

Aufbau einer biosynthetischen Polyketid-Bibliothek durch minimal-invasive Mutagenese**

Susanna Kushnir, Uschi Sundermann, Samir Yahiaoui, Andreas Brockmeyer, Petra Janning und Frank Schulz*

Naturstoffe sind von großer Bedeutung für die moderne Medizin und dienen als wertvolle Substanzen für die Grundlagenforschung in der chemischen Biologie. Polyketide bilden eine große und vielfältige Naturstoffklasse mit interessanten Bioaktivitäten. Ihre strukturelle Komplexität stellt große Herausforderungen an die organische Synthese, und sowohl rein synthetische als auch biosynthetische Strategien werden zu ihrer Gewinnung und Derivatisierung eingesetzt.^[1]

Die Biosynthese von Polyketiden verläuft über eine Kaskade von decarboxylierenden Claisen-Kondensationen zwischen Carbonsäurethioestern und Malonsäuren als Verlängerungseinheiten. Im Falle der reduzierten Polyketide bakteriellen Ursprungs folgt die Biosynthese einer modularen Logik, gemäß der in optionalen Schritten nach jedem Verlängerungsschritt der intermediäre β -Ketothioester durch verschiedene enzymkatalysierte Reduktionen umgesetzt wird. Ein vielfältiges Redoxmuster wird durch die schrittweise Prozessierung des β -Ketothioester zu einem sekundären Alkohol, einem Olefin oder einem vollständig gesättigten Thioester erreicht. In dieser Kaskade wird die wachsende Polyketidkette – ähnlich wie auf einem Fließband – von einer katalytischen Enzymdomäne zur nächsten weitergereicht.^[2]

Die Biosyntheselogik spiegelt sich in der Architektur der maßgeblich beteiligten Enzyme, den Polyketid-Synthasen (PKS), wider. Die Mitglieder dieser Enzymfamilie sind typischerweise mehrere tausend Aminosäuren groß und strukturell nur fragmentarisch charakterisiert.^[3,4] Ein repräsentatives Beispiel von Polyketid-Synthasen findet sich im Biosyntheseweg des Polyethers Monensin.^[5,6] Die Monensin-

PKS wird durch einen Gencluster von ca. 80 000 Basenpaaren Größe mit teilweise sehr langen offenen Leserastern (ORF) kodiert.^[7–9] Diese Bedingungen bringen die Techniken des modernen Enzym-Engineerings an ihre Grenzen, insbesondere, wenn eine größere Anzahl an Enzymvarianten erzeugt werden soll.^[3] Der modulare Aufbau der Biosyntheselogik hat das Interesse an der Manipulation von PKS zur Erzeugung neuer Naturstoffanaloga angeregt, woraus das Forschungsfeld der kombinatorischen Biosynthese entstanden ist. In vielen Fällen werden neue Polyketide durch den Austausch von PKS-Fragmenten erzeugt, bei denen katalytische Domänen oder ganze Module zwischen unterschiedlichen PKS verpflanzt werden.^[3,10,11]

Die Erfolgsrate in diesen Swapping-Experimenten ist jedoch nicht selten unzufriedenstellend, und die entstehenden Hybrid-PKS sind in vielen Fällen unproduktiv.^[11–13] Eine wesentliche Hürde in der Planung dieser Experimente ist das begrenzte Wissen über die Struktur und den Mechanismus der PKS-Hybride. So können diese z.B. durch eine hohe Substratspezifität stromabwärts positionierter Enzymdomänen oder aber durch negative Auswirkungen des Swapplings auf ihre strukturelle Integrität inaktiv werden. Gegenwärtige Experimente erlauben meist keine Rückschlüsse auf die Ursache von Fehlschlägen, wodurch PKS-Manipulationen häufig von „Versuch und Irrtum“ geprägt sind. Dementsprechend schwierig ist die rationale Planung modifizierter Polyketid-Biosynthesen.

Hier stellen wir einen neuen Ansatz in der kombinatorischen Biosynthese zur Erzeugung einer Bibliothek komplexer reduzierter Polyketide vor. Entgegen vorherigen Experimenten wird nur die ortsgerichtete Mutagenese zur Änderung der inhärenten katalytischen Aktivität der PKS genutzt, wodurch unerwünschte Nebeneffekte auf die Proteinfaltung minimiert werden. Die systematischen Experimente liefern Einblicke in die Substratpräferenz bakterieller Typ-1-PKS, der meistgenutzten PKS-Familie. Wir zeigen, dass durch diese Strategie die modifizierte Biosynthese von schwer zugänglichen Polyketiden in naher Zukunft synthetisch anwendbar werden kann.

Durch Proteinsequenzvergleiche wurden katalytisch relevante Positionen in den aktiven Zentren der reduktiven Domänen^[14–17] der Monensin-PKS identifiziert sowie ein Mutageneseplan entwickelt, der auf die Erzeugung von Nullmutanten der Ketoreduktasen, Dehydratasen und Enoylreduktasen zielte (zur Planung dieser Mutagenesen siehe Abbildung 1 und die Hintergrundinformationen). Die Experimente sollten zu oxidierten Derivaten des Monensin-Abbruchprodukts Prämonensin führen, das strukturell an den marinen Naturstoff Discodermolid erinnert (Abbildung 3).^[18]

[*] Dr. S. Kushnir, Dipl.-Ing. (FH) U. Sundermann, Dr. S. Yahiaoui, Prof. Dr. F. Schulz
Fakultät für Chemie, Chemische Biologie
Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: frank3.schulz@tu-dortmund.de
Dipl.-Ing. (FH) U. Sundermann, Dr. S. Yahiaoui,
Dipl.-Ing. (FH) A. Brockmeyer, Dr. P. Janning, Prof. Dr. F. Schulz
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung für Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Die Autoren danken dem Beilstein-Institut zur Förderung der chemischen Wissenschaften für die großzügige finanzielle Unterstützung, Peter F. Leadlay für die Spende von *S. cinnamomensis* A495 und Wolf Hiller für Hilfe bei den NMR-Messungen. F.S. und U.S. danken dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Liebig-Stipendium (F.S.) und ein Promotionsstipendium (U.S.). U.S. ist Mitglied der IMPRS für Chemische Biologie. F.S. dankt Herbert Waldmann für seine Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202438> zu finden.

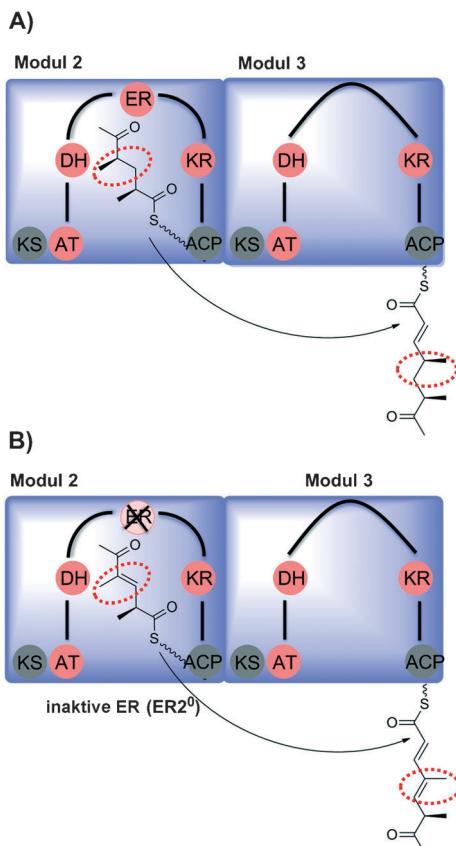


Abbildung 1. A) Organisation der Module 2 und 3 in der Monensin-PKS (die vollständige Monensin-PKS ist in den Hintergrundinformationen dargestellt). Die naszierende Kette ist an ein flexibles ACP gebunden, von dem sie in einer wahrscheinlich stochastischen Weise an die Domänen der reduktiven Schleife geleitet wird. Im Anschluss an die Reduktion erfolgt eine Thio-Umesterung, durch die die Polyketidkette auf das nächste Modul übertragen wird. Abkürzungen: KS: Ketosynthase; KR: Ketoreduktase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreduktase; ACP: Acyl-Carrier-Protein. B) Die Mutageneseplanung beruht auf der gezielten Verlangsamung eines reduktiven Schrittes. Dadurch soll dieser langsamer als die Thio-Umesterung zum folgenden Modul werden, sodass geringer reduzierte Zwischenprodukte zum Folgemodul weitergereicht werden. Effektiv handelt es sich dabei um eine Desaktivierung der mutierten reduktiven Domäne.

Das Prinzip hinter der Mutagenese ist es, den Transfer eines wachsenden Polyketids von einem Modul zum folgenden in einer höheren Oxidationsstufe als im Wildtyp zu ermöglichen. Dazu müssen individuelle reduktive Domänen durch die Mutagenese blockiert werden. Die Mutagenese soll mit minimaler struktureller Veränderung der Proteinstruktur einhergehen, wodurch eine klare Analyse der Substratspezifität stromabwärts gelegener Module ermöglicht wird.

Die Verlängerungsmodule 2 bis 8 der Monensin-PKS wurden als Ziel der Experimente gewählt. Sie umfassen insgesamt 18 reduktive Domänen. Die Mutagenese kann entsprechend in maximal 36 verschiedenen Polyketiden resultieren, jeweils als Gemisch aus den Redoxderivaten von Prämonensin A und B. Die gewählten Module umfassen die Mehrheit der reduktiven Domänen der Monensin-PKS, und die Mutagenese war so geplant, dass das charakteristische polare Fragment des Prämonensis unangetastet bleibt.

Die zentralen experimentellen Techniken wurden im Laufe dieses Projektes entwickelt (siehe Abbildung 2 und die Hintergrundinformationen). Sie umfassen die sehr zuverlässige PCR-basierte (PCR = Polymerasenkettenreaktion) Mutagenese GC-reicher Sequenzen und eine sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungstechnik (SLIC-MIX), die kürzlich von unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde.^[19] Um unerwünschte Nebeneffekte der Mutagenese von *S. cinnamomensis* auf die Polyketidproduktion zu minimieren, wurden die mutierten PKS-Gene durch homologe Rekombination im direkten Austausch gegen die Wildtyp-Gene in das Chromosom des Prämonensin-Produzenten *S. cinnamomensis* A495 eingeführt.^[20] Mit Ausnahme der Mutationen in Modul 3 wurden alle Mutationen durch DNA-Sequenzierung der resultierenden *Streptomyces*-Varianten bestätigt. In Modul 3 gelang es in mehrfachen Versuchen unter verschiedenen Bedingungen nicht, Mutationen einzuführen.

Die resultierenden 16 Bakterienvarianten, entsprechend einer theoretischen Bibliotheksgröße von 32 Polyketiden, wurden anschließend in Flüssigmedium kultiviert und die Kulturextrakte durch LC/ESI-MS untersucht (Abbildung 3B). Diese erste Analyse wurde durch HRMS bestätigt und die Bildung von 22 der vorhergesagten Prämonensin-Redoxderivate nachgewiesen (Abbildung 3A,C).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Erfolgsquote der Mutagenese im Sinne neu gebildeter Produkte vom gewählten Domäntyp abhängt. Die Weiterreichung des naszierenden Polyketids an stromabwärts gelegene Module scheint von der neu gebildeten funktionellen Gruppe abzuhängen. Diese Beobachtung wurde auch für die kürzlich beschriebenen trans-AT-PKS-Enzyme beschrieben,^[22,23] bei denen In-silico-Analysen nahelegen, dass KS-Domänen zwischen unterschiedlichen Redoxmustern des Substrats unterscheiden können. Allerdings zeigt sich, dass die hier untersuchten cis-AT-PKS eine deutlich höhere Substratpromiskuität aufweisen.

Die Mutagenese hatte bei allen Enoylreduktasedomänen der Monensin-PKS den erwarteten Effekt, woraus vier verschiedene Polyketidprodukte mit neuen C-C-Doppelbindungen entstanden (Abbildung 3A; ER2⁰, ER4⁰, ER6⁰ und ER8⁰). Die analoge Mutagenese der Dehydratasedomänen führte in vier von sechs Fällen zu den vorhergesagten sekundären Alkoholen (DH2⁰, DH4⁰, DH5⁰ und DH8⁰). Die Mutagenese der Ketoreduktasedomänen führte jedoch nur in drei von sechs Fällen zu Produkten (KR2⁰, KR4⁰ und KR6⁰). Außerdem führte, im Unterschied zu allen anderen Modulen, keine der in Modul 7 eingeführten Mutationen zur Bildung eines detektierbaren Prämonensinderivats.

Um die Strukturen der vorhergesagten Derivate mit anderen Methoden als ESI-MS zu validieren, untersuchten wir exemplarisch die Strukturen der vom Wildtyp und der inaktivierten ER2-Variante produzierten Verbindungen. Nach Reinigung der entsprechenden Fermentationsprodukte wurden die Strukturen durch 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie sowie durch HRMS aufgeklärt. Die Analysen bestätigten die Strukturen von Prämonensin A und B für den Wildtyp^[18] sowie der entsprechenden oxidierten Derivate ER2⁰-A und ER2⁰-B (Abbildung 3B und Hintergrundinformationen) für die ER2⁰-Variante. Der strukturelle Unter-

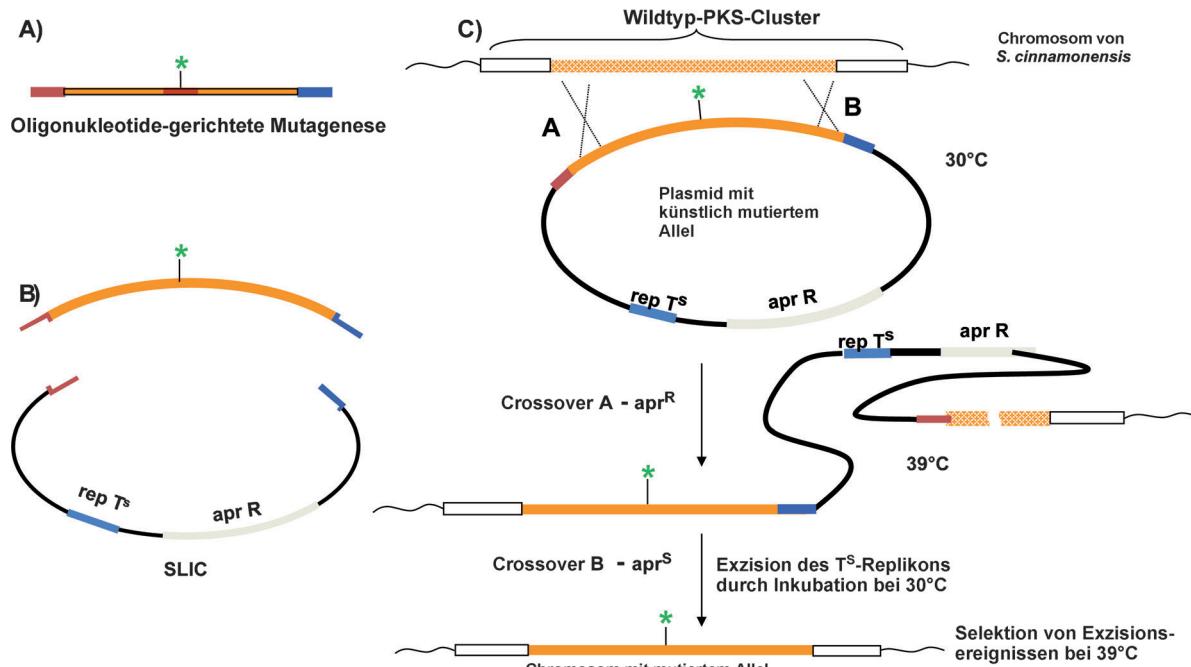


Abbildung 2. A) Oligonukleotide-gerichtete Mutagenese durch Overlap-Extension-PCR. B) Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (SLIC-MIX) unter Zugabe von Einzelstrang-DNA-bindendem Protein (SSB) wird zur schnellen Klonierung der mutierten PKS-Fragmente eingesetzt. Abkürzungen: rep^{T^s}: temperatursensitiver Replikationsursprung; apr^R: Apramycin-Resistenzkassette; apr^S: Apramycin-sensitives Allel. C) Mutierte Gene werden durch Konjugation unter Einsatz des Vektors pKC1139 mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung (basierend auf pSG5 von Muth et al.)^[21] in *S. cinnamonensis* eingeführt. Der Einsatz dieses Replikationsursprungs erwies sich als entscheidend, um eine spurlose Einführung der Mutationen durch einen doppelten Crossover zu ermöglichen. Andere Systeme erwiesen sich als zu ineffizient für die Herstellung einer größeren Zahl von Varianten.

schied zwischen Prämonensin und dem oxidierten ER2⁰-Produkt kann anhand der vinylischen Protonen im NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Die ER2⁰-Derivate zeigen ein neues vinylisches Proton (H-5); außerdem waren sowohl die chemische Verschiebung als auch die Multiplizität des Protons H-4 verändert. Nach präparativer HPLC konnte ER2⁰-A in Mengen von 0.7 mg L⁻¹ und ER2⁰-B in 2.2 mg L⁻¹ isoliert werden, eine Verringerung um eine Größenordnung im Vergleich zu Prämonensin A und B (8.2 mg L⁻¹ und 15.2 mg L⁻¹).

Eine detailliertere Betrachtung der präparativen Fermentation der ER2⁰-Variante führte zu überraschenden Ergebnissen, die eine bislang unbekannte Interaktion zwischen verschiedenen Segmenten der PKS nahelegen. Neben den vorhergesagten Produkten wurden zwei unerwartete Prämonensin-Derivate identifiziert – ER2⁰-C und ER2⁰-B* – die isoliert und durch NMR-Spektroskopie und HRMS charakterisiert wurden (siehe Hintergrundinformationen). Die Bildung von ER2⁰-B* ist wahrscheinlich das Ergebnis einer erhöhten Tautomerisierungsneigung des Methylketons in ER2⁰-B mit einhergehender Epimerisierung zum entsprechenden Enol, die durch die Konjugation mit der benachbarten C-C-Doppelbindung getrieben wird.

ER2⁰-C ist jedoch ein überraschend auftretendes Desmethyl-Derivat, das in mg-Mengen aus der *S. cinnamonensis*-Variante isoliert werden kann, dessen Prämonensin-Analogon jedoch im Wildtyp nicht auffindbar ist. Dieses neue Produkt entspricht dem Einbau von Malonyl-CoA anstelle von Methylmalonyl- oder Ethylmalonyl-CoA-Verlänge-

rungseinheiten in Modul 5 (Abbildung 4). Die Bildung von ER2⁰-C könnte das Ergebnis einer erhöhten Substratproteinkinaseaktivität von Modul 5 durch Interaktion mit dem nicht-nativen Substrat sein. Entsprechendes Verhalten ist für einstufige biokatalytische Reaktionen beschrieben, war aber für kanonische Typ-1-PKS unerwartet und ist nicht in Übereinstimmung mit ihrer typischerweise modularen Syntheselogik.^[10,24] Alternativ kann dies ein Effekt eines noch zu identifizierenden Korrekturmechanismus innerhalb der Monensin-PKS sein, der manche nicht-nativen Produkte vorzeitig von der PKS abspaltet.^[25–28] Unabhängig vom exakten Mechanismus belegt diese Beobachtung einen ungewöhnlichen Kontakt zwischen den Modulen 2 und 5 der Monensin-PKS – ob durch Protein-Protein- oder Substratinteraktionen bedarf weiterer Untersuchungen (Abbildung 4).

Ein weiterer unvorhergesehener Effekt konnte in Modul 5 nach Einführung der DH5⁰-Mutation beobachtet werden. Diese Variante lieferte fast ausschließlich das Methyl-verzweigte Prämonensin-B-Redoxderivat mit vernachlässigbarer Bildung des Ethyl-verzweigten Analogons (Abbildung 4). Die Mutagenese der benachbarten KR5-Domäne lieferte eine vollständig unproduktive Variante.

Das gegenwärtige Verständnis der PKS-Enzymologie besagt, dass die Acyltransferasedomänen innerhalb der PKS-Architektur zwischen verschiedenen Malonyl-Verlängerungseinheiten unterscheiden. Unsere Beobachtung legt nun nahe, dass durch einen noch aufzuklärenden und wahrscheinlich subtilen Mechanismus die reduktive Schleife nicht

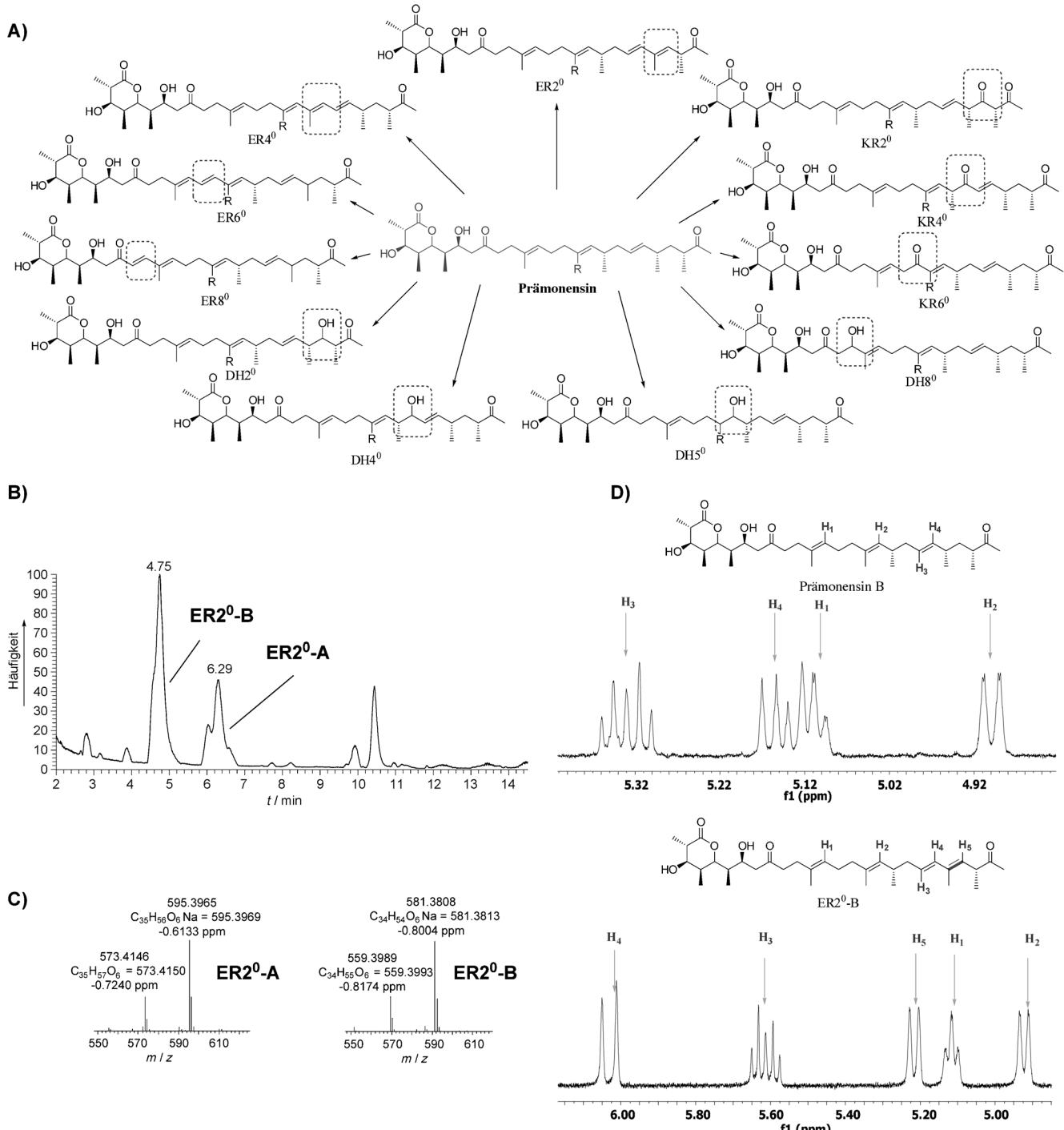


Abbildung 3. A) Vorhergesagte Strukturen der in dieser Studie nachgewiesenen Prämonensin-Redoxderivate. $R = \text{CH}_3$: Prämonensin B; $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$: Prämonensin A. Die mutageneseinduzierten Strukturänderungen sind eingehaumt. Die Verbindungen sind nach dem Domäentyp und der Modulnummer der jeweils manipulierten Domäne benannt. Die Summenformeln aller Verbindungen wurden durch HRMS bestätigt. B) LC/MS-Spur (Base-Peak) des Screenings der Monensin-PKS-Varianten. Dieses Beispiel stammt von der $\text{ER}2^0$ -Variante. C) HRMS zur Bestätigung der Produktmassen genutzt. D) Die $\text{ER}2^0$ -Variante wurde exemplarisch in präparativen Mengen kultiviert, und die Fermentationsprodukte wurden durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Signale der vinylischen Protonen von Prämonensin B und dem Redoxderivat $\text{ER}2^0$ -B sind gezeigt. Neben dem Auftauchen eines neuen vinylischen Protons ($H-5$) ändern sich die chemische Verschiebung und die Multiplizität des benachbarten $H-4$ von dd zu d.

vollständig von der KS/AT-Kernstruktur getrennt agiert, sondern die Wahl der Verlängerungseinheiten beeinflusst.

Im Zuge unserer Experimente wurde die Substratspezifität von auf eine Mutagenesestelle folgenden Modulen in

einer PKS mit 12 Verlängerungsmodulen untersucht; alle Polyketide wurden dabei über 10 bis 33 aufeinanderfolgende Reaktionsschritte prozessiert. Dabei wurden 22 von 32 vorhergesagten Derivaten nachgewiesen, entsprechend einer

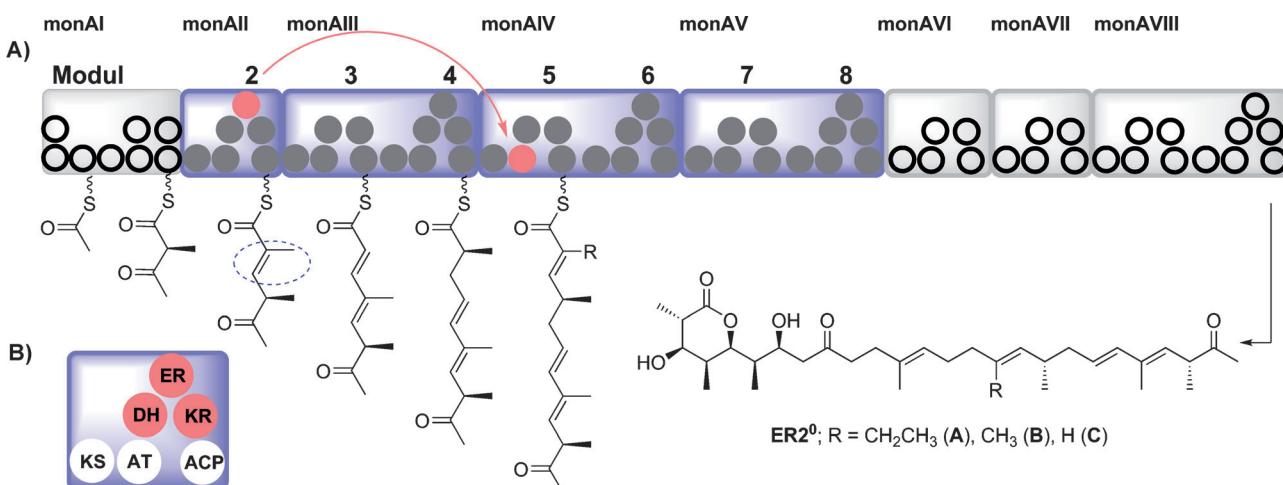


Abbildung 4. A) Schematische Darstellung des unerwarteten Crosstalks zwischen den Modulen 2 und 5 nach der Mutagenese der ER2-Domäne. Die in dieser Studie betrachteten Monensin-PKS-Module sind blau hervorgehoben; ER2 und AT5 sind rot markiert, die Redoxderivatisierung ist blau eingekreist. Zur besseren Lesbarkeit sind die katalytischen Schritte nach Modul 5 nicht explizit dargestellt. Eine vollständige Darstellung der Monensin-PKS ist in den Hintergrundinformationen zu finden. Im Fall der DH5⁰-Variante wurde ein weiterer Crosstalk identifiziert. Das Verhältnis von A zu B änderte sich von ca. 2:3 in Prämonensin-Fermentationen zu <1:100 in dieser Variante. Für die anderen Monensin-PKS-Varianten war das Verhältnis zwischen A und B unverändert vom Wildtyp. monAI bis monAIII kennzeichnen die individuellen Enzyme in der Monensin-PKS, während arabische Ziffern die einzelnen Module bezeichnen. Die Kennzeichnung einzelner katalytischer Domänen ist zur besseren Lesbarkeit nicht aufgeführt. B) Blick in ein einzelnes Modul mit einem kompletten Satz reduktiver Domänen (wie in den Modulen 2, 4, 6 und 8). Alle Module sind in der gleichen Art organisiert, allerdings in mehreren Fällen mit einer unvollständigen reduktiven Schleife (KR, DH, ER). Alle Module enthalten den zur Kettenverlängerung essentiellen Satz an Domänen (KS, AT, ACP).

Erfolgsquote von 69 %. Dies ist insbesondere relevant, da die Experimente nicht mit einem vereinfachten Modellsystem, sondern anhand einer repräsentativen PKS in ihrer vollen Größe durchgeführt wurden.

Hier ist zu beachten, dass der Einsatz der ortsgerichteten Mutagenese eine mechanismusbasierte Planung voraussetzt und sich nicht nur auf homologe Abschnitte in der Proteinsequenz verlässt. Dies macht die hier angewendete Vorgehensweise intrinsisch auf alle verwandten PKS und sogar Fettsäuresynthetasen übertragbar und erlaubt die Vermeidung der aufwändigen Experimente zur Identifikation und Optimierung von Mutagenesestellen, wie sie in den derzeit besten Experimenten zur Transplantation von Domänen zur Substanzbibliotekerzeugung benötigt werden.^[29–31] Allerdings wird klar, dass der Ausschluss nicht-nativer naszierender Polyketidsubstrate durch stromabwärts gelegene Module nicht auf trans-AT-PKS begrenzt ist, sondern in einem geringeren Ausmaß ebenfalls in den häufiger untersuchten cis-AT-PKS beobachtet werden kann. Zukünftige Experimente müssen in Betracht ziehen, dass hierdurch die Fermentationsausbeuten signifikant und bislang unvorhersehbar gesenkt werden können. Gegenwärtig kann die Substratspezifität von PKS nicht ausschließlich durch den Austausch einzelner Aminosäuren beeinflusst werden.

Basierend auf ihrer Ähnlichkeit zu bekannten Polyketiden ist anzunehmen, dass das nicht-natürliche Prämonensin und seine Redoxderivate privilegierte Strukturen haben und biologische Wirkungen aufweisen.^[32] Entsprechend wurden sie auf antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene bakterielle Indikatorstämmen getestet. Prämonensin A und B zeigten schwache bakteriostatische Wirkung gegen das Gram-

negative Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* DSM1117 (MIC 228 µg mL⁻¹). Interessanterweise zeigten die gereinigten Derivate ER2⁰-A, -B und -C eine um zwei Größenordnungen erhöhte antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* (MIC 1.8 µg mL⁻¹ für ER2⁰-A) sowie auch Aktivität gegen das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* DSM10 (MIC 7.2 µg mL⁻¹ für ER2⁰-A), gegen das Prämonensin A und B vernachlässigbare Wirksamkeiten aufweisen (Details siehe Hintergrundinformationen).

Zusammengefasst stellen wir hier eine neue Strategie zur Erzeugung von Polyketid-Substanzbibliotheken vor. Unseres Wissens wurden erstmals ausschließlich Punktmutationen zur systematischen Erzeugung von Polyketidstrukturen eingesetzt. Entgegen vorheriger Studien vermeidet diese minimal invasive Strategie das Swapping von Domänen oder Modulen von PKS, wodurch negative Auswirkungen auf die Multienzymkomplexe reduziert werden. Durch ein einfacher übertragbares experimentelles Design lässt sich die hinreichend breite Substratflexibilität bakterieller cis-AT-PKS für die gesteuerte Biosynthese komplexer Verbindungen nutzbar machen. Dies kann zur Veränderung der Bioaktivität der Verbindungen genutzt werden.

Eingegangen am 28. März 2012,
veränderte Fassung am 29. Juni 2012
Online veröffentlicht am 20. September 2012

Stichwörter: Biosynthese · Enzyme · Mutagenese · Naturstoffe · Polyketide

-
- [1] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012.
- [2] C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688.
- [3] F. T. Wong, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 117.
- [4] D. H. Kwan, F. Schulz, *Molecules* **2011**, *16*, 6092.
- [5] A. Agtarap, J. W. Chamberlin, M. Pinkerton, L. K. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5737.
- [6] A. A. Ajaz, J. A. Robinson, *Chem. Commun.* **1983**, 679.
- [7] M. Oliynyk, C. B. W. Stark, A. Bhatt, M. A. Jones, Z. A. Hughes-Thomas, C. Wilkinson, Z. Oliynyk, Y. Demydchuk, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 1179.
- [8] P. F. Leadlay, J. Staunton, M. Oliynyk, C. Bisang, J. Cortes, E. Frost, Z. A. Hughes-Thomas, M. A. Jones, S. G. Kendrew, J. B. Lester, P. F. Long, H. A. I. McArthur, E. L. McCormick, Z. Oliynyk, C. B. W. Stark, C. J. Wilkinson, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 360.
- [9] Z. A. Hughes-Thomas, C. B. W. Stark, I. U. Bohm, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4613; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4475.
- [10] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925.
- [11] U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachr. Chem.* **2011**, *59*, 29.
- [12] C. P. Ridley, H. Y. Lee, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4595.
- [13] L. B. Pickens, Y. Tang, Y.-H. Chooi, *Ann. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 211.
- [14] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72.
- [15] S. Donadio, L. Katz, *Gene* **1992**, *111*, 51.
- [16] J. Q. Wu, T. J. Zaleski, C. Valenzano, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17393.
- [17] S. E. F. Borgos, H. Sletta, E. Fjaervik, T. Brautaset, T. E. Ellingsen, O. M. Gulliksen, S. B. Zotchev, *Arch. Microbiol.* **2006**, *185*, 165.
- [18] A. Bhatt, C. B. W. Stark, B. M. Harvey, A. R. Gallimore, Y. A. Demydchuk, J. B. Spencer, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7075.
- [19] S. Kushnir, U. Sundermann, F. Schulz, *Asian J. Biotechnol.* **2012**, in Revision.
- [20] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, **2000**.
- [21] G. Muth, B. Nussbaumer, W. Wohlleben, A. Puhler, *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *219*, 341.
- [22] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996.
- [23] K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. A. van der Sar, S. A. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, P. Crews, J. Piel, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 494.
- [24] M. Avi, R. M. Wiedner, H. Griengl, H. Schwab, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11415.
- [25] K. Jensen, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P. Pöplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, M. Oldiges, C. Hertweck, J. Piel, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 329.
- [26] J. C. Kwan, E. W. Schmidt, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 309.
- [27] B. S. Kim, T. A. Cropp, B. J. Beck, D. H. Sherman, K. A. Reynolds, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48028.
- [28] T.-W. Yu, Y. Shen, Y. Doi-Katayama, L. Tang, C. Park, B. S. Moore, C. R. Hutchinson, H. G. Floss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9051.
- [29] H. G. Menzella, R. Reid, J. R. Carney, S. S. Chandran, S. J. Reisinger, K. G. Patel, D. A. Hopwood, D. V. Santi, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1171.
- [30] H. G. Menzella, J. R. Carney, D. V. Santi, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 143.
- [31] R. McDaniel, A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, M. Betlach, G. Ashley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1846.
- [32] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878.