglycon auf ein nicht strukturverwandtes Aglycon transportiert werden. e) In Gegenwart von überschüssigem TDP und einem glycosylierten Naturstoff kann die reverse GT-Katalyse zur Synthese von TDP-Zuckern genutzt werden.

GT-Reaktion katalysierte, wobei TDP-3-*O*-Methyl- β -L-rhamnose (**293**) und ein deglycosyliertes Aglycon **291** gebildet wurden. Die Glycosylierung von **291** durch CalG1 konnte dann mit dem alternativen TDP-Zucker **294**, der im Reaktionsgemisch vorhanden ist, zu **292** führen. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass auch die Calicheamicin-Aminopentosyltransferase (CalG4) und die Vancomycin-GTs GtfD und GtfE reversible Reaktionen katalysieren, was darauf schließen lässt, dass Reaktionsreversibilität ein allgemeines Kennzeichen der GTs in vitro sein könnte.

Die reversiblen Reaktionen, die diese GTs katalysieren, wurden in etlichen Glycorandomisierungsanwendungen genutzt (Schema 28b–e). Mit einem Satz von acht Calicheami-

cinderivaten und den zehn nachgewiesenen TDP-Zucker-substraten von CalG1 katalysierte CalG1 mehrere Zuckeraustauschreaktionen, die eine glycorandomisierte Calicheamicin-Bibliothek mit über 70 Verbindungen ergaben (Schema 28b). CalG1, CalG4 und GtfD wurden auch einzeln in Aglycon-Austauschreaktionen eingesetzt, wobei die 3-*O*-Methyl- β -L-rhamnosyl-, Aminopentosyl- oder Vancosaminyl-Reste durch CalG1, CalG4 bzw. GtfD von einem Calicheamicin- oder Vancomycin-Aglycon zum anderen übertragen wurden (Schema 28c). In einer nachfolgenden Studie wurde ein Aglyconaustausch unter Beteiligung von zwei Enzymen entwickelt. GtfE wurde verwendet, um einen nichtnatürlichen Azidozucker aus einem Vancomycin-Aglycon heraus-

zuschneiden und so einen TDP-Azidozucker als Zwischenstufe aufzubauen, der dann durch CalG1 mit einem Calicheamicin-Aglycon gekuppelt wurde (Schema 28). Die Reversibilität der GTs kann auch genutzt werden, um NDP-Zucker (Schema 28) zu synthetisieren und die biologischen Funktionen der GTs zu verifizieren.^[87,252,317]

6. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz haben wir den gegenwärtigen Kenntnisstand zur Biosynthese ungewöhnlicher Zucker zusammengefasst. Obwohl die letztendlichen Strukturen dieser Zucker beträchtlich variieren, werden nur eine handvoll Enzymaktivitäten für ihre Biosynthese gebraucht. Dieser Vorgang der „natürlichen kombinatorischen Biosynthese“ kann die in der Natur beobachtete strukturelle Diversität der Zucker erklären. Die Erforschung der enzymatischen Mechanismen hat gezeigt, dass die meisten dieser Enzyme auf ein spezifisches Arrangement ihrer katalytischen Reste, Coenzyme und Cofaktoren angewiesen sind, um bestimmte chemische Umwandlungen an chemisch verwandten Zuckerzwischenstufen vorzunehmen. Die Tatsache, dass die Familie der zuckermodifizierenden SDR-Enzyme nicht nur NDP-Ketozucker als Zwischenstufen produziert, sondern diese Zwischenstufen auch in nur einem aktiven Zentrum verändern kann, spiegelt die enorme Effektivität dieser Systeme zur Erzeugung struktureller Vielfalt in der Natur wider. Die Vielfalt der Zuckerstrukturen, wie sie durch die natürliche kombinatorische Biosynthese der SDR-Enzyme vermittelt wird, kann zudem durch ungewöhnliche Enzymaktivitäten, von denen viele noch nicht charakterisiert sind, weiter vergrößert werden.

Die Studien zur Glycosylierung von Naturstoffen haben ergeben, dass viele Enzyme und Glycosyltransferasen der Zuckerbiosynthese eine gewisse Substratflexibilität gegenüber ihren NDP-Zuckern und/oder Aglycon-Substraten aufweisen. In den letzten Jahren haben Stoffwechsel-Engineering und kombinatorische Biosynthesestudien die mögliche Anwendung dieser Enzyme für die Bildung neuer Glycoformen demonstriert. Ausgestattet mit fundierten Kenntnissen über die Strukturen und Mechanismen dieser Enzyme beginnt nun eine neue Ära der Glycodiversifizierung von Naturstoffen, und wir sind künftig in der Lage, diese substratflexiblen Enzyme durch Protein-Engineering weiter zu modifizieren und zum Aufbau von Substratbibliotheken für In-vitro-Glycosylierungsreaktionen oder zur Glycorandomisierung vorhandener Naturstoffgerüste einzusetzen. Solche Forschungen haben das Potenzial, neue Wirkstoffe hervorzubringen, die das allgegenwärtige Problem wirkstoffresistenter Pathogene entschärfen könnten.

Die Autoren danken den National Institutes of Health (GM35906 und GM54306) und der Welch Foundation (F-1511) für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 12. März 2008

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] E. Martin-Rendon, D. J. Blake, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, 24, 178.
- [2] G. Durand, N. Seta, *Clin. Chem.* **2000**, 46, 795.
- [3] J. A. Este, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1617.
- [4] C. A. Schnaitman, J. D. Klena, *Microbiol. Rev.* **1993**, 57, 655.
- [5] J. S. Thorson, T. J. Hosted, Jr., J. Jiang, J. B. Biggins, J. Ahlert, *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 139.
- [6] V. Kren, L. Martinkova, *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1303.
- [7] A. C. Weymouth-Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 14, 99.
- [8] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Press, New York, **1999**.
- [9] S. Blanchard, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 263.
- [10] G. S. Shackelford, C. A. Regni, L. J. Beamer, *Protein Sci.* **2004**, 13, 2130.
- [11] S. Jelakovic, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 143.
- [12] I. C. Schoenhofen, D. J. McNally, E. Vinogradov, D. Whitfield, N. M. Young, S. Dick, W. W. Wakarchuk, J.-R. Brisson, S. M. Logan, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 723.
- [13] M. E. Tanner, *Bioorg. Chem.* **2005**, 33, 216.
- [14] M. Maki, N. Jarvinen, J. Rabina, H. Maaheimo, P. Mattila, R. Renkonen, *Glycobiology* **2003**, 13, 295.
- [15] N. Suzuki, Y. Nakano, Y. Yoshida, T. Nezu, Y. Terada, Y. Yamashita, T. Koga, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 5963.
- [16] Z. Xu, K. Jakobi, K. Welzel, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 579.
- [17] Y. Yoshida, Y. Nakano, T. Nezu, Y. Yamashita, T. Koga, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16933.
- [18] C. Fischer, F. Lipata, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7818.
- [19] C. Dong, L. L. Major, V. Srikanthasasan, J. C. Errey, M. F. Giraud, J. S. Lam, M. Graninger, P. Messner, M. R. McNeil, R. A. Field, C. Whitfield, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2007**, 365, 146.
- [20] D. Christendat, V. Saridakis, A. Dharamsi, A. Bochkarev, E. F. Pai, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 24608.
- [21] M. Graninger, B. Nidetzky, D. E. Heinrichs, C. Whitfield, P. Messner, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25069.
- [22] S. Torkkell, T. Kunnari, K. Palmu, P. Mantsala, J. Hakala, K. Ylihönko, *Mol. Genet. Genomics* **2001**, 266, 276.
- [23] B. Kniep, H. Grisebach, *Eur. J. Biochem.* **1980**, 105, 139.
- [24] H. P. Wahl, U. Matern, H. Grisebach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 64, 1041.
- [25] H. P. Wahl, H. Grisebach, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1979**, 568, 243.
- [26] K. Pissowotzki, K. Mansouri, W. Piepersberg, *Mol. Gen. Genet.* **1991**, 231, 113.
- [27] H. Yamase, L. Zhao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12397.
- [28] D. Baron, E. Wellman, H. Grisebach, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1972**, 258, 310.
- [29] J. Mendicino, H. Abou-Issa, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1974**, 364, 159.
- [30] M. Molhoj, R. Verma, W.-D. Reiter, *Plant J.* **2003**, 35, 693.
- [31] C. Waldron, P. Matsushima, P. R. Rostek, Jr., M. C. Broughton, J. Turner, K. Madduri, K. P. Crawford, D. J. Merlo, R. H. Baltz, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 487.
- [32] E. P. Patallo, G. Blanco, C. Fischer, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 18765.
- [33] J. Ahlert, E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Csisny, R. E. Whitam, C. M. Farnet, J. S. Thorson, *Science* **2002**, 297, 1173.
- [34] K. Madduri, C. Waldron, D. J. Merlo, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 5632.

- [35] W. Liu, S. D. Christenson, S. Standage, B. Shen, *Science* **2002**, 297, 1170.
- [36] M. Steffensky, A. Muhlenweg, Z. X. Wang, S. M. Li, L. Heide, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1214.
- [37] F. Pojer, S. M. Li, L. Heide, *Microbiology* **2002**, 148, 3901.
- [38] Z. X. Wang, S. M. Li, L. Heide, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 3040.
- [39] T. T. Thuy, H. C. Lee, C. G. Kim, L. Heide, J. K. Sohng, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 436, 161.
- [40] A. Freitag, S. M. Li, L. Heide, *Microbiology* **2006**, 152, 2433.
- [41] M. Tello, P. Jakimowicz, J. C. Errey, C. L. Freel Meyers, C. T. Walsh, M. J. Buttner, D. M. Lawson, R. A. Field, *Chem. Commun.* **2006**, 1079.
- [42] C. L. Freel Meyers, M. Oberthur, L. Heide, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2004**, 43, 15022.
- [43] A. Freitag, E. Wemakor, S. M. Li, L. Heide, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2316.
- [44] C. L. Freel Meyers, M. Oberthur, H. Xu, L. Heide, D. Kahne, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 69; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 67.
- [45] S. Garneau-Tsodikova, A. Stapon, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2006**, 45, 8568.
- [46] B. P. Jaishy, S. K. Lim, I. D. Yoo, J. C. Yoo, J. K. Sohng, D. H. Nam, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 16, 764.
- [47] T. T. Thuy, K. Liou, T.-J. Oh, D. H. Kim, D. H. Nam, J. C. Yoo, J. K. Sohng, *Glycobiology* **2007**, 17, 119.
- [48] E. Cundliffe, N. Bate, A. Butler, S. Fish, A. Gandeche, L. Merson-Davies, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2001**, 79, 229.
- [49] Y. Anzai, N. Saito, M. Tanaka, K. Kinoshita, Y. Koyama, F. Kato, *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 218, 135.
- [50] S. L. Ward, Z. Hu, A. Schirmer, R. Reid, W. P. Revill, C. D. Reeves, O. V. Petrakovsky, S. D. Dong, L. Katz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 4703.
- [51] R. H. Baltz, E. T. Seno, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, 42, 547.
- [52] H. Chen, Z. Guo, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9951.
- [53] H. Chen, S.-M. Yeung, N. L. S. Que, T. Müller, R. R. Schmidt, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7166.
- [54] C. E. Melançon III, L. Hong, J. A. White, Y.-n. Liu, H.-w. Liu, *Biochemistry* **2007**, 46, 577.
- [55] C. E. Melançon III, W.-L. Yu, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12240.
- [56] S. Mochizuki, K. Hiratsu, M. Suwa, T. Ishii, F. Sugino, K. Yamada, H. Kinashi, *Mol. Microbiol.* **2003**, 48, 1501.
- [57] R. G. Summers, S. Donadio, M. J. Staver, E. Wendt-Pienkowski, C. R. Hutchinson, L. Katz, *Microbiology* **1997**, 143, 3251.
- [58] L. M. Quiros, I. Aguirrezabalaga, C. Olano, C. Mendez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* **1998**, 28, 1177.
- [59] C. Olano, A. M. Rodriguez, J. M. Michel, C. Mendez, M. C. Raynal, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, 259, 299.
- [60] I. Aguirrezabalaga, C. Olano, N. Allende, L. Rodriguez, A. F. Brana, C. Mendez, J. A. Salas, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1266.
- [61] Y. Xue, L. Zhao, H.-w. Liu, D. H. Sherman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12111.
- [62] S. Peiru, H. G. Menzella, E. Rodriguez, J. Carney, H. Gramajo, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 2539.
- [63] Y. Volchegursky, Z. Hu, L. Katz, R. McDaniel, *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 752.
- [64] S. Gaisser, G. A. Bohm, J. Cortes, P. F. Leadlay, *Mol. Gen. Genet.* **1997**, 256, 239.
- [65] K. Salah-Bey, M. Doumith, J. M. Michel, S. Haydock, J. Cortes, P. F. Leadlay, M. C. Raynal, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, 257, 542.
- [66] S. Gaisser, G. A. Bohm, M. Doumith, M. C. Raynal, N. Dhillon, J. Cortes, P. F. Leadlay, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, 258, 78.
- [67] L. Zhao, D. H. Sherman, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10256.
- [68] L. Zhao, N. L. S. Que, Y. Xue, D. H. Sherman, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12159.
- [69] C. Chang, L. Zhao, H. Yamase, H.-w. Liu, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2244; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2160.
- [70] P.-H. Szu, X. He, L. Zhao, H.-w. Liu, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6900; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6742.
- [71] S. A. Borisova, L. Zhao, D. H. Sherman, H. W. Liu, *Org. Lett.* **1999**, 1, 133.
- [72] L. Zhao, S. Borisova, S. M. Yeung, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7909.
- [73] C. G. Hyun, S. S. Kim, J. K. Sohng, J. J. Hahn, J. W. Kim, J. W. Suh, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 183, 183.
- [74] A. P. Salas, L. Zhu, C. Sanchez, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* **2005**, 58, 17.
- [75] H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi, T. Fumari, *J. Antibiot.* **2002**, 55, 1063.
- [76] C. Olano, N. Lomovskaya, L. Fonstein, J. T. Roll, C. R. Hutchinson, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 845.
- [77] K. Raty, T. Kunnari, J. Hakala, P. Mantsala, K. Ylihonko, *Mol. Gen. Genet.* **2000**, 264, 164.
- [78] S. Pelzer, R. Süßmuth, D. Heckmann, J. Recktenwald, P. Huber, G. Jung, W. Wohlleben, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1565.
- [79] A. M. A. van Wageningen, P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. M. Jones, P. J. Solenberg, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 155.
- [80] T. Billign, C. G. Hyun, J. S. Williams, A. M. Csisny, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 959.
- [81] K. Ichinose, M. Ozawa, K. Itou, K. Kunieda, Y. Ebizuka, *Microbiology* **2003**, 149, 1633.
- [82] H. Chen, M. G. Thomas, B. K. Hubbard, H. C. Losey, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11942.
- [83] S. Donadio, M. Sosio, E. Stegmann, T. Weber, W. Wohlleben, *Mol. Genet. Genomics* **2005**, 274, 40.
- [84] H. Chen, G. Agnihotri, Z. Guo, N. L. S. Que, X. Chen, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8124.
- [85] H. Ikeda, T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta, S. Omura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9509.
- [86] S.-E. Wohler, N. Lomovskaya, K. Kulowski, L. Fonstein, J. L. Occi, K. M. Gewain, D. J. MacNeil, C. R. Hutchinson, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 681.
- [87] C. Zhang, C. Albermann, X. Fu, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16420.
- [88] Y. Ogasawara, K. Katayama, A. Minami, M. Otsuka, T. Eguchi, K. Kakinuma, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 79.
- [89] C. Bihlmaier, E. Welle, C. Hofmann, K. Welzel, A. Vente, E. Breitling, M. Müller, S. Glaser, A. Bechthold, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2113.
- [90] H. Chen, Z. Zhao, T. M. Hallis, Z. Guo, H.-w. Liu, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 607.
- [91] H. Takahashi, Y.-n. Liu, H. Chen, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9340.
- [92] H. Takahashi, Y.-n. Liu, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1432.
- [93] 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.
- [94] A. Gonzalez, L. L. Remsing, F. Lombo, M. J. Fernandez, L. Prado, A. F. Brana, E. Kunzel, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **2001**, 264, 827.
- [95] L. L. Remsing, J. Garcia-Bernardo, A. Gonzalez, E. Kunzel, U. Rix, A. F. Brana, D. W. Bearden, C. Mendez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1606.
- [96] J. Niemi, P. Mantsala, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 2942.
- [97] L. Rodriguez, I. Aguirrezabalaga, N. Allende, A. F. Brana, C. Mendez, J. A. Salas, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 721.

- [98] L. Rodriguez, D. Rodriguez, C. Olano, A. F. Brana, C. Mendez, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 5358.
- [99] H. Zhang, J. A. White-Phillip, C. E. Melançon III, H.-j. Kwon, W.-l. Yu, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14670.
- [100] L. Wang, R. L. White, L. C. Vining, *Microbiology* **2002**, 148, 1091.
- [101] L. Westrich, S. Domann, B. Faust, D. Bedford, D. A. Hopwood, A. Bechthold, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 170, 381.
- [102] D. Hoffmeister, K. Ichinose, S. Domann, B. Faust, A. Trefzer, G. Drager, A. Kirschning, C. Fischer, E. Kunzel, D. Bearden, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 821.
- [103] F. Lombó, N. Menendez, J. A. Salas, C. Mendez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 73, 1.
- [104] N. Menendez, M. Nur-e-Alam, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas, C. Mendez, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 21.
- [105] X. Y. Jia, Z. H. Tian, L. Shao, X. D. Qu, Q. F. Zhao, J. Tang, G. L. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 575.
- [106] G. Weitnauer, A. Mühlenweg, A. Trefzer, D. Hoffmeister, R. D. Süßmuth, G. Jung, K. Welzel, A. Vente, U. Girreser, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 569.
- [107] S. F. Haydock, A. N. Appleyard, T. Mironenko, J. Lester, N. Scott, P. F. Leadlay, *Microbiology* **2005**, 151, 3161.
- [108] J. S. Thorson, S. F. Lo, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5827.
- [109] C. Dürr, H. J. Schnell, A. Luzhetskyy, R. Murillo, M. Weber, K. Welzel, A. Vente, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 365.
- [110] Y. Sun, X. Zhou, H. Dong, G. Tu, M. Wang, B. Wang, Z. Deng, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 431.
- [111] K. Raty, A. Hautala, S. Torkkell, J. Kantola, P. Mantsala, J. Hakala, K. Ylihönko, *Microbiology* **2002**, 148, 3375.
- [112] L. Hong, Z. Zhao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14262.
- [113] Z. Zhao, L. Hong, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7692.
- [114] L. Hong, Z. Zhao, C. E. Melançon III, H. Zhang, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4954.
- [115] R. E. Campbell, S. C. Mosimann, I. van de Rijn, M. E. Tanner, N. C. J. Strynadka, *Biochemistry* **2000**, 39, 7012.
- [116] T. Bililign, E. M. Shepard, J. Ahlert, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2002**, 3, 1143.
- [117] Q. Gao, C. Zhang, S. Blanchard, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 733.
- [118] C. Hofmann, R. Boll, B. Heitmann, G. Hauser, C. Dürr, A. Frerich, G. Weitnauer, S. J. Glaser, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 1137.
- [119] L. Jolly, P. Ferrari, D. Blanot, J. Van Heijenoort, F. Fassy, D. Mengin-Lecreux, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 262, 202.
- [120] F. Pompeo, Y. Bourne, J. van Heijenoort, F. Fassy, D. Mengin-Lecreux, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 3833.
- [121] F. Kudo, K. Kawabe, H. Kuriki, T. Eguchi, K. Kakinuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1711.
- [122] P. M. Flatt, T. Mahmud, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 358.
- [123] S. Ikeno, D. Aoki, M. Hamada, M. Hori, K. S. Tsuchiya, *J. Antibiot.* **2006**, 59, 18.
- [124] J. F. Aparicio, P. Caffrey, J. A. Gil, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 179.
- [125] N. Palaniappan, S. Ayers, S. Gupta, E. S. Habib, K. A. Reynolds, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 753.
- [126] L. Du, C. Sanchez, M. Chen, D. J. Edwards, B. Shen, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 623.
- [127] N. A. Webb, A. M. Mulichak, J. S. Lam, H. L. Rocchetta, R. M. Garavito, *Protein Sci.* **2004**, 13, 529.
- [128] L. L. Major, B. A. Wolucka, J. H. Naismith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18309.
- [129] T. J. Hosted, T. X. Wang, D. C. Alexander, A. C. Horan, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 27, 386.
- [130] G. S. Shackelford, C. A. Regni, L. J. Beamer, *Protein Sci.* **2004**, 13, 2130.
- [131] L. Lindqvist, R. Kaiser, P. R. Reeves, A. A. Lindberg, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 122.
- [132] J. S. Thorson, T. M. Kelly, H.-w. Liu, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 1840.
- [133] S. Beyer, G. Mayer, W. Piepersberg, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 258, 1059.
- [134] W. Piepersberg in *Biotechnology of Antibiotics* (Hrsg.: W. R. Strohl), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 81.
- [135] Y. Kumada, S. Horinouchi, T. Uozumi, T. Beppu, *Gene* **1986**, 42, 221.
- [136] X. He, G. Agnihotri, H.-w. Liu, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4615.
- [137] X. M. He, H.-w. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 701.
- [138] X. He, H.-w. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 590.
- [139] D. A. Johnson, H.-w. Liu in *Comprehensive Natural Product Chemistry* (Hrsg.: D. H. R. Barton, O. Meth-Cohn, K. Nakanishi), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 311.
- [140] M. L. Davis, J. B. Thoden, H. M. Holden, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 19227.
- [141] E. S. Burgie, H. M. Holden, *Biochemistry* **2007**, 46, 8999.
- [142] E. S. Burgie, J. B. Thoden, H. M. Holden, *Protein Sci.* **2007**, 16, 887.
- [143] I. C. Schoenhofen, V. V. Lunin, J. P. Julien, Y. Li, E. Ajamian, A. Matte, M. Cygler, J. R. Brisson, A. Aubry, S. M. Logan, S. Bhatia, W. W. Wakarchuk, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 8907.
- [144] G. Draeger, S.-H. Park, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2611.
- [145] D. A. Johnson, G. T. Gassner, V. Bandarian, F. J. Ruzicka, D. P. Ballou, G. H. Reed, H.-w. Liu, *Biochemistry* **1996**, 35, 15846.
- [146] X. M. H. Chen, O. Ploux, H.-w. Liu, *Biochemistry* **1996**, 35, 16412.
- [147] C.-w. T. Chang, D. A. Johnson, V. Bandarian, H. Zhou, R. Lo-Brutto, G. H. Reed, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4239.
- [148] P. Smith, P. H. Szu, C. Bui, H.-w. Liu, S. C. Tsai, *Biochemistry* **2008**, 47, 6329.
- [149] N. Beyer, J. Alam, T. M. Hallis, Z. Guo, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5584.
- [150] C. J. Thibodeaux, C. E. Melançon III, H.-w. Liu, *Nature* **2007**, 446, 1008.
- [151] S. T. Allard, M. F. Giraud, C. Whitfield, M. Graninger, P. Messner, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 283.
- [152] S. T. Allard, K. Beis, M. F. Giraud, A. D. Hegeman, J. W. Gross, R. C. Wilmouth, C. Whitfield, M. Graninger, P. Messner, A. G. Allen, D. J. Maskell, J. H. Naismith, *Structure* **2002**, 10, 81.
- [153] K. Beis, S. T. Allard, A. D. Hegeman, G. Murshudov, D. Philp, J. H. Naismith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11872.
- [154] S. T. Allard, W. W. Cleland, H. M. Holden, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 2211.
- [155] Y. Liu, J. B. Thoden, J. Kim, E. Berger, A. M. Gulick, F. J. Ruzicka, H. M. Holden, P. A. Frey, *Biochemistry* **1997**, 36, 10675.
- [156] J. B. Thoden, H. M. Holden, *Biochemistry* **1998**, 37, 11469.
- [157] P. Z. Gatzeva-Topalova, A. P. May, M. C. Sousa, *Biochemistry* **2004**, 43, 13370.
- [158] W. S. Somers, M. L. Stahl, F. X. Sullivan, *Structure* **1998**, 6, 1601.
- [159] J. S. Schutzbach, D. S. Feingold, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 2476.
- [160] P. A. Frey, *FASEB J.* **1996**, 10, 461.
- [161] T. M. Hallis, Z. Zhao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10493.
- [162] T. M. Hallis, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6765.
- [163] J. P. Morrison, J. A. Read, W. G. Coleman, Jr., M. E. Tanner, *Biochemistry* **2005**, 44, 5907.
- [164] J. A. Read, R. A. Ahmed, J. P. Morrison, W. G. Coleman, Jr., M. E. Tanner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8878.

- [165] Y. Liu, J. B. Thoden, J. Kim, E. Berger, A. M. Gulick, F. J. Ruzicka, H. M. Holden, P. A. Frey, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10675.
- [166] M. Rizzi, M. Tonetti, P. Vigevari, L. Sturla, A. Bisso, A. De Flora, D. Bordo, M. Bolognesi, *Structure* **1998**, *6*, 1453.
- [167] S. Menon, M. L. Stahl, R. Kumar, G.-Y. Xu, F. Sullivan, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26743.
- [168] C. Rosano, A. Bisso, G. Izzo, M. Tonetti, L. Sturla, A. De Flora, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 77.
- [169] R. Boll, C. Hofmann, B. Heitmann, G. Hauser, S. Glaser, T. Koslowski, T. Friedrich, A. Bechthold, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14756.
- [170] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097.
- [171] B. Ostash, A. Saghatelian, S. Walker, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 257.
- [172] M. K. Kharel, D. B. Basnet, H. C. Lee, K. Liou, Y. H. Moon, J.-J. Kim, J. S. Woo, J. K. Sohng, *Mol. Cells* **2004**, *18*, 71.
- [173] R. D. Woodyer, G. Li, H. Zhao, W. A. van der Donk, *Chem. Commun.* **2007**, 359.
- [174] J. K. Sohng, T.-J. Oh, J.-J. Lee, S.-G. Kim, *Mol. Cells* **1997**, *7*, 674.
- [175] J. S. Thorson, E. L. Sievers, J. Ahlert, E. Shepard, R. E. Whitwam, K. C. Onwueme, M. Ruppen, *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 1841.
- [176] Y. Odakura, S. Kase, S. Itoh, S. Satoh, S. Takasawa, K. Takahashi, K. Shirahata, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1670.
- [177] T. Dai, T. Ohta, E. Hashimoto, M. Hasegawa, *Mol. Gen. Genet.* **1992**, *236*, 39.
- [178] T. Dai, T. Ohta, E. Hashimoto, M. Hasegawa, *Mol. Gen. Genet.* **1992**, *232*, 262.
- [179] I. Treese, G. Hauser, A. Mühlenweg, C. Hofmann, M. Schmidt, G. Weitnauer, S. Glaser, A. Bechthold, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 400.
- [180] G. J. Davies, T. M. Gloster, B. Henrissat, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 637.
- [181] A. Luzhetskyy, C. Mendez, J. A. Salas, A. Bechthold, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 680.
- [182] S. P. Craig III, A. E. Eakin, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20231.
- [183] S. C. Sinha, J. L. Smith, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 733.
- [184] F. Kudo, T. Fujii, S. Kinoshita, T. Eguchi, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4360.
- [185] „Isolation of antitumor agent BE-7585A from *Amycolatopsis vineria*“: T. Okabe, H. Suda, F. Sato, M. Okanishi, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Japan, JP 0216894, **1990**, S. 8.
- [186] A. Vrielink, W. Ruger, H. P. C. Driessen, P. S. Freemont, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3413.
- [187] <http://www.cazy.org>.
- [188] A. L. Lovering, L. H. De Castro, D. Lim, N. C. Strynadka, *Science* **2007**, *315*, 1402.
- [189] J. E. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone, B. Henrissat, *Biochem. J.* **1997**, *326*, 929.
- [190] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 307.
- [191] U. M. Ünlügil, J. M. Rini, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 510.
- [192] Y. Bourne, B. Henrissat, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 593.
- [193] C. Breton, J. Mucha, C. Jeanneau, *Biochimie* **2001**, *83*, 713.
- [194] Y. Hu, S. Walker, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1287.
- [195] C. A. R. Wiggins, S. Munro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7945.
- [196] F. K. Hagen, B. Hazes, R. Raffo, D. deSa, L. A. Tabak, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6797.
- [197] B. W. Murray, S. Takayama, J. Schultz, C. H. Wong, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11183.
- [198] C. Busch, F. Hofmann, J. Selzer, S. Munro, D. Jeckel, K. Aktories, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19566.
- [199] K. Shibayama, S. Ohsuka, T. Tanaka, Y. Arakawa, M. Ohta, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5313.
- [200] J. C. M. Uitdehaag, R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, B. W. Dijkstra, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 432.
- [201] J. E. Pak, P. Arnoux, S. Zhou, P. Sivarajah, M. Satkunarajah, X. Xing, J. M. Rini, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26693.
- [202] A. M. Mulichak, H. C. Losey, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Structure* **2001**, *9*, 547.
- [203] A. M. Mulichak, H. C. Losey, W. Lu, Z. Wawrzak, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9238.
- [204] A. M. Mulichak, W. Lu, H. C. Losey, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5170.
- [205] D. N. Bolam, S. Roberts, M. R. Proctor, J. P. Turkenburg, E. J. Dodson, C. Martinez-Fleites, M. Yang, B. G. Davis, G. J. Davies, H. J. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5336.
- [206] C. Martinez-Fleites, M. Proctor, S. Roberts, D. N. Bolam, H. J. Gilbert, G. J. Davies, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1143.
- [207] M. Mittler, A. Bechthold, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 67.
- [208] D. Hoffmeister, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 557.
- [209] D. Hoffmeister, B. Wilkinson, G. Foster, P. J. Sidebottom, K. Ichinose, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 287.
- [210] G. J. Williams, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 657.
- [211] S. M. Hancock, M. D. Vaughan, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 509.
- [212] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171.
- [213] L. C. Pedersen, T. A. Darden, M. Negishi, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21869.
- [214] S. J. Charnock, G. J. Davies, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6380.
- [215] N. Tarbouriech, S. J. Charnock, G. J. Davies, *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 655.
- [216] L. Qiao, B. W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7653.
- [217] I. Tvaroska, I. Andre, J. P. Carver, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8762.
- [218] D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11.
- [219] K. Persson, H. D. Ly, M. Dieckelmann, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, N. C. Strynadka, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 166.
- [220] L. C. Pedersen, J. Dong, F. Taniguchi, H. Kitagawa, J. M. Krahn, L. G. Pedersen, K. Sugahara, M. Negishi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14420.
- [221] E. Boix, Y. Zhang, G. J. Swaminathan, K. Brew, K. R. Acharya, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28310.
- [222] H. D. Ly, B. Loughheed, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, *Biochemistry* **2002**, *41*, 5075.
- [223] Y. Zhang, G. J. Swaminathan, A. Deshpande, E. Boix, R. Natesh, Z. Xie, K. R. Acharya, K. Brew, *Biochemistry* **2003**, *42*, 13512.
- [224] J. Flint, E. Taylor, M. Yang, D. N. Bolam, L. E. Tailford, C. Martinez-Fleites, E. J. Dodson, B. G. Davis, H. J. Gilbert, G. J. Davies, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 608.
- [225] R. P. Gibson, J. P. Turkenburg, S. J. Charnock, R. Lloyd, G. J. Davies, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1337.
- [226] D. Liang, J. Qiao, *J. Mol. Evol.* **2007**, *64*, 342.
- [227] L. M. Quiros, R. J. Carbajo, A. F. Brana, J. A. Salas, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11713.
- [228] C. E. Melançon III, H. Takahashi, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16726.
- [229] S. A. Borisova, L. Zhao, C. E. Melançon III, C.-L. Kao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6534.
- [230] C. Leimkuhler, M. Fridman, T. Lupoli, S. Walker, C. T. Walsh, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10546.
- [231] Y. Yuan, H. S. Chung, C. Leimkuhler, C. T. Walsh, D. Kahne, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14128.

- [232] S. A. Borisova, C. Zhang, H. Takahashi, H. Zhang, A. Wong, J. S. Thorson, H.-w. Liu, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2814; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2748.
- [233] P. G. Hultin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1299.
- [234] M. A. Fischbach, H. Lin, D. R. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 571.
- [235] T. Liu, M. K. Kharel, C. Fischer, A. McCormick, J. Rohr, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1070.
- [236] C. Dürr, D. Hoffmeister, S.-E. Wohler, K. Ichinose, M. Weber, U. von Mulert, J. S. Thorson, A. Bechthold, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2962.
- [237] A. Minami, T. Eguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5102.
- [238] X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1467.
- [239] C.-L. Kao, S. A. Borisova, H. J. Kim, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5606.
- [240] L. Tang, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 547.
- [241] S. A. Borisova, H. J. Kim, X. Pu, H.-w. Liu, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1554.
- [242] C. R. Hutchinson, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 319.
- [243] T. M. Hallis, H.-w. Liu, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 579.
- [244] H. G. Floss, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 183.
- [245] C. Méndez, J. A. Salas, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 449.
- [246] A. R. Butler, N. Bate, D. E. Kiehl, H. A. Kirst, E. Cundliffe, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 713.
- [247] C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 124.
- [248] J. M. Langenhan, B. R. Griffith, J. S. Thorson, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1696.
- [249] C. J. Thibodeaux, H.-w. Liu, J. S. Thorson in *Comprehensive Glycoscience*, Vol. 3 (Hrsg.: J. P. Kamerling, G.-J. Boons, Y. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A. G. J. Voragen), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 373.
- [250] C. J. Thibodeaux, H.-w. Liu, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 785.
- [251] J. A. Salas, C. Méndez, *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 219.
- [252] H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2195; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2147.
- [253] C. Méndez, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, J. A. Salas, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 710.
- [254] H. Decker, S. Haag, G. Udvarnoki, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1214; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1107.
- [255] P. J. Solenberg, P. Matsushima, D. R. Stack, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, R. H. Baltz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 195.
- [256] K. Madduri, J. Kennedy, G. Rivola, A. Inventi-Solari, S. Filipini, G. Zanuso, A. L. Colombo, K. M. Gewain, J. L. Occi, D. J. MacNeil, C. R. Hutchinson, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 69.
- [257] R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265.
- [258] S. Weist, R. D. Süßmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141.
- [259] L. C. Webster, P. T. Anastas, T. C. Williamson, *ACS Symp. Ser.* **1996**, *626*, 198.
- [260] J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 881.
- [261] M. Doumith, R. Legrand, C. Lang, J. A. Salas, M. C. Raynal, *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 1039.
- [262] S. Gaisser, J. Reather, G. Wirtz, L. Kellenberger, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 391.
- [263] S. Gaisser, R. Lill, G. Wirtz, F. Grolle, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Mol. Microbiol.* **2001**, *41*, 1223.
- [264] S. A. Borisova, L. Zhao, D. H. Sherman, H.-w. Liu, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 133.
- [265] L. Zhao, J. Ahlert, Y. Xue, J. S. Thorson, D. H. Sherman, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9881.
- [266] C. E. Melançon III, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4896.
- [267] W. S. Jung, A. R. Han, J. S. J. Hong, S. R. Park, C. Y. Choi, J. W. Park, Y. J. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 1373.
- [268] B. B. Pageni, T.-J. Oh, K. Liou, Y. J. Yoon, J. K. Sohng, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 88.
- [269] S.-E. Wohler, G. Blanco, F. Lombo, E. Fernandez, A. F. Brana, S. Reich, G. Udvarnoki, C. Méndez, H. Decker, J. Frevert, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10596.
- [270] G. Blanco, E. P. Patallo, A. F. Brana, A. Trefzer, A. Bechthold, J. Rohr, C. Méndez, A. P. Salas, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 253.
- [271] C. Fischer, L. Rodriguez, E. P. Patallo, F. Lipata, A. F. Brana, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1685.
- [272] F. Lombo, M. Gibson, L. Greenwell, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas, C. Méndez, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1709.
- [273] M. Pérez, F. Lombo, L. Zhu, M. Gibson, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas, C. Méndez, *Chem. Commun.* **2005**, *12*, 1604.
- [274] E. Kunzel, B. Faust, C. Oelkers, U. Weissbach, D. W. Bearden, G. Weitnauer, L. Westrich, A. Bechthold, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11058.
- [275] A. Trefzer, D. Hoffmeister, E. Kunzel, S. Stockert, G. Weitnauer, L. Westrich, U. Rix, J. Fuchser, K. U. Bindseil, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 133.
- [276] D. Hoffmeister, G. Drager, K. Ichinose, J. Rohr, A. Bechthold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4678.
- [277] A. Trefzer, G. Blanco, L. Remsing, E. Kunzel, U. Rix, F. Lipata, A. F. Brana, C. Méndez, J. Rohr, A. Bechthold, J. A. Salas, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6056.
- [278] A. Trefzer, C. Fischer, S. Stockert, L. Westrich, E. Kunzel, U. Girreser, J. Rohr, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1239.
- [279] C. Sanchez, L. Zhu, A. F. Brana, A. P. Salas, J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 461.
- [280] C. Zhang, C. Albermann, X. Fu, N. R. Peters, J. D. Chisholm, G. Zhang, E. J. Gilbert, G. P. Wang, D. L. Van Vranken, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 795.
- [281] C. Rupprath, T. Schumacher, L. Elling, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1637.
- [282] J. M. Langenhan, N. R. Peters, I. A. Guzei, F. M. Hoffmann, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12305.
- [283] A. Ahmed, N. R. Peters, M. K. Fitzgerald, J. A. Watson, Jr., F. M. Hoffmann, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14224.
- [284] H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998.
- [285] J. Wang, J. Li, H.-N. Chen, H. Chang, C. T. Tanifum, H.-H. Liu, P. G. Czyryca, C.-W. T. Chang, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6271.
- [286] B. R. Griffith, J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 622.
- [287] D. Hoffmeister, J. Yang, L. Liu, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13184.
- [288] D. Hoffmeister, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 989.
- [289] J. Yang, L. Liu, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 992.
- [290] J. Yang, X. Fu, J. Liao, L. Liu, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 657.
- [291] J. Jiang, J. B. Biggins, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6803.
- [292] J. Jiang, J. B. Biggins, J. S. Thorson, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1550; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1502.
- [293] W. A. Barton, J. Lesniak, J. B. Biggins, P. D. Jeffrey, J. Jiang, K. R. Rajashankar, J. S. Thorson, D. B. Nikolov, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 545.
- [294] W. A. Barton, J. B. Biggins, J. Jiang, J. S. Thorson, D. B. Nikolov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13397.
- [295] R. M. Mizanur, C. J. Zea, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15993.
- [296] R. M. Mizanur, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 836.
- [297] Z. Zhang, M. Tsujimura, J.-i. Akutsu, M. Sasaki, H. Tajima, Y. Kawarabayasi, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9698.
- [298] J. Bae, K.-H. Kim, D. Kim, Y. Choi, J.-S. Kim, S. Koh, S.-I. Hong, D.-S. Lee, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1963.
- [299] R. Moretti, J. S. Thorson, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16942.

- [300] L. Elling, C. Rupprath, N. Günther, U. Römer, S. Verseck, P. Weingarten, G. Dräger, A. Kirschning, W. Piepersberg, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1423.
- [301] J. Oh, S.-G. Lee, B.-G. Kim, J. K. Sohng, K. Liou, H. C. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*, 452.
- [302] K. R. Love, J. G. Swoboda, C. J. Noren, S. Walker, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 753.
- [303] A. Aharoni, K. Thieme, C. P. C. Chiu, S. Buchini, L. L. Lairson, H. Chen, N. C. J. Strynadka, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 609.
- [304] M. Persson, M. M. Palcic, *Anal. Biochem.* **2008**, *378*, 1.
- [305] J. Yang, D. Hoffmeister, L. Liu, X. Fu, J. S. Thorson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1577.
- [306] H. C. Losey, M. W. Pecuh, Z. Chen, U. S. Eggert, S. D. Dong, I. Pelczer, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4745.
- [307] H. C. Losey, J. Jiang, J. B. Biggins, M. Oberthur, X.-Y. Ye, S. D. Dong, D. Kahne, J. S. Thorson, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1305.
- [308] X. Fu, C. Albermann, C. Zhang, J. S. Thorson, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1513.
- [309] C. Zhang, Q. Fu, C. Albermann, L. Li, J. S. Thorson, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 385.
- [310] C. Zhang, B. R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I.-K. Lee, L. Li, J. S. Thorson, *Science* **2006**, *313*, 1291.
- [311] A. Minami, R. Uchida, T. Eguchi, K. Kakinuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6148.
- [312] M. Kopp, C. Rupprath, H. Irschik, A. Bechthold, L. Elling, M. Müller, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 813.
- [313] C. L. Freel Meyers, M. Oberthur, J. W. Anderson, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4179.
- [314] C. Albermann, A. Soriano, J. Jiang, H. Volmer, J. B. Biggins, W. A. Barton, J. Lesniak, D. B. Nikolov, J. S. Thorson, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 933.
- [315] M. Yang, M. R. Proctor, D. N. Bolam, J. C. Errey, R. A. Field, H. J. Gilbert, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9336.
- [316] M. Oberthur, C. Leimkuhler, R. G. Kruger, W. Lu, C. T. Walsh, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10747.
- [317] C. E. Melançon? III, C. J. Thibodeaux, H.-w. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 499.