



Od sekwencji DNA do antybiotyku

Krzysztof Pawlik, Magdalena Kotowska

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Polska Akademia Nauk, Wrocław

From DNA sequence to antibiotic

Summary

Progress in molecular biology, large number of known bacterial sequences and a number of microbiological genome sequencing projects finished or running allow to think about creating *in vitro* the DNA code in order to obtain new metabolites. Here, we describe the attempts of biosynthesis of new polyketides by designing new genes coding polyketide synthases. In assembling new polyketide synthases, the fragments of known genes are widely used. High homology of the polyketide synthase genes and a number of known produced polyketides give a possibility to describe a polyketide synthase on a DNA sequence level. Basing on known amino acid motifs, it is possible to determine enzymatic activities acting in the process of polyketide synthesis, and so to predict putative structure of the final metabolite. Successful artificial synthesis of 6-deoxyerythronolide B synthase genes show how near is the realization of the idea of producing new chemical compounds by creating DNA information.

Key words:

polyketide synthase, DNA manipulation, combinatorial biosynthesis.

1. Wprowadzenie

Postęp w poznawaniu biologii komórki na poziomie molekularnym stwarza pokusę, aby nie tylko biernie korzystać ze związków występujących w naturze, ale i podejmować próby projektowania, programowania i sterowania biosyntezą takich związków. Fakt, że DNA zawiera informacje o budowie wszystkich elementów komórki daje teoretyczną możliwość wpływania na produkty metabolizmu przez zmianę informacji zawartej w DNA. Zagadnienie tworzenia nowych metabolitów *in vivo* chcielibyśmy

Adres do korespondencji

Krzysztof Pawlik,
Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Weigla 12,
53-114 Wrocław.

przybliżyć na przykładzie syntaz poliketydowych promieniowców. Związki poliketydowe charakteryzują się posiadaniem licznych centrów chiralnych, stąd ich synteza chemiczna na dużą skalę jest procesem złożonym i nieoptymalnym. Aby w pełni kontrolować proces biosyntezy konieczna jest wiedza o zjawiskach zachodzących na poszczególnych etapach przetwarzania informacji zawartej w DNA i ich wpływu na ostateczny produkt metabolizmu. Na etapie translacji, informacja zawarta w DNA jest przekładana na sekwencję aminokwasową, powstała sekwencja aminokwasowa warunkuje wszystkie poziomy struktury białka. Na etapie biosyntezy informacja zawarta w strukturze białek (aktywność enzymatyczna, specyficzność substratowa) jest przekładana na strukturę syntetyzowanego metabolitu.

2. Budowa i działanie syntaz poliketydowych

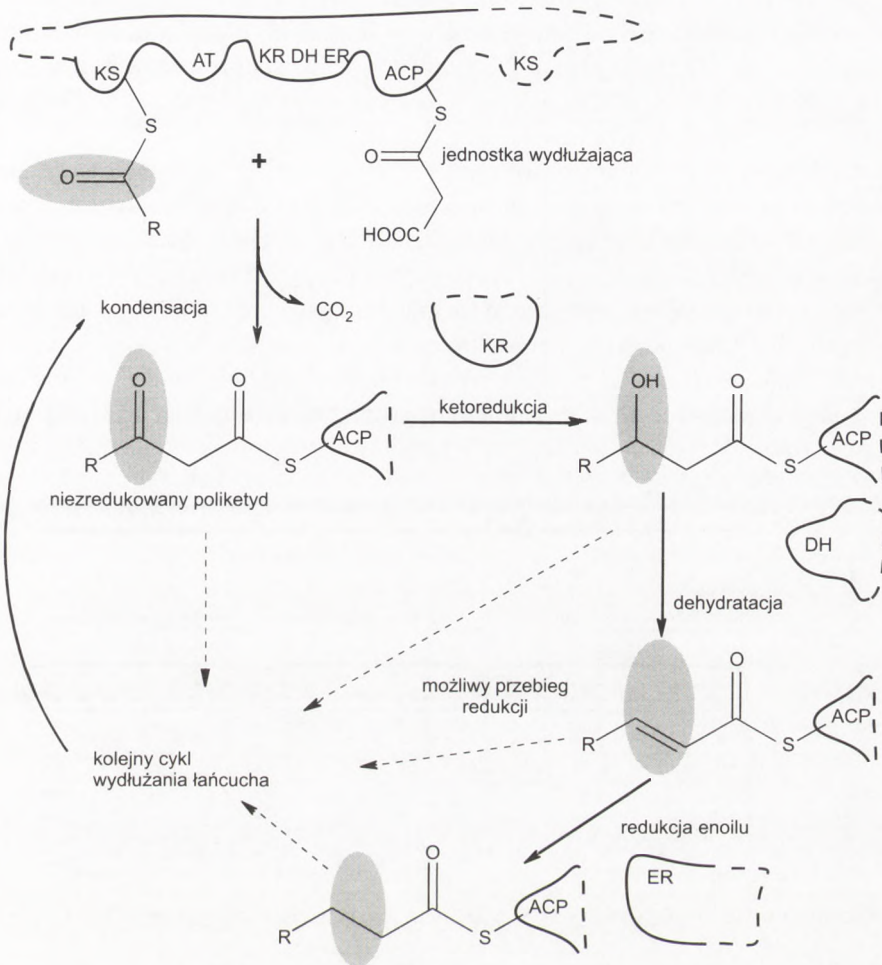
Poliketydy to organiczne związki chemiczne, których szkielet węglowy jest polimerem reszt acylowych. Są produktami metabolizmu wtórnego bakterii, roślin oraz grzybów. Są wśród nich antybiotyki, związki przeciwgrzybicze, antypasożytnicze, przeciwnowotworowe i immunosupresyjne (1-4). Występują powszechnie w przyrodzie w niezwykle zróżnicowanych postaciach od najmniejszego poliketydu – kwasu 6-metylosalicylowego o masie 152 Da do największego znanego poliketydu – cyklicznego polieteru maitotoksyny o masie 3422 Da (5,6).

Biosynteza poliketydów przebiega w sposób analogiczny do biosyntezy kwasów tłuszczowych (schemat, rys. 1). Obejmuje ona szereg reakcji kondensacji dekarboksylacyjnej, w których do wydłużanego łańcucha dobudowywane są jednostki dwuwęgłowe pochodzące z acylo-koenzymu A. W każdym cyklu biosyntezy po przyłączeniu kolejnej jednostki wydłużającej grupa beta-keetonowa powstającego łańcucha węglowego może ulec redukcji do grupy hydroksylowej, wiązania podwójnego lub pojedynczego. Produkty pośrednie pozostają przez cały czas kowalencyjnie związane z enzymami przeprowadzającymi ich „obróbkę”.

Poliketydy są syntetyzowane przez wieloenzymatyczne kompleksy – syntazy poliketydowe (PKS, *polyketide synthase*). Właściwości syntaz poliketydowych umożliwiają wykorzystanie opisanego mechanizmu do tworzenia niemal nieograniczonej różnorodności struktur chemicznych. Syntazy poliketydowe kontrolują dobór substratów, stopień i stereospecyficzność redukcji w każdym cyklu biosyntezy oraz sposób cyklizacji wydłużanego łańcucha. Enzymy modyfikujące towarzyszące syntazom przeprowadzają dalsze przemiany szkieletu poliketydowego (glikozylacja, hydroksylacja, metylacja), co również zwiększa różnorodność produktów.

Tradycyjna klasyfikacja wyróżnia trzy typy syntaz poliketydowych. Typ I obejmuje syntazy poliketydów niearomatycznych (m. in. makrolidów, polieterów, polienów). Są to kompleksy kilku wysokocząsteczkowych białek posiadających liczne domeny enzymatyczne zgrupowane w tzw. moduły, z których każdy używany jest do przeprowadzenia jednego cyklu wydłużania łańcucha poliketydowego. Syntazy ty-

pu II, odpowiedzialne głównie za syntezę wielopierścieniowych poliketydów aromatycznych (np. aktynorodyna, tetracenomycyna), zbudowane są z kilku zasocjowanych enzymów, które są wielokrotnie aktywne w trakcie syntezy jednej cząsteczki, tzn. działają iteracyjnie. Syntazy typu III to enzymy iteracyjne, które, w odróżnieniu



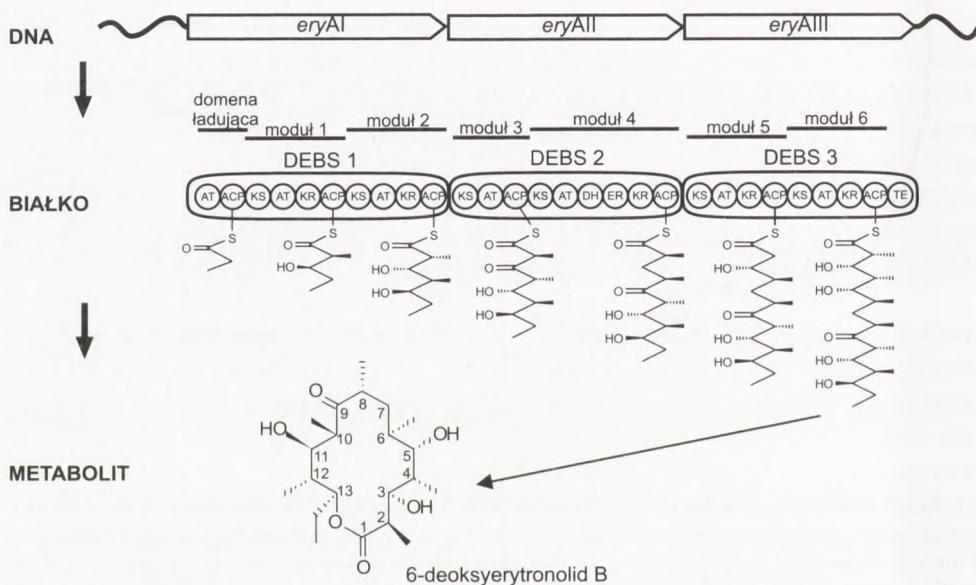
Rys. 1. Schemat przebiegu syntezy łańcucha poliketydowego. R – w pierwszym cyklu biosyntezy reprezentuje resztę starterową, w kolejnych cyklach – wydłużany łańcuch poliketydowy połączony z centrum aktywnym ketosyntazy (KS). Z białkowym nośnikiem grup acylowych (ACP) połączona jest jednostka wydłużająca. Pierwszy cykl biosyntezy rozpoczyna się od kondensacji dekarboksylacyjnej katalizowanej przez KS pomiędzy resztą starterową i wydłużającą (w kolejnych cyklach następuje kondensacja pomiędzy rosnącym łańcuchem i jednostką wydłużającą). Produkt kondensacji pozostaje związany z ACP. Powstająca grupa beta-ketonowa (zaczieniona) może ulec częściowej lub całkowitej redukcji w zależności od zestawu domen redukcyjnych (KR, DH, ER) biorących udział w danym cyklu. Następnie, łańcuch poliketydowy zostaje przeniesiony na domenę KS kolejnego modułu i podlega kondensacji z kolejną jednostką wydłużającą.

od syntaz typu I i II, nie posiadają białka przenoszącego reszty acylowe, lecz działają bezpośrednio na substraty połączone z koenzymem A. Typ III reprezentują przede wszystkim roślinne syntazy chalkonowe.

W miarę postępu badań poznajemy coraz więcej przykładów syntaz, które budową i sposobem działania wykraczają poza przedstawiony podział. Znane są iteracyjne syntazy typu I, a także syntazy typu II działające nieiteracyjnie. Obszerne omówienie tych zagadnień zostało zamieszczone w artykułach przeglądowych: Staunton i Weissman i Shen (7,8). Za przykład do opisu możliwości projektowania metabolitów na poziomie DNA posłużą nam modułowe, nieiteracyjne syntazy poliketydowe typu I.

Bakteryjne syntazy poliketydowe typu I (PKS I) to układ kilku wieloenzymatycznych białek o dużej masie cząsteczkowej: od 130 000 Da (syntaza kwasu orselinowego) do 1 070 000 Da (syntaza rapamycyny) (9). Do najlepiej zbadanych syntaz poliketydowych należy syntaza prekursora erytromycyny – 6-deoksyerytronolidu B (DEBS) z *Saccharopolyspora erythraea*. Schemat budowy syntazy DEBS, a także schemat organizacji kodujących ją genów pokazano na rysunku 2.

Każde białko wchodzące w skład syntazy można podzielić funkcjonalnie na regiony zwane modułami. Jeden moduł jest to grupa domen enzymatycznych potrzeb-



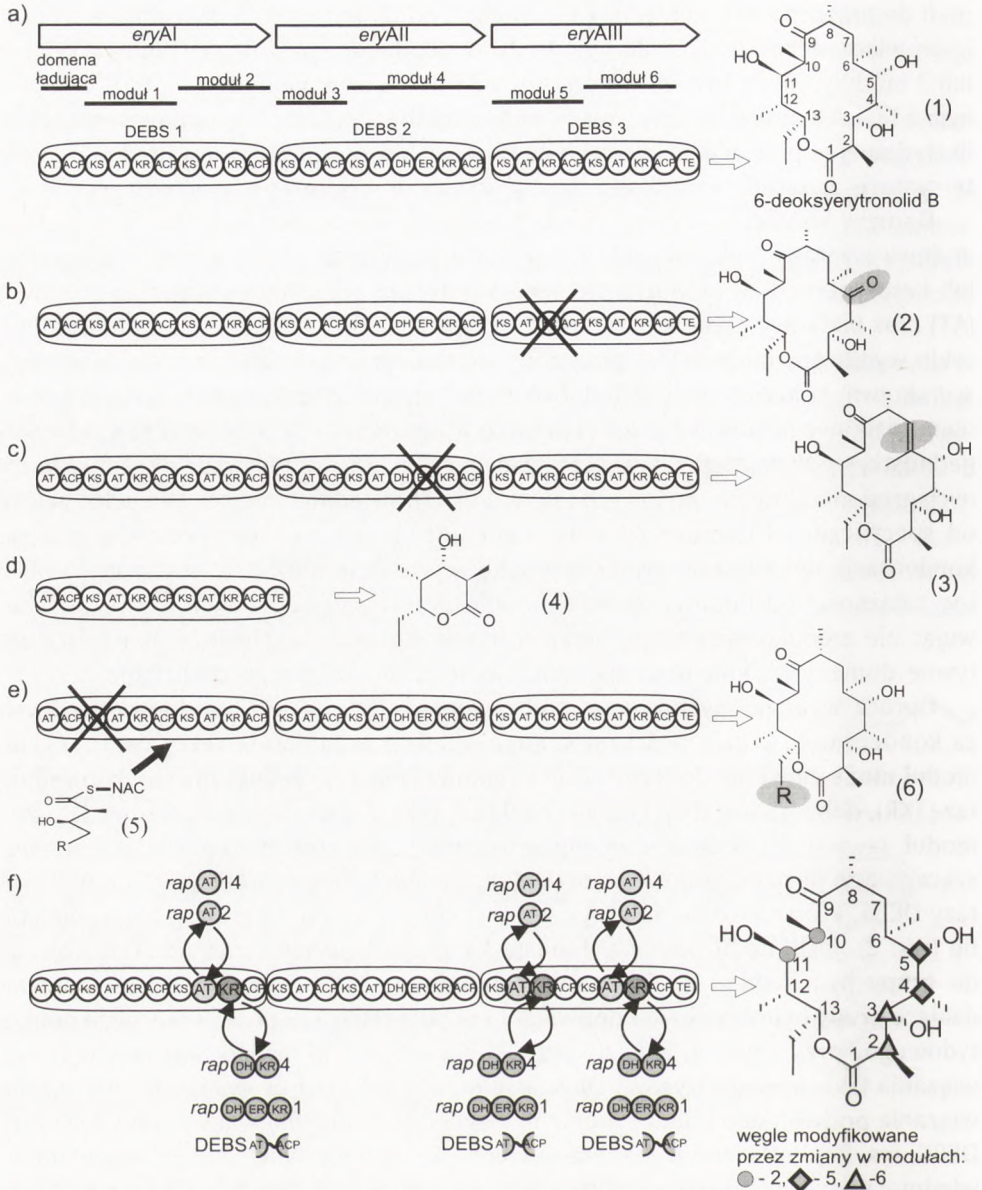
Rys. 2. Schemat organizacji genów i ułożenie podjednostek enzymatycznych syntazy 6-deoksyerytronolidu B. *eryAI*, *eryAII*, i *eryAIII* – geny kodujące białka DEBS1, DEBS2 i DEBS3. Na rysunku zaznaczono domeny enzymatyczne KS, AT, ACP, DH, KR, ER, TE obecne w białkach. Poniżej pokazano kolejne etapy powstawania łańcucha poliketydowego oraz związek będący produktem syntazy – 6-deoksyerytronolid B. Łańcuch połączony z domeną ACP każdego modułu reprezentuje strukturę produktu pośredniego powstającego w danym cyklu biosyntezy. Na ACP domeny ładującej zaznaczono resztę starterową.

nych do przeprowadzenia jednego, pełnego cyklu kondensacji i redukcji reszty acylowej włączanej do poliketydu (rys. 1 i 2). W skład jednego białka wchodzi zwykle 2 lub 3 moduły, może być ich więcej, np. w syntazie awermektyny – 4 (10), a w jednym z białek syntazy rapamycyny – aż 6 modułów (9). Liczba modułów syntazy poliketydowej odpowiada liczbie cykli kondensacji i redukcji przeprowadzanych przez tę syntazę, a zatem warunkuje długość łańcucha węglowego produktu.

Domeny konieczne do wydłużania łańcucha poliketydowego to: syntaza 3-oksoacylowa (syntaza 3-oksoacyl:ACP), nazywana popularnie syntazą beta-ketoacylową lub ketosyntazą (KS), acylotransferaza (transferaza acetylo-CoA/malonylo-CoA:ACP) (AT) oraz białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe (ACP). Na początku każdego cyklu wydłużany łańcuch jest połączony wiązaniem tioestrowym z cysteiną w miejscu aktywnym ketosyntazy, a jednostka wydłużająca z fosfopantoteinowym ramieniem białkowego nośnika grup acylowych (ACP) (rys. 1, 2). Rodzaj reszty acylowej (jednostki wydłużającej) włączanej w danym cyklu, a co za tym idzie obecność bocznych grup metylowych, etylowych i innych w odpowiednim miejscu łańcucha, zależy od specyficzności domeny AT (11). Następnie domena KS przeprowadza reakcję kondensacji dekarboksylacyjnej. Produkt tej reakcji pozostaje związany z ACP i w zależności od budowy danego modułu syntazy ulega redukcji lub też, zachowując nie zredukowaną grupę beta-ketonową, zostaje przeniesiony na miejsce aktywne domeny KS kolejnego modułu i wchodzi do kolejnego cyklu biosyntezy.

Oprócz wymienionych domen podstawowych (KS, AT, ACP), odpowiedzialnych za kondensację, w zależności od stopnia redukcji reszty acylowej w danym cyklu, moduł może zawierać do trzech domen modyfikujących (redukcyjnych): ketoreduktazę (KR), dehydratazę (DH) i enoiloreduktazę (ER). Częsteczką syntetyzowaną przez moduł zawierający jedynie domeny ketosyntazy, acylotransferazy i białka przenoszącego acyl posiada grupę ketonową. Przykładem takiego układu jest moduł 3 syntazy DEBS, który pozostawia grupę ketonową przy węglu 9 powstającego poliketydu (rys. 2). Jeśli moduł zawiera domenę KR grupa ketonowa zostaje zredukowana do grupy hydroksylowej. Tak działają moduły 1, 2, 5, 6 syntazy DEBS wprowadzające grupy hydroksylowe odpowiednio w pozycjach 13, 11, 5, 3 łańcucha poliketydowego, przy czym grupa OH przy węglu 13 jest zaangażowana w tworzenie wiązania laktonowego (rys. 2). Obecność domen KR i DH prowadzi do utworzenia wiązania podwójnego między atomami węgla (np. zmodyfikowany moduł 4 syntazy DEBS, rys. 3c). Jeśli moduł zawiera domeny KR, DH i ER, łańcuch węglowy w odpowiedniej pozycji jest całkowicie zredukowany (np. moduł 4 syntazy DEBS, rys. 2).

Na N-końcu białka zawierającego pierwszy moduł znajdują się domeny: AT i ACP wprowadzające starterową resztę acylową do kondensacji z resztami wydłużającymi. Taki niepełny moduł nazywany jest domeną ładującą (LD, *loading domain*). Na C-końcu ostatniego modułu syntazy występuje zazwyczaj domena tioesterazowa (TE) odpowiedzialna za hydrolizę wiązania łańcucha poliketydu z syntazą oraz, w przypadku antybiotyków makrolidowych, laktonizację produktu (2,12,13).



Rys. 3. Modyfikacje syntazy DEBS. a) niezmodyfikowana syntaza DEBS, zaznaczono układ genów: *eryAI*, *eryAII*, *eryAIII*; modułów, i białek DEBS1, DEBS2, DEBS3, b) syntaza DEBS z unieczynnioną domeną KR w module 5, c) syntaza DEBS z unieczynnioną domeną ER w module 4, d) syntaza DEBS1+TE, e) syntaza DEBS z unieczynnioną domeną KS w module 1 i podawanym z zewnątrz diketydem, f) schemat modyfikacji genetycznych syntazy DEBS prowadzących do uzyskania biblioteki kombinatorycznej pochodnych 6-deoksyerythronolidu B (tab.). Domeny AT w modułach 2, 5 i 6 były zastępowane domenami *rapAT2* i *rapAT14*. Domeny KR w modułach 2, 5 i 6 były zastępowane zestawami domen *rapDH-ER-KR1*, *rapDH-KR4* i łącznikami DEBS-AT-ACP. Zmiany w modułach 2, 5 i 6 powodowały modyfikacje węgli 11-10, 5-4 i 2-3.

Nowo powstały łańcuch poliketydowy najczęściej nie jest ostatecznym produktem poliketydowym. Modyfikacje postpoliketydowe są klasyfikowane jako osobna grupa reakcji w syntezie poliketydów. Reakcje te są prowadzone przez odrębne enzymy. Geny kodujące enzymy modyfikacji postpoliketydowych znajdują się w obrębie zespołu genów syntazy. Enzymy bezpośrednio uczestniczące w modyfikacjach to hydroksylazy, glikozylotransferazy, O-metylotransferazy, ketoreduktazy (14-16).

Cząsteczki cukrów przyłączone do szkieletu poliketydowego warunkują lub wzmacniają aktywność biologiczną wielu związków. Enzymy syntetyzujące pochodne cukrowe przyłączane do poliketydu również pośrednio uczestniczą w modyfikacjach postpoliketydowych. Geny tych enzymów są zlokalizowane wspólnie z pozostałymi genami kodującymi enzymy modyfikujące. Pochodne cukrowe włączane do poliketydów zwykle pochodzą od TDP-glukozy. W wielu systemach syntezy znaleziono TDP-glukoza-4,6-dehydratazę przekształcającą TDP-glukozę w TDP-4-keto-6-deoksyglukozę (17).

3. Struktura pierwszorzędowa syntaz poliketydowych

W opisanym przypadku modułowych syntaz poliketydowych układ domen enzymatycznych odzwierciedla kolejność reakcji zachodzących w czasie syntezy. Ułożenie modułów w białku jest zgodne z kolejnością katalizowanych przez nie cykli biosyntezy. Sekwencje nukleotydeowe kodujące domeny i całe moduły ułożone są w tym samym porządku (18). W tym przypadku łatwo jest prześledzić zależność budowy końcowego produktu poliketydowego od sekwencji DNA.

Z informacji zapisanej w DNA w pierwszym etapie uzyskujemy sekwencję aminokwasową białek syntaz. Z sekwencji aminokwasowej wynikają jednocześnie struktura pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowa białek. Stosunkowo prosta jest analiza struktury pierwszorzędowej podjednostek syntaz. Na podstawie porównań homologii sekwencji aminokwasowych z sekwencjami znanych syntaz i innych enzymów można określić wiele cech syntazy. Znacznie większą trudność sprawia przewidywanie struktur drugo- i trzeciorzędowych białek na podstawie analizy sekwencji oraz określenie zależności pomiędzy tymi strukturami a funkcjami spełnianymi w syntezie poliketydów.

Analiza struktury pierwszorzędowej (sekwencji aminokwasowej) syntaz poliketydowych pozwala na określenie:

- początków i końców modułów,
- aktywności enzymatycznych obecnych w poszczególnych modułach,
- specyficzności substratowej domen acylotransferazowych,
- specyficzności stereochemicznej domen ketoreduktazowych,
- miejsc wiązania kofaktorów,
- położenia regionów międzydomenowych,
- położenia łączników między modułami (*inter modular domains*) (19),

– obecności domen łączących poszczególne białka (*interprotein docking domains*) (20).

Pierwszą domeną w module jest ketosyntaza rozpoczynająca się charakterystyczną sekwencją konsensową $E/D^P/R$ IAV. Miejsce aktywne domeny ketosyntazowej charakteryzuje się sekwencją CSSS. Średnia długość typowej domeny ketosyntazowej wynosi 425 aminokwasy. Wszystkie domeny ketosyntazowe zawierają charakterystyczną sekwencję KSNIGH w pozycji 342 i kończą się sekwencją $NAHV/V/L/V$ E.

Następną w kolejności domeną jest domena acylotransferazowa. Domeny acylotransferazowe rozpoczynają się sekwencją $F/Y/V$ L/V F T/P GQG A/S , miejsce aktywne jest określane sekwencją GHSxGE-104aa-AFH, gdzie pierwsza glicyna jest 84-92 aminokwasem w domenie. Domeny acylotransferazowe kończą się sekwencją $RG^A/V/$ XXDW. Pomiędzy domenami ketosyntazowymi i acylotransferazowymi występują łączniki o długości od 81 do 139 aa. Specyficzność domeny acylotransferazowej decyduje o rodzaju reszty wydłużającej wprowadzanej do łańcucha poliketydowego. Najczęściej do łańcucha poliketydowego są włączane reszty malonylowa, lub metylomalonylowa. Specyficzność acylotransferazy w stosunku do typowych reszt określa sekwencja w pozycji 58-83aa. Dla specyficzności wobec reszty malonylowej charakterystyczna jest sekwencja ETGYA-7-QxAxFGLL, oraz obecność struktury beta-skłret, beta-harmonijka, alfa-helisa w pozycjach 280-300 aa. Domeny acylotransferazowe, włączające resztę metylomalonylową, charakteryzują się sekwencją RVDVV-7-MxSxAxxW (11). Mogą być również włączane inne podjednostki wydłużające, np. reszta etylomalonylowa, metoksymalonylowa, benzoylomalonylowa. Podjednostki te określane są mianem reszt nietypowych. Obecnie nie są znane charakterystyczne sekwencje, które pozwalałyby wnioskować o specyficzności domen AT wobec tych reszt.

Aby grupa ketonowa w nowo przyłączonej do łańcucha podjednostce uległa całkowitej redukcji moduł syntazy musi zawierać trzy aktywności enzymatyczne ketoreduktazę (KR), dehydratazę (DH) i enoiloreduktazę (ER). Pomimo że reakcje redukcji zachodzą w tej kolejności domeny enzymatyczne w sekwencji białka są ułożone w kolejności DH, ER, KR.

Domeny dehydratazowe rozpoczynają się sekwencją konsensową LPTYxFxxxxWL. Charakterystyczną cechą pozwalającą rozpoznać domenę dehydratazową jest konserwatywna sekwencja LxxHxxxGxxxxP, gdzie histydyna jest aminokwasem aktywnym. Domeny dehydratazowe mają długość ok. 160-180 aa. W odległości ok. 110 aminokwasów od wymienionej histydyny występuje motyw GYXYGPXFQ (21).

Kolejno w sekwencji ułożone są domeny enoiloreduktazowe. Domeny enoiloreduktazowe występują najrzadziej, w związku z tym materiał do porównań jest stosunkowo skąpy. Charakteryzują się obecnością sekwencji konsensowej miejsca wiązania NADPH LXHXGXXGGVG (22). Długość domen enoiloreduktazowych wynosi ok. 330 aa.

Seqwencja wiążąca NADPH w domenach ketoreduktazowych znajduje się w pozycji 3-14 aa i ma przebieg $TV^L/V/V$ TG^G/A TG^G/A LG. Centrum aktywne ketoreduktazy jest zbudowane z triady katalitycznej S^{147} , Y^{160} N^{164} i jest homologiczne do rodziny enzymów dehydrogenaz/reduktaz.

Moduły są zakończone domenami przenoszącymi grupy acylowe (ACP). Te domeny mają długość ok. 70 aa, Zawierają typową sekwencję konsensową GxxS, gdzie przyłączane jest ramię fosfopantoteinowe (23). Domeny ACP rozpoczynają się motywem $V/L_A/L_T^G/DLVR$ i kończą $A^V/L_A^A/E^H/\gamma L$.

4. Struktury drugorzędowe podjednostek syntaz poliketydowych

Brak jest wystarczającej wiedzy o strukturach drugo- i trzeciorzędowych syntaz poliketydowych. Duża masa cząsteczkowa syntaz utrudnia uzyskanie struktury kryształicznej całego białka. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej można wyznaczyć typowe struktury jak alfa-helisy czy beta-harmonijki powiązane strukturalnie z wymienionymi, charakterystycznymi motywami aminokwasowymi. Brak jednak badań struktur krystalicznych nie pozwala w pełni wnioskować o roli struktur drugo- i trzeciorzędowych w syntezie poliketydów.

Wiadomo jednak, że modułowe syntazy poliketydowe tworzą kompleksy składające się z dimerów poszczególnych podjednostek syntazy. Białka w dimerze ułożone są helikalnie i współbieżnie, tj. N-końce razem i C-końce razem. Helikalny układ powoduje, że domeny KS i AT aktywne w jednym cyklu są zlokalizowane na jednym białku, a domena ACP oraz domeny redukcyjne aktywne w tym samym cyklu – na białku zorientowanym współbieżnie. Opisany model funkcjonowania syntazy poliketydowej potwierdziły doświadczenia rekonstrukcji aktywnych kompleksów syntazy z zastosowaniem białek o zmutowanych domenach KS i ACP (24-27).

Badania prowadzone w grupie P. Leadlaya pozwoliły scharakteryzować międzybiałkowe domeny wiążące. Domeny te zostały uzyskane jako fragmenty białek syntazy w fuzji z białkami glutationo S-transferazy. Zbadano ich strukturę krystaliczną. Okazało się, że każda podjednostka białkowa syntazy, która nie kończy procesu syntezy jest zakończona sekwencją aminokwasową kodującą alfa-helisę, następna w kolejności podjednostka rozpoczyna się sekwencją kodującą trzy alfa-helisy. Wymienione struktury tworzą rodzaj zamka, spełniającego dwie funkcje – utrzymanie stabilności dimeru poszczególnych podjednostek, oraz połączenie kolejnych dimerów syntazy i zapewnienie prawidłowej kolejności modułów w przebiegu syntezy poliketydu. Sekwencje tworzące wymienione domeny są bardzo konserwatywne, ale nie są wzajemnie kompatybilne pomiędzy różnymi parami końców podjednostek.

5. Projektowanie nowych syntaz poliketydowych

Zależność budowy poliketydowego metabolitu od ułożenia genów i domen enzymatycznych w syntazie pozwala na łatwe zaprogramowanie struktury nowego związku. Znaczna homologia sekwencji genów umożliwia przewidywanie funkcji nowo poznanych syntaz i łączenie fragmentów genów różnych syntaz (12,28,29).

Możliwe jest stosowanie w manipulacjach genetycznych genów lub ich fragmentów, które tylko na podstawie sekwencji sklasyfikowane zostały jako geny kodujące syntazy poliketydowe.

Dotychczas tworzone modyfikacje genetyczne syntaz poliketydowych można podzielić na:

- Modyfikacje istniejących syntaz. Takie modyfikacje prowadzą do zmian w uzyskiwanym produkcie, np. otrzymywany jest krótszy łańcuch poliketydowy lub zmienia się stopień redukcji wybranych atomów węgla.

- Tworzenie nowych, hybrydowych syntaz składających się z fragmentów syntaz istniejących. Szczególnym przypadkiem takiego postępowania jest biosynteza kombinatoryczna. W biosyntezie kombinatorycznej tworzy się kilka niezależnych wersji genów kodujących poszczególne białka syntazy poliketydowej. Następnie poddaje się ekspresji różne kombinacje przygotowanych wcześniej genów. W efekcie uzyskujemy bibliotekę nowych związków poliketydowych.

- Modyfikacje syntezy na etapie modyfikacji postpoliketydowych. Najczęściej modyfikuje się przyłączanie reszt cukrowych lub reakcje O-metylacji grup hydroksylowych.

Idealnym rozwiązaniem do którego się dąży jest całkowicie sztuczne syntetyzowanie sekwencji DNA kodującej nowe zespoły genów syntaz poliketydowych. Sekwencje takie byłyby projektowane na bazie znajomości cech warunkujących powstawanie oczekiwanego związku chemicznego.

Przedstawione eksperymenty obrazują metody i strategię postępowania w uzyskiwaniu nowych związków poliketydowych poprzez modyfikacje syntaz poliketydowych. Badania nad uzyskaniem w sposób naturalny poliketydów o „nienaturalnej” strukturze dotyczą przede wszystkim syntazy DEBS z *Saccharopolyspora erythraea*, pierwszego dobrze poznanego zespołu genów i białek PKS typu I. Największy wkład w rozwój tej dziedziny mają laboratoria P. Laedlaya z Cambridge (UK) i R. McDanieli z firmy Kosan Biosciences (USA). Poznanie sekwencji nukleotydowej zespołów genów syntaz innych makrolidów: oleandomycyny, tylozyny, awermektyny, rapamycyny i związku FK506 pozwoliło na zastosowanie tych genów w konstrukcji nowych syntaz hybrydowych (30-33).

5.1. Modyfikacje istniejących syntaz

Kolinearność domen w obrębie genów oraz porządku reakcji katalizowanych przez domeny enzymatyczne zostały wykorzystane w doświadczeniach „znokautowania” pojedynczych domen redukcyjnych przez wprowadzenie mutacji punktowych genu. W ten sposób w wyniku ukierunkowanej mutagenyzy została unieczynniona domena ketoreduktazowa modułu 5 oraz domena enoiloreduktazowa modułu 4 syntazy DEBS. Mutanty zawierające nieaktywną domenę redukcyjną wytwarzają niezredukowane pochodne erytromycyny, odpowiednio: 5-oksy-pochodną i anhydro-pochodną (rys. 3b i 3c, związki 2 i 3) (34).

Wykorzystując modułowy charakter syntazy DEBS, sklonowano pojedynczy gen kodujący dwa pierwsze moduły syntazy w połączeniu z końcową domeną tioesterazową. W wyniku ekspresji uzyskano hybrydowe białko DEBS1 + TE (rys. 3d). Białko to *in vitro* przekształca podane substraty w triketydowy lakton. Triketyd – produkt dwóch kolejnych kondensacji, jest stabilnym produktem pośrednim niezmodyfikowanej syntazy (rys. 3d związek 4). Zaobserwowano, że DEBS1 + TE wykazuje tolerancję względem starterowej reszty acylowej, włączając oprócz propionylowej także resztę acetylową lub butyrylową (35). Wykazano także, że DEBS1 + TE przekształca podane *in vitro* substraty w sposób selektywny pod względem stereochemicznym. Oznacza to, że włącza substraty o określonej konfiguracji (S) oraz dokonuje inwersji konfiguracji w obrębie powstającego produktu (36).

Oprócz wymienionych białek syntazy otrzymano również kompleksy składające się z białka DEBS1 oraz modułu 3 z domeną tioesterazową, która w wyniku klonowania została umieszczona w „nienaturalnym” miejscu, tj. na końcu modułu 3, a także kompleks składający się z dwóch kompletnych białek: DEBS1, DEBS2 oraz modułu 5 i domeny tioesterazowej. Wszystkie te zespoły białek, powstałych przez „skracanie” naturalnego zespołu genów w połączeniu z przemieszczeniem fragmentu jednego z genów, wytwarzają nowe związki poliketydowe i są przedmiotem badań nad kinetyką enzymatyczną zmodyfikowanego zespołu.

Region odpowiadający domenie ketoreduktazy z modułu 3 DEBS, gdzie występuje ona jako domena nieaktywna, wprowadzono na miejsce aktywnej domeny KR z modułu 2 układu DEBS1 + TE. W wyniku tej wymiany domen otrzymano oczekiwany niezredukowany triketyd. Wymiana domen redukcyjnych w obrębie genów syntaz, jak stwierdzono na podstawie analizy ich sekwencji, jest możliwa dzięki występowaniu stosunkowo długich regionów okalających te domeny. Można im przypisać funkcję strukturalną w białku syntazy, a dla celów modyfikacji genetycznych mają znaczenie jako regiony wyznaczające zakres wymienianego DNA i oddzielające miejsca o określonej funkcji katalitycznej (36,37).

Zaobserwowano, że mutacje unieczynnijające domeny KS modułów od N-końca białka DEBS1 nie wpływają na funkcję modułów położonych dalej, tj. w kierunku C-końca. Obserwacje te powstały w wyniku doświadczenia, w którym do komórek ze zmutowaną domeną KS pierwszego modułu podawano substrat będący metabolitem pośrednim na drodze biosyntezy w postaci estru N-acetylocysteaminu (NAC). Jest to diketyd – produkt kondensacji cząsteczki starterowej (propionylowej) z resztą wydłużającą (metylomalonylową) (rys. 3e związek 5, gdzie R = CH₃). Związek taki, choć w warunkach naturalnych nie występuje w postaci wolnej tylko jako produkt utworzony przez moduł 1 i przeniesiony z ACP modułu 1 na KS modułu 2, został „zaakceptowany” przez domenę KS modułu 2, ulegał kondensacji i katalizie przez dalsze moduły, aż do uzyskania oczekiwanego, nie zmienionego produktu końcowego – 6-deoksyerytronolidu B (rys. 3e związek 6). Diketydy o innej strukturze (rys. 3e, R = wodór, reszta etylowa lub fenyłowa) były również włączane przez syntazę co prowadziło do powstania odpowiednio zmienionych

produktów. Wprowadzanie zmodyfikowanych prekursorów z ominięciem wcześniejszych etapów biosyntezy jest jeszcze jednym sposobem ingerencji w strukturę poliketydu (36).

5.2. Tworzenie syntaz hybrydowych

Strategią alternatywną do ukierunkowanych mutacji genu jest tworzenie genów mozaikowych.

Syntaza awermektyny może włączać ponad 40 alternatywnych substratów – kwasów karboksylowych, których reszty najczęściej stanowią rozgałęziony łańcuch węglowy. Tę tolerancję substratową starterowej domeny AT syntazy awermektyny wykorzystano tworząc mozaikę genów z modułami syntazy DEBS pozbawionej własnego startera. W zespole genów awermektyny, podobnie jak w DEBS, występuje rodzaj starterowego modułu składającego się z dwóch domen: AT i ACP. Moduł starterowy syntazy awermektyny sklonowano w miejscu odpowiedniego fragmentu w układzie DEBS1 + TE. Taki zespół enzymatyczny jest zdolny do wykorzystywania szerszego niż DEBS zakresu alternatywnych cząsteczek starterowych, także o rozgałęzionym łańcuchu węglowym. Klonowanie powtórzono w pełnym zestawie genów DEBS aby przekonać się o wpływie zmiany startera na dalsze etapy syntezy poliketydu, rozpoznanie substratowe dalszych podjednostek syntazy oraz aktywność antybiotyczną powstających pochodnych erytromycyny. Doświadczenia te wykazały olbrzymi potencjał funkcjonalny syntazy DEBS, zdolnej do „obróbki” alternatywnych substratów i wytwarzania tym samym wielu związków o aktywności antybiotycznej (38).

W przeciwieństwie do starterowych domen AT, zróżnicowanych pod względem specyficzności substratowej, domeny acylotransferazowe aktywne w kolejnych cyklach kondensacji najczęściej są specyficzne wobec malonylo-CoA albo metylomalonylo-CoA i włączają do poliketydu resztę acetylową albo propionylową. Zaobserwowano, że na podstawie analizy przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej tych domen można przewidzieć rodzaj włączanej cząsteczki (11). Zbadano wymienialność domen AT dwóch pierwszych modułów syntazy DEBS, warunkujących włączanie propionianu, na domeny AT włączające octan i pochodzące z innych syntaz (39). Rekombinanty wytwarzały nowe pochodne erytromycyny, nie zawierające grupy metylowej w odpowiedniej pozycji pierścienia makrolidowego, a jeden z rekombinantów wydajnością produkcji dorównywał szczepowi niezmutowanemu. Dwa spośród trzech typów rekombinantów zawierały domeny AT pochodzące z zespołu genów PKS, których produkt poliketydowy nie jest znany. Charakterystykę domen AT tych genów przeprowadzono wyłącznie w oparciu na analizie przypuszczalnych sekwencji aminokwasowych. Doświadczenie to wskazuje na możliwość zastosowania jedynie częściowo scharakteryzowanych składników PKS w inżynierii genetycznej poliketydów.

W laboratorium Kosan Biosciences stworzono bibliotekę kombinatoryczną pochodnych 6-deoksyerytronolidu B – aglikonowej części erytromycyny A. Ekspery-

ment polegał na wymianie poszczególnych domen acylotransferazy oraz ketoreduktazy w modułach 2, 5 i 6 syntazy DEBS (rys. 3f). Jako elementy wymienne zastosowano: domenę acylotransferazową z modułu 2 syntazy rapamycyny (*rapAT2*), fragment bezpośrednio łączący domeny AT i ACP (łącznik AT/ACP), układ domen DH/KR z modułu 4 rapamycyny (*rapDH/KR4*) i układ domen modyfikujących DH/ER/KR z modułu 1 syntazy rapamycyny. W rezultacie kombinacji wymienionych elementów z syntazą DEBS uzyskano 33 różne pochodne 6-deoksyerytronolidu B (40). Wyniki eksperymentu zestawiono w tabeli. Wszystkie domeny acylotransferazowe syntazy DEBS, włączają resztę propionylową, domena z modułu 2 rapamycyny jest specyficzna dla malonylo-CoA. Wymiana domen acylotransferazowych syntazy DEBS w modułach 2, 5 i 6 na domenę z syntazy rapamycyny powoduje brak grup metylowych odpowiednio przy węglach 2, 4, 10. Zamiana domen ketoreduktazowych na 18-aminokwasowy łącznik AT/ACP powoduje pozostanie grup ketonowych przy węglach 3, 5, 11. Kolejne stopnie redukcji i dehydratację można uzyskać poprzez pozostawienie domen KR, wprowadzenie układu domen DH/KR, czy układu DH/ER/KR1 (40).

Tabela

Zestawienie mutantów syntazy DEBS i uzyskanych pochodnych 6-deoksyerytronolidu B. Domeny AT zastępowano domenami *rapAT2* lub *rapAT14*, domeny redukcyjne łącznikiem AT/ACP, zestawem *rapDH/KR4* lub *rapDH/ER/KR1*

Kombinacja mutantów	Pochodna 6-deoksyerytronolidu B
1	2
pojedyncze modyfikacje w module 2	
<i>rapAT2</i>	10-dezmetylo
łącznik AT/ACP	brak produktu
<i>rapDH/KR4</i>	10,11-anhydro
<i>rapDH/ER/KR1</i>	11-deoksy
pojedyncze modyfikacje w module 5	
<i>rapAT2</i>	4-dezmetylo
łącznik AT/ACP	5-deoksy-5-oksy
<i>rapDH/KR4</i>	4,5-anhydro
<i>rapDH/ER/KR1</i>	5-deoksy-5-oksy; 5-deoksy
pojedyncze modyfikacje w module 6	
<i>rapAT2</i>	2-dezmetylo
łącznik AT/ACP	3-deoksy-3-oksy; 2-dezmetylo-3-deoksy-3-oksy
<i>rapDH/KR4</i>	2,3-anhydro
<i>rapDH/ER/KR1</i>	3-deoksy-3-oksy; 2,3-anhydro
modyfikacje dwóch elementów w module 2	
<i>rapAT2</i> + łącznik AT/ACP	brak produktu
<i>rapAT2</i> + <i>rapDH/KR4</i>	10-dezmetylo-10,11-anhydro
<i>rapAT2</i> + <i>rapDH/ER/KR1</i>	10-dezmetylo-11-deoksy

1	2		
modyfikacje dwóch elementów w module 6			
<i>rapAT2</i> + łącznik AT/ACP	2-dezmetrylo-3-deoksy-3-oksy		
<i>rapAT2</i> + <i>rapDH/KR4</i>	2-dezmetrylo-3-(epi)		
<i>rapAT2</i> + <i>rapDH/ER/KR1</i>	2-dezmetrylo-3-deoksy-3-oksy		
modyfikacje w module 2 i w module 5			
moduł 2	moduł 5		
<i>rapAT2</i>	łącznik AT/ACP	5-deoksy-5-oksy-10-dezmetrylo	
<i>rapAT2</i>	<i>rapDH/KR4</i>	4,5-anhydro-10-dezmetrylo	
<i>rapAT2</i>	<i>rapDH/ER/KR1</i>	5-deoksy-5-oksy-10-dezmetrylo; 5-deoksy-10-dezmetrylo	
<i>rapDH/KR4</i>	<i>rapAT2</i>	4-dezmetrylo-10,11-anhydro	
<i>rapDH/KR4</i>	łącznik AT/ACP	5-deoksy-5-oksy-10,11-anhydro	
<i>rapDH/KR4</i>	<i>rapDH/ER/KR1</i>	brak produktu	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	<i>rapAT2</i>	4-dezmetrylo-11-deoksy	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	łącznik AT/ACP	5,11-dideoksy-5-oksy	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	<i>rapDH/KR4</i>	4,5-anhydro-11-deoksy	
modyfikacje w module 2 i w module 6			
moduł 2	moduł 6		
<i>rapAT2</i>	<i>rapAT2</i>	2,10-didezmetrylo	
<i>rapAT2</i>	łącznik AT/ACP	3-deoksy-3-oksy-10-dezmetrylo	
<i>rapAT2</i>	<i>rapDH/KR4</i>	2,3-anhydro-10-dezmetrylo	
<i>rapDH/KR4</i>	<i>rapAT2</i>	2-dezmetrylo-10,11-anhydro	
<i>rapDH/KR4</i>	łącznik AT/ACP	3-deoksy-3-oksy-10,11-anhydro	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	<i>rapAT2</i>	2-dezmetrylo-11-deoksy	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	łącznik AT/ACP	3-deoksy-3oksy-11-deoksy	
modyfikacje w module 2 i dwie modyfikacje w module 6			
moduł 2	moduł 6		
<i>rapAT14</i>	<i>rapAT2</i> + łącznik AT/ACP	2,10-didezmetrylo-3-deoksy-3-oksy	
<i>rapDH/KR4</i>	<i>rapAT2</i> + łącznik AT/ACP	2-dezmetrylo-3,11-dideoksy-3-oksy-10,11-anhydro	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	<i>rapAT2</i> + łącznik AT/ACP	2-dezmetrylo-3,11-dideoksy-3-oksy	
modyfikacja w module 2, module 5 i module 6			
moduł 2	moduł 5	moduł 6	
<i>rapDH/ER/KR1</i>	łącznik AT/ACP	<i>rapAT2</i>	2-dezmetrylo-5,11-dideoksy-5-oksy

5.3. Modyfikacje reakcji postpoliketydowych

Rozszerzeniem możliwości tworzenia nowych związków poliketydowych są modyfikacje reakcji postpoliketydowych.

Kontynuując opisany eksperyment tworzenia biblioteki kombinatorycznej pochodnych aglikonowej części erytromycyny A, badacze wprowadzili do szczepu *Streptomyces lividans* geny *desI-desVII* ze szczepu *Streptomyces venezuelae* warunkujące syntezę dezozaminy. Dezozamina jest składnikiem erytromycyny A, pikromycyny, oleandomycyny i narbomycyny. Uzyskany szczep przyłączał dezozaminę do agliko-

nowych części erytromycyny i narbomycyny podawanych w pożywce. W dalszym etapie w szczepie zawierającym geny *des* prowadzono ekspresję zmodyfikowanych białek syntazy DEBS. Otrzymano związki uzyskane wcześniej w bibliotece kombinatorycznej z przyłączoną dezozaminą. Otrzymane związki wykazywały właściwości antybiotyczne (41).

6. Poszukiwanie nowych genów syntaz poliketydowych

Większość związków poliketydowych, które znalazły zastosowanie praktyczne produkowanych jest przez głębowe bakterie z rodzaju *Streptomyces* należące do rzędu promieniowców (*Actinomycetales*). Zdolność wytwarzania różnorodnych metabolitów wtórnych, m. in. poliketydów mają także przedstawiciele innych rodzajów promieniowców.

Zakończone i prowadzone projekty sekwencjonowania genomów bakteryjnych dostarczają informacji o nowych genach syntaz poliketydowych, których produkty pozostają nieznane. Powstała baza danych obejmująca tylko geny syntaz poliketydowych (42) (<http://www.nii.res.in/searchall.html>). Na podstawie tej bazy specjalnie przygotowany program pozwala na szybką automatyczną analizę nowo uzyskanych sekwencji DNA (43). Projekt sekwencjonowania genomu *Streptomyces coelicolor* (44) (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/) ujawnił istnienie dwóch modułowych syntaz poliketydowych typu I, a zsekwencjonowanie genomu *Streptomyces avermitilis* dostarczyło informacji o genach dwunastu syntaz poliketydowych (45,46) (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>). Również chromosomy promieniowców chorobotwórczych takich jak *Mycobacterium tuberculosis*, (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/) *Corynebacterium diphtheriae* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_diphtheriae/) czy *Nocardia farcinia* (<http://nocardia.nih.go.jp/>) zawierają liczne geny syntaz poliketydowych (47-49).

Postęp w dziedzinie sekwencjonowania DNA przyniósł lawinowy wzrost ilości informacji zdeponowanych w komputerowych bazach DNA. Liczba znanych sekwencji DNA syntaz poliketydowych stale rośnie dzięki nowym strategiom poszukiwania genów, niezależnie od tego czy w danych warunkach geny te ulegają ekspresji. Stosuje się różnorodne techniki przeszukiwania genomów, których sekwencja nie została jeszcze poznana. Pierwszy etap stanowi najczęściej konstrukcja biblioteki genomowego DNA badanego organizmu. Klony zawierające geny syntaz poliketydowych można zidentyfikować przy użyciu reakcji PCR, hybrydyzacji Southerna lub częściowe sekwencjonowanie i porównanie ze znanymi sekwencjami genów syntaz (50,51). Geny biosyntezy antybiotyków występują w postaci zgrupowań obejmujących 20-200 kpz. W przypadku chromosomu *Streptomyces* o długości 8,5 Mpz można się spodziewać, przy założeniu równomiernego rozkładu, że spośród 1000 krótkich (500 pz) sekwencji co najmniej 2 będą reprezentować każdy zespół genów (51).

Możliwe jest także poszukiwanie genów nowych syntaz poliketydowych w DNA izolowanym bezpośrednio z gleby, wody, osadów dennych i innych próbek środowiskowych (tzw. eDNA, *environmental DNA*). Badania DNA z próbek środowiskowych prowadzone są najczęściej metodą PCR przy zastosowaniu odpowiednich starterów. Dają one dostęp do informacji genetycznej mikroorganizmów, których nie udało się wyhodować w warunkach laboratoryjnych. W bibliotece eDNA z gleby zidentyfikowano klony zawierające geny syntaz poliketydowych typu I (52), a w bibliotece DNA bakteryjnych symbiontów chrząszczy i gąbek wykryto klony zawierające geny nietypowych syntaz modułowych, w których domena acylotransferazy jest zastąpiona odrębnym białkiem działającym iteracyjnie (53).

Aktualnie prowadzone badania zmierzają w kierunku projektowania nowych syntaz na poziomie sekwencji DNA. W laboratoriach Kosan Biosciences przeprowadzono eksperyment syntezy *in vitro* DNA kodującego podjednostki syntazy DEBS. Zsyntetyzowano fragment długości 32 kbp (54). Jest to pierwszy krok na drodze całkowicie sztucznego tworzenia nowych związków poliketydowych. W opisywanym przypadku posłużono się znaną sekwencją istniejącej syntazy. Cała sekwencja została uzyskana przez łączenie 40-nukleotydowych syntetycznych oligonukleotydów metodą PCA (*polymerase cycling assembly*) i tradycyjne klonowanie. Większość procesów została zautomatyzowana co pozwoliło skrócić czas uzyskania całego fragmentu DNA. Taka strategia pozwala na wprowadzanie dowolnych zmian w sekwencji przez zmianę w programowaniu poszczególnych oligonukleotydów. W ten sposób niezwykle szybko można uzyskiwać nowe produkty poliketydowe, a ich tworzenie sprowadza się do projektowania nowej sekwencji DNA kodującej syntazę poliketydową.

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych, grant KBN 3P04B 004 25.

Literatura

1. Hopwood D. A., Sherman D. H., (1990), *Annu. Rev. Genet.*, 24, 37-66.
2. Kuczek K., Kotowska M., Mordarski M., (1996), *Postępy Biochemii*, 42, 276-283.
3. Hopwood D. A., Khosla C., (1992), *Ciba Found Symp.*, 171, 88-106.
4. Woloshuk C. P., Prieto R., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 160, 169-176.
5. Beck J., Ripka S., Siegner A., Schiltz E., Schweizer E., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 192, 487-498.
6. O'Hagan D., (1991), *The polyketide metabolites*, Chichester, Ellis Horwood Prod.
7. Staunton J., Weissman K. J., (2001), *Nat. Prod. Rep.*, 18, 380-416.
8. Shen B., (2003), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 285-295.
9. Aparicio J. F., Molnar I., Schwecke T., König A., Haydock S. F., Khaw L. E., Staunton J., Leadlay P. F., (1996), *Gene*, 169, 9-6.
10. McNeil D. J., Occi J. L., Gewain K. M., McNeil T., Gibbons P. H., Ruby C. L., Danis S. J., (1992), *Gene*, 115, 119-125.
11. Haydock S. F., Aparicio J. F., Molnar I., Schwecke T., Khaw L. E., König A., Marsden A. F., Galloway I. S., Staunton J., Leadlay P. F., (1995), *FEBS Lett.*, 347, 246-248.
12. Katz L., Donadio S., (1993), *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 875-912.

13. Hutchinson C. R., Fujii I., (1995), *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 201-238.
14. Ikeda H., Nonomiya T., Usami M., Ohta T., Omura S., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9509-9514.
15. Schwecke T., Aparicio J. F., Molnar I., Konig A., Khaw L. E., Haydock S. F., Olynyk M., Caffrey P., Cortes J., Lester J. B., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7839-7843.
16. Brautaset T., Sekurova O. N., Sletta H., Ellingsen T. E., StrLm A. R., Valla S., Zotchev S. B., (2000), *Chem. Biol.*, 7, 395-403.
17. Thompson M. W., Strohl W. R., Floss H. G., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 779-786.
18. Aparicio J. F., Caffrey P., Marsden A. F. A., Staunton J., Leadlay P. F., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 8524-8528.
19. Gokhale R. S., Tsuji S. Y., Cane D. E., Khosla C., (1996), *Science*, 284, 482-485.
20. Broadhurst R. W., Nietlispach D., Wheatcroft M. P., Leadlay P. F., Weissman K. J., (2003), *Chem. Biol.*, 10, 723-731.
21. Donadio S., Katz L., (1992), *Gene*, 111, 51-60.
22. Witkowski A., Rangan V. S., Randhawa Z. I., Amy C. M., Smith S., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 198, 571-579.
23. Crump M. P., Crosby J., Dempsey C. E., Parkinson J. A., Murray M., Hopwood D. A., Simpson T. J., (1997), *Biochemistry*, 36, 6000-6008.
24. Staunton J., Caffrey P., Aparicio J. F., Roberts G. A., Bethell S. S., Leadlay P. F., (1996), *Nat. Struct. Biol.*, 3, 188-192.
25. Kao C. M., Pieper R., Cane D. E., Khosla Ch., (1996), *Biochemistry*, 35, 12363-12368.
26. Cortes J., Haydock S. F., Roberts G. A., Bevtit D. J., Leadlay P. F., (1990), *Nature*, 348, 176-178.
27. Marsden A. F. A., Caffrey P., Aparicio J. F., Loughran M. S., Staunton J., Leadlay P. F., (1994), *Science*, 263, 378-380.
28. Hopwood D. A., (1993), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4, 531-537.
29. Reynolds K. A., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12744-12746.
30. Olynyk M., Brown M. J., Cortes J., Staunton J., Leadlay P. F., (1996), *Chem. Biol.*, 3, 833-839.
31. Kuhstoss S., Huber M., Turner J. R., Paschal J. W., Rao R. N., (1996), *Gene*, 183, 231-236.
32. McDaniel R., Kao C. M., Hwang S. J., Khosla C., (1997), *Chem. Biol.*, 4, 667-674.
33. Tang L., Fu H., McDaniel R., (2000), *Chem. Biol.*, 7, 77-84.
34. Donadio S., McAlpine J. B., Sheldon P. J., Jackson M., Katz L., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7119-7123.
35. Pieper R., Luo G., Cane D. E., Khosla C., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 11373-11374.
36. Weissman K. J., Bycroft M., Cutter A. L., Hanefeld U., Frost E. J., Timoney M. C., Harris R., Handa S., Roddis M., Staunton J., Leadlay P. F., (1998), *Chem. Biol.*, 5, 743-754.
37. Bedford D., Jacobsen J. R., Luo G., Cane D. E., Khosla C., (1996), *Chem. Biol.*, 3, 827-831.
38. Rodriguez E., McDaniel R., (2001), *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 526-534.
39. Ruan X., Pereda A., Stassi D. L., Zeidner D., Summers R. G., Jackson M., Shivakumar A., Kakavas S., Staver M. J., Donadio S., Katz L., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 6416-6425.
40. McDaniel R., Thamchaipenet A., Gustafsson C., Fu H., Betlach M., Ashley G., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1846-1851.
41. Tang L., McDaniel R., (2001), *Chem. Biol.*, 8, 547-555.
42. Ansari M. Z., Yadav G., Gokhale R. S., Mohanty D., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 1, 32.
43. Yadav G., Gokhale R. S., Mohanty D., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 3654-3658.
44. Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A., (2002), *Nature*, 417, 141-147.
45. Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12215-12220.

46. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 526-531.
47. Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. E. 3rd, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Barrell B.G., et al., (1998), *Nature*, 393, 537-544.
48. Cerdeno-Tarraga A. M., Efstratiou A., Dover L. G., Holden M. T., Pallen M., Bentley S. D., Besra G. S., Churcher C., James K. D., de Zoysa A., Chillingworth T., Cronin A., Dowd L., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Moule S., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rutherford K. M., Thomson N. R., Unwin L., Whitehead S., Barrell B. G., Parkhill J., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 6516-6523.
49. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14925-14930.
50. Weber T., Welzel K., Pelzer S., Vente A., Wohlleben W., (2003), *J. Biotechnol.*, 106, 221-232.
51. Zazopoulos E., Huang K., Staffa A., Liu W., Bachmann B. O., Nonaka K., Ahlert J., Thorson J. S., Shen B., Farnet C. M., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 187-190.
52. Ginolhac A., Jarrin C., Gillet B., Robe P., Pujic P., Tüphile K., Bertrand H., Vogel T. M., Perriere G., Simonet P., Nalin R., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5522-5527.
53. Piel J., Hui D., Fusetani N., Matsunaga S., (2004), *Environ. Microbiol.*, 6, 921-927.
54. Kodumal S. J., Patel K. G., Reid R., Menzella H. G., Welch M., Santi D. V., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15573-15578.