

- 10) A. Nakabachi, A. Yamashita, H. Toh, H. Ishikawa, H. E. Dunbar, N. A. Moran, M. Hattori, *Science* 2006, 314, 267.
- 11) J. P. McCutcheon, B. R. McDonald, N. A. Moran, *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000565.
- 12) D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Badentillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas, M. A. Algire, C. Merryman, L. Young, V. N. Noskov, J. I. Glass, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Science* 2008, 319, 1215.
- 13) D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* 2010, 329, 52.
- 14) G. A. Benders, V. N. Noskov, E. A. Denisova, C. Lartigue, D. G. Gibson, N. Assad-Garcia, R. Y. Chuang, W. Carrera, M. Moodie, M. A. Algire, Q. Phan, N. Alperovich, S. Vashee, C. Merryman, J. C. Venter, H. O. Smith, J. I. Glass, C. A. Hutchison, *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 2558.
- 15) C. Lartigue, S. Vashee, M. A. Algire, R.-Y. Chuang, G. A. Benders, L. Ma, V. N. Noskov, E. A. Denisova, D. G. Gibson, N. Assad-Garcia, N. Alperovich, D. W. Thomas, C. Merryman, C. A. Hutchison, H. O. Smith, J. C. Venter, J. I. Glass, *Science* 2009, 325, 1693.
- 16) A. T. Krueger, E. T. Kool, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11, 588.
- 17) M. Schmidt, *BioEssays* 2010, 32, 322.
- 18) P. Marliere, *Syst. Synth. Biol.* 2009, 3, 77.
- 19) W.-K. Mat, H. Xue, J. T.-F. Wong, *PLoS One*, 2010, 5, e12206.
- 20) F. Wolfe-Simon, J. S. Blum, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoefft, J. Pett-Ridge, J. F. Stolz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. W. Davies, A. D. Anbar, R. S. Oremland, *Science* 2010, doi: 10.1126/science.1197258.
- 21) S. R. Adams, M. J. Sparkes, H. B. F. Dixon, *Biochem. J.* 1984, 221, 829.
- 22) A. Danchin, *J. Cosmol.* 2010, 13, 3617.
- 23) N. Budisa, *Angew. Chem.* 2004, 116, 6586.
- 24) S. Lepthien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* 2010, 122, 5576.
- 25) L. Merkel, M. Schauer, G. Antranikian, N. Budisa, *ChemBioChem* 2010, 11, 1505.
- 26) W. Wan, Y. Huang, Z. Wang, W. K. Russell, P.-J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Angew. Chem.* 2010, 122, 3279.
- 27) H. Neumann, K. H. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* 2010, 464, 441.
- 28) M. G. Hoesl, N. Budisa, *ChemBioChem*, 2011, doi: 10.1002/cbic.201000586.
- 29) S. M. Kuhn, M. Rubini, M. Fuhrmann, I. Theobald, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* 2010, 404, 70.

Kombinatorische Biosynthese

Die zentrale Strategie für die kombinatorische Biosynthese ist die Rekombination oder sonstige Mutation von Enzymen, die an den Biosynthesen beteiligt sind (Abbildung 1). Hierüber werden einzelne Reaktionen in den Biosynthesekaskaden abgewandelt, weggelassen oder ersetzt, so dass ein alternatives Produkt am Ende der Biosynthese steht.

Das Konzept wurde aufgrund seines Potenzials viel beachtet, und eine Reihe von Arbeitskreisen beschäftigt sich damit. Dabei zeigten sich allerdings gravierende Schwierigkeiten, so dass dieses Forschungsgebiet noch am Anfang seiner Entwicklung ist.

Die größte konzeptionelle Herausforderung für die kombinatorische Biosynthese ist die Identifikation grundlegender Regeln, um Biosynthesewege umzuprogrammieren. Eine wesentliche Hürde ist, die Interaktionen zwischen den verschiedenen Enzymen untereinander und mit ihren jeweiligen Substraten zu verstehen. Außerdem ist die kombinatorische Biosynthese gegenwärtig oft durch fehlende organisch-chemische und biochemische Methoden begrenzt. In den vergangenen Jahren erschien jedoch eine Reihe von Arbeiten, die das große Potenzial und die Vielseitigkeit dieser Strategie zeigen.

Allen Anstrengungen zur kombinatorischen Biosynthese jedweder Substanzklasse gemeinsam sind die Voraussetzungen, die vor jedem Experiment erfüllt sein müssen: Die be-

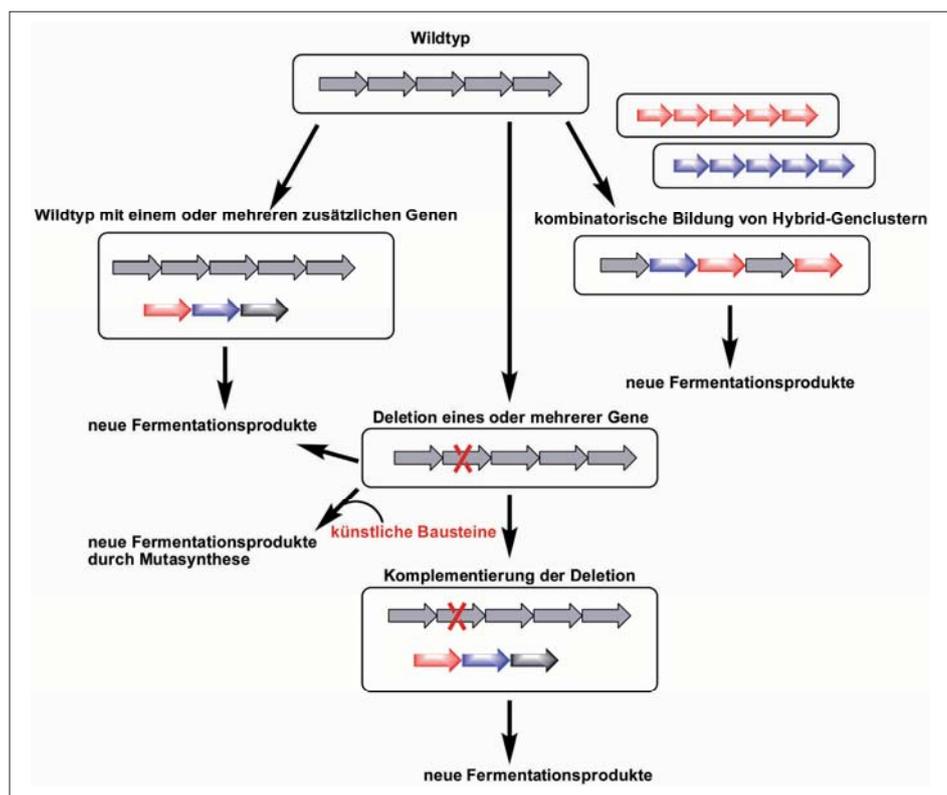


Abb. 1. Strategien in der kombinatorischen Biosynthese: Ein natürlich vorkommender biosynthetischer Gencluster kann mit zusätzlichen Genen versehen werden, die der Biosynthese einzelne Syntheseschritte hinzufügen. Daraus resultieren neue Fermentationsprodukte. Aus einem Gencluster können jedoch auch Fragmente entfernt oder inaktiviert werden. Diese Lücke in der Biosynthese kann anschließend mit alternativen Genen komplementiert werden. Ein Spezialfall dieser Variante ist die Mutasythese, bei der gezielt Gene ausgeschaltet werden, welche die Herstellung eines definierten Biosynthesebausteins dirigieren. Der dadurch entstehende Mangel lässt sich dann durch Zugabe synthetischer Bausteine komplementieren, auch der Einbau nichtnatürlicher funktioneller Gruppen ist möglich. Mit oder ohne Komplementierung kann auch diese Strategie Naturstoffderivate liefern. Experimentell außerordentlich anspruchsvoll ist die dritte Variante der kombinatorischen Biosynthese, in der gleich mehrere Gencluster durch molekularbiologische Methoden rekombiniert werden. Dadurch entstehen stark vom Ausgangszustand verschiedene Gencluster.

teiligten Gene, die häufig als Cluster im Genom eines Produktionsorganismus vorliegen, müssen möglichst vollständig identifiziert und kloniert sein. Hier gab es in den vergangenen Jahren durch die schnelle Genomsequenzierung¹⁾ und neue Techniken zur Analyse von Metagenomen^{2,3)} große Fortschritte. Ein Verständnis der biosynthetischen Logik muss in allen Fällen an die genetische Information gekoppelt sein.

Kritisch ist häufig die Wahl der Enzyme als Ziel von Manipulation. Nicht selten sind die gewählten Enzyme intrinsisch nicht in der gewünschten Weise modifizierbar.

Neben Polyketiden [Nachr. Chem. 2011, 59, 29], die zuerst Gegenstand der Forschung waren, gelten Kohlenhydrate, Peptide sowie Alkaloide und Terpene als aussichtsreiche Substanzklassen für die kombinatorische Biosynthese. Sie standen in den letzten Jahren ebenfalls im Fokus der Untersuchungen zur kombinatorischen Biosynthese.

Kohlenhydrate und Glykokonjugate

◆ Die kombinatorische Biosynthese von Kohlenhydraten bedeutet in vielen Fällen die Biosynthese von Koh-

lenhydrat-Konjugaten. Glycosyltransferasen sind hier die Schlüsselenzyme. Sie übertragen einen nucleotidaktivierten Zuckerdonor auf ein passendes Aglycon (Abbildung 2). Ausführliche Übersichten finden sich in Lit.⁴⁻⁷⁾.

Die meisten Glykokonjugate von Naturstoffen enthalten Zucker aus der Familie der 6-Desoxyhexosen (6DOH), von der bislang über 70 Varianten in Pflanzen, Pilzen und Bakterien beschrieben wurden.⁸⁾ Die Anknüpfung an die Aglycone erfolgt häufig durch den Aufbau einer O-glycosidischen Bindung, aber auch durch C- oder N-glycosidische Verknüpfungen. Aglycone können an ein oder mehreren Positionen mit Mono- oder Oligosacchariden modifiziert sein. Die Oligosaccharid-Kette kann dabei aus bis zu 17 Einheiten bestehen (Saccharomicin A aus *Saccharotrix espanaensis*). Nach der Anknüpfung des Kohlenhydrats an das Aglycon lässt es sich weiter modifizieren, meist durch Methylierungen oder Acylierungen.

Die Biosynthese der meisten 6DOH-Derivate beginnt mit phosphataktivierten Hexosen (überwiegend Glucose). Trotz aller struktureller Diversität verläuft die Biosynthese

in den ersten zwei Schritten immer gleich. Im Fall der Glucose als Startpunkt ist das Produkt dieser Schritte die dNDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose; die daran beteiligten Enzyme sind eine dNTP-Zucker-1-Phosphat-Nucleotidyltransferase und eine dNDP-D-Hexose-4,6-dehydratase. Die anschließenden Schritte erzeugen die strukturelle Diversität. Das können Decarboxylierungen, Desoxygenierungen, Transaminierungen, Ketoreduktionen, C-, N- und O-Methylierungen sowie Epimerisierungen sein, durch die sich die D- und L-Isomere der verschiedenen 6DOH bilden (Abbildung 3).

Durch Fortschritte in der Genomsequenzierung und die Arbeit von Naturstoffchemikern wächst das Wissen über die Biosynthesewege dieser Zucker, so dass immer mehr Gencluster für Experimente verfügbar werden.

Hutchinson und Mitarbeiter beschrieben eine biosynthetische Glycodiversifizierung bereits im Jahr 1998. Durch genetische Manipulation des Doxorubicin-Produktionsorganismus bildete sich das Daunorubicin-Epimer Epirubicin.⁹⁾ Durch den gezielten Ersatz einer 4-Ketoreduktase durch analoge Enzyme mit entgegengesetzter Stereospezifität wurde selektiv ein Stereozentrum invertiert. Um aus solchen Experimenten zu einer tatsächlich kombinatorischen Biosynthese zu gelangen, bedarf es zusätzlicher Diversität entweder auf der Zuckernucleotid- oder auf der Aglycon-Seite.

Salas et al. beschrieben eine Familie an Expressionskonstrukten, die in einem eleganten Experiment in der Glycodiversifizierung des Kinase-Hemmers Staurosporin Einsatz fanden.^{10, 11)}

Eine effektive Glycorandomisierung gelang in einem chemoenzymatischen In-vitro-Experiment.^{12, 13)} Das Vancomycin-Aglycon wurde dazu mit 23 natürlichen sowie synthetischen nichtnatürlichen Zuckernucleotiden mit der nativen Glycosyltransferase GtfE umgesetzt. Von den 23 möglichen Produkten entstanden 21 mit einer Ausbeute von über 25%.

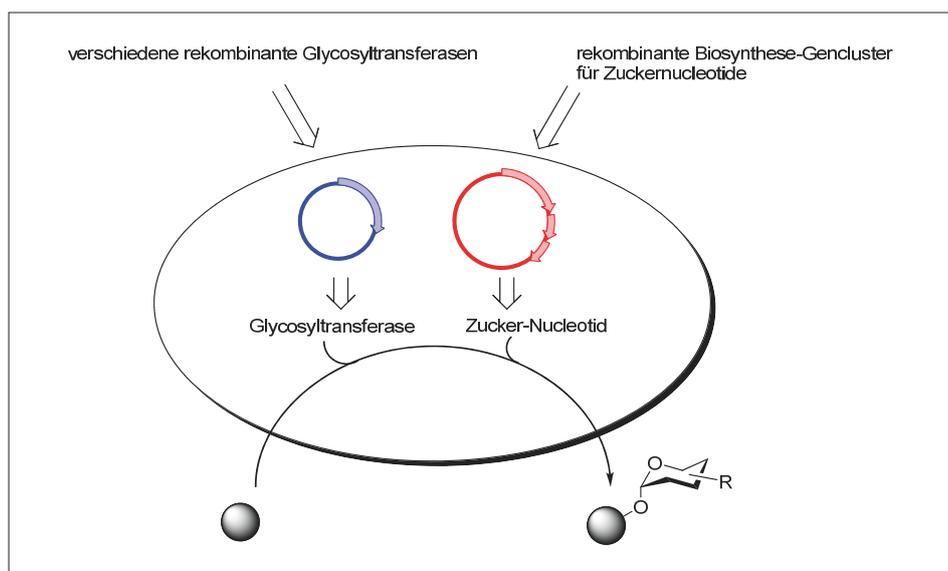


Abb. 2. Prinzip der kombinatorischen Biosynthese von Glykokonjugaten oder Oligosacchariden. Die Biosynthese läuft meist *in vivo* ab, kann aber auch mit isolierten Systemen durchgeführt werden. In jedem Fall muss ein nucleotidaktivierter Zucker bereitgestellt werden, *in vivo* geschieht dies durch spezialisierte Gencluster. Die einzusetzende Glycosyltransferase wird parallel zu dem Gencluster in einem anderen Stamm oder auch in der gleichen Zelle coexpressiert, so dass, unter Bereitstellung eines geeigneten Akzeptors, die Glykosylierung katalysiert werden kann. Glycosyltransferasen sind für gewöhnlich substratspezifisch gegenüber dem Donor und häufig auch gegenüber dem Akzeptor.

Diese Methode ist allerdings häufig durch die Substratflexibilität der Enzyme begrenzt. Bei einem analogen Experiment mit der Novobiocin-Glycosyltransferase NovM bildeten sich nur 3 von insgesamt 40 möglichen Glykokonjugaten.¹⁴⁾ Die Gruppe von Spencer versuchte dieses Problem durch gezielte Mutationen zu lösen, indem Hybride verschiedener Glycosyltransferasen hergestellt wurden. Auf diese Weise waren ausgewählte Donor- mit Akzeptorspezifitäten kombinierbar und es entstanden neue, anders nicht zugängliche Vancomycin-Derivate.¹⁵⁾

Die begrenzte Verfügbarkeit von nukleotidaktivierten Monosaccharid-Bausteinen lässt sich über die Reversibilität der von Glycosyltransferasen katalysierten Reaktionen umgehen. Durch den glycosyltransferasekatalysierten Austausch von Glycanen zwischen verschiedenen Naturstoffen ergab sich eine größere Bibliothek an Verbindungen.¹⁶⁾ Dieses Experiment nutzte neben der Reversibilität von Glycosylierungen besonders die Akzeptorflexibilität der Glycosyltransferasen. Allerdings schwankt diese stark von Enzym zu Enzym, eine Generalisierbarkeit solcher Experimente ist also unwahrscheinlich.

Dieser Schwierigkeit wurde durch Mutagenesestudien begegnet.¹⁷⁾ Gegenstand der Untersuchung war die Glycosyltransferase OleD, die Resistenz gegen das Anti-

biotikum Oleandomycin vermittelt. Durch gerichtete Evolution mit randomisierter Mutagenese wurde eine Enzymvariante entwickelt, mit dem nichtnatürlichen Substrat Methylumbelliferon als Akzeptor eine höhere Aktivität zeigte als das Wildtyp-Enzym.

Die eingefügten drei Mutationen steigerten die Promiskuität des Enzyms sowohl beim Zucker-Donor als auch beim Akzeptor. Aus einer Bibliothek von 22 Zucker-Nucleotiden setzte das Wildtyp-Enzym nur 3 um, die Variante aber 15. Die Variante zeigte auch eine erhöhte Aktivität gegenüber sechs nichtnatürlichen Akzeptoren. Demnach ist tatsächlich mit einer signifikanten Variations-

breite in der Glycodiversifizierung von Naturstoffen zu rechnen.

Neben komplexen Glykokonjugaten werden auch Aminoglycosid-Antibiotika aus dem Blickwinkel der kombinatorischen Biosynthese erforscht. Diese Oligosaccharide werden über komplexe und vielstufige Biosynthesewege erzeugt. Empfehlenswert sind die Übersichten in Lit.^{18,19)}

Biosynthetisch gewonnene Derivate der Aminoglycoside sind bislang selten, es gibt allerdings viel versprechende Beispiele für erste enzymatische oder chemoenzymatische Experimente.

Die Gruppe von Spencer erzeugte durch den Einsatz eines syntheti-

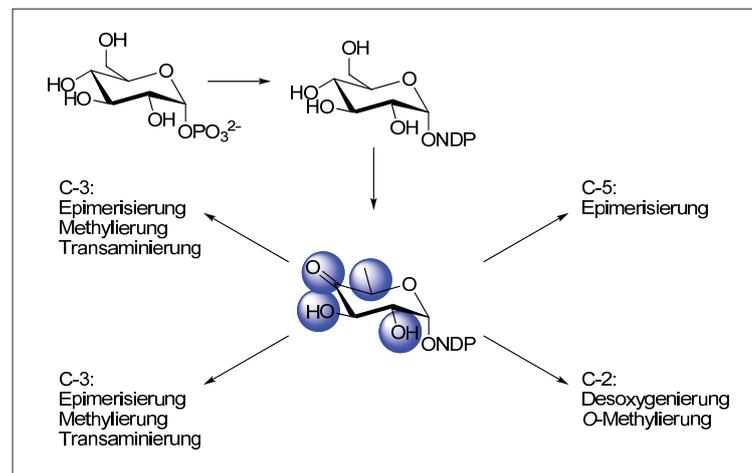


Abb. 3. Allgemeine Biosynthese der 6DOH-Familie. Die Biosynthese der Mehrheit dieser Verbindungen beginnt mit Glucose-1-Phosphat, aus welchem in zwei gemeinsamen Schritten die NDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose entsteht.

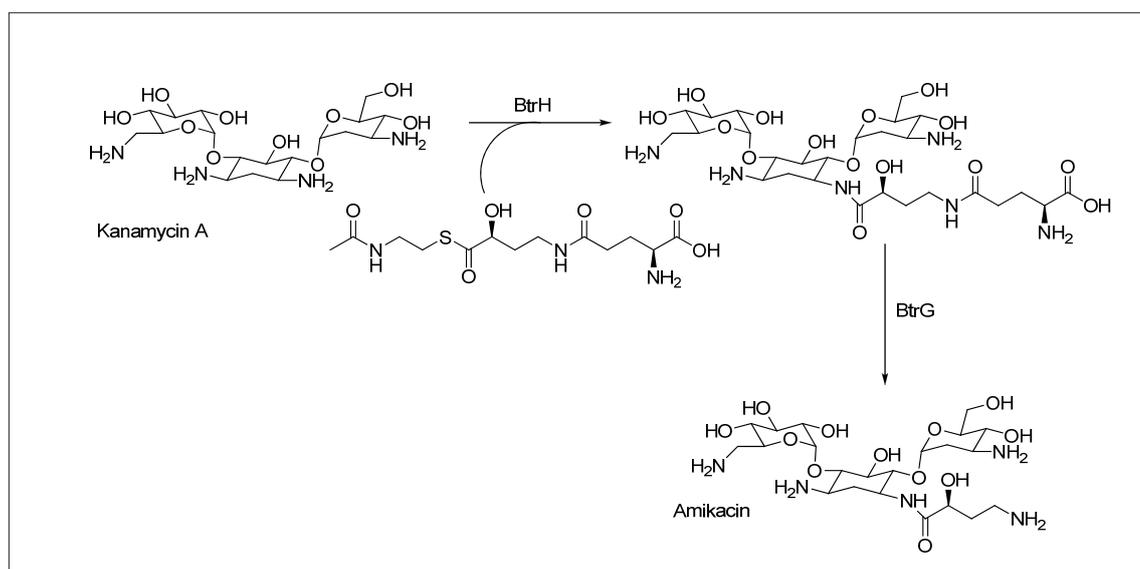


Abb. 4. Enzymatische Anknüpfung einer AHBA-Seitenkette an Kanamycin A zur Gewinnung des Notfall-Antibiotikums Amikacin.

schen Bausteins mit der AHBA-Seitenkette versehene Aminoglycosid-Derivate.²⁰⁾ AHBA ist ein wesentliches Strukturmerkmal, um Resistenzen gegen diese Antibiotika-Klasse zu überwinden. Es wird durch Partialsynthesen in einige klinisch genutzte Antibiotika eingeführt. Nun wurde entdeckt, dass durch natürliche Biosynthesewege unter Einbrin-

gung eines synthetisch erzeugten AHBA-Vorläufers dieselbe Modifikation effizient an verschiedene Aminoglycoside geknüpft werden kann (Abbildung 4, S. 315).

Kürzlich erschien eine erste Studie zur vollständig biosynthetischen Manipulation von Aminoglycosiden. Dabei wurden einzelne Enzyme heterolog in *E. coli* exprimiert. Bislang

ist dies allerdings nur der erste Schritt einer breiteren Erforschung dieser Biosynthesen für die kombinatorische Biosynthese.²¹⁾

Nicht-Ribosomale Peptide

◆ Peptide sind eine große Naturstoffklasse mit einer hohen strukturellen Diversität. Eine besondere Stellung innerhalb dieser Gruppe nehmen die nichtribosomalen Peptide (NRP) ein, zu denen zahlreiche medizinisch relevante Verbindungen gehören. Sie sind in vielen Bakterien und Pilzen enthalten. Umfangreiche Übersichtsartikel zu dieser Klasse finden sich in Lit.^{22–24)}.

Die zentrale Rolle in ihrer Biosynthese spielen die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS). NRPS sind modular aufgebaut, jedes Modul einer NRPS verlängert eine wachsende Peptidkette um eine Aminosäure und katalysiert deren Modifikationen. Ein Modul besteht dabei aus mehreren, meist kovalent verknüpften, Domänen (Abbildung 5). Innerhalb eines Moduls wird durch eine Adenylierungsdomäne (A-Domäne) eine spezifische Aminosäure mit ATP als Aminoacyl-AMP aktiviert, eine Kondensationsdomäne (C-Domäne) katalysiert anschließend die Bildung einer Peptidbindung. Die wachsende Peptidkette bleibt während ihres Aufbaus an PCP-Domänen gebunden (PCP = Peptidyl Carrier Protein).

Neben diesen essenziellen Domänen kann ein Modul noch weitere katalytische Funktionen enthalten. Dazu gehören zum Beispiel Epimerisierungsdomänen (E-Domänen), die die Konfiguration der eingesetzten L-Aminosäure invertieren. Von besonderem Interesse sind außerdem Reduktasen (Re-Domänen) und Cyclasedomänen (Cyc-Domänen). Letztere sind Varianten der C-Domänen, die Verknüpfungen mit Cysteine, Serin oder Threonin als Akzeptor katalysieren. Zusätzlich verknüpfen sie die Thiol- oder Hydroxylgruppe in der Seitenkette der Aminosäure mit der Kette, wodurch Thiazolin- oder Oxazolinringe entstehen (Abbildung 6). Diese Hetero-

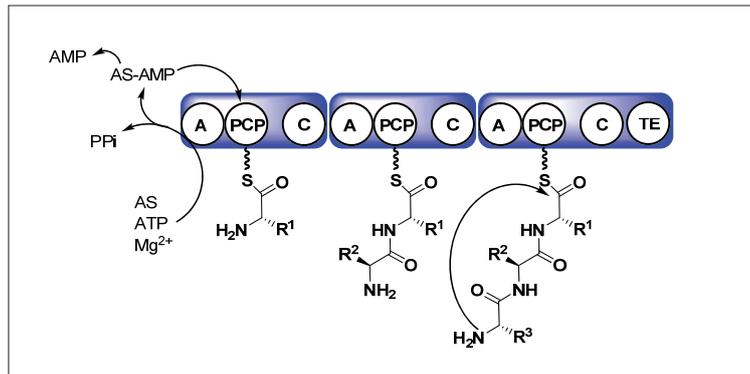


Abb. 5. Aufbau einer nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS). Im Lademodul wird die Starter-Aminosäure an einer Adenylierungs-Domäne (A) als Aminoacyl-AMP aktiviert. Unter Freisetzung von AMP wird die Aminosäure an das Peptidyl Carrier Protein (PCP) gebunden, einem zu den ACP in Typ-I-PKS analogen Protein. Die Kondensationsdomänen (C) katalysieren die Verknüpfung zweier Aminosäuren. Im Endmodul befindet sich eine Terminale Esterase-Domäne (TE), welche die fertige Peptidkette vom Enzym abspaltet und zyklisiert. In die NRPS können modifizierende Domänen eingegliedert sein.

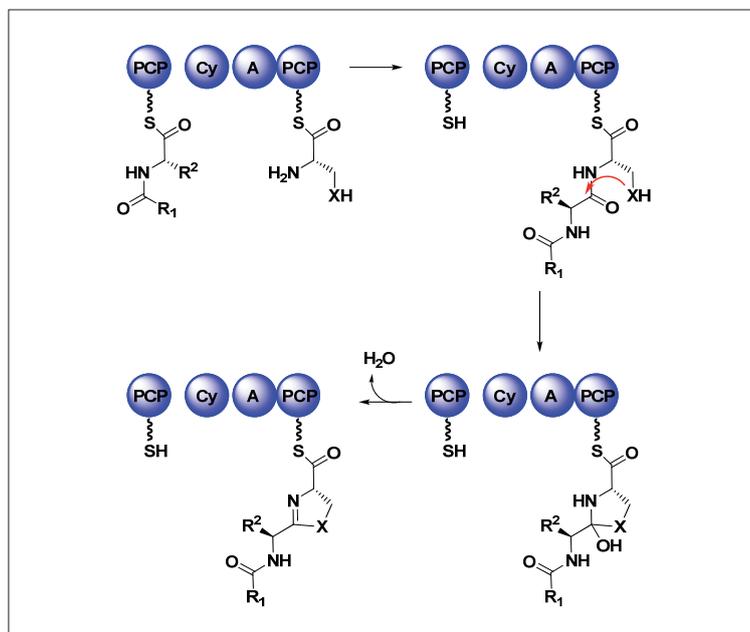


Abb. 6. Ablauf der durch die Cy-Domänen katalysierten Cyclodehydratisierung. Die Cy-Domänen katalysieren den nucleophilen Angriff einer Serin-, Threonin- oder Cystein-Seitenkette auf das stromaufwärts gelegene Amid, gefolgt von der Dehydratisierung des primären Produktes unter Bildung eines Oxazolins oder Thiazolins. Durch in den Cluster integrierte Oxidasen lassen sich die Thia- oder Oxazoline durch Dehydrierung zu den aromatischen Thiazolen bzw. Oxazolen umsetzen. Alternativ können auch spezifische Reduktasen Thiazoline zu den entsprechenden Thiazolidinen reduzieren.

zyklen können in optionalen Schritten durch spezialisierte Domänen weiter umgesetzt werden. Oxidasen katalysieren die Bildung aromatischer Thiazole und Oxazole, während alternativ spezialisierte Reduktasen die Reduktion zum gesättigten N-Heterozyklus, dem Thiazolidin, katalysieren. Ebenfalls optional in den Cluster integriert sind Methyltransferasen. Zahlreiche nichtribosomale Peptide sind N-methyliert. Die Methyltransferasen übertragen hierbei eine CH₃-Gruppe aus S-Adenosylmethionin (SAM).

Die Natur kombiniert die einzelnen katalytischen Domänen der NRPS in vielen Varianten; dadurch ergibt sich die große Vielfalt an Strukturen. Nach Peptidsynthese und Abspaltung des Produkts von der NRPS werden häufig post-NRPS-Schritte durchgeführt. Diese modulieren oft die Hydrophilie des Produkts, können aber auch die Spezifität der biologischen Wirkung variieren. Eine Auswahl enzymatischer Modifikationen außerhalb der NRPS beschreiben Marahiel und Essen.²⁵⁾

Adenylierungsdomänen verfügen über charakteristische Abschnitte, die den spezifischen Einbau einer Aminosäure in ein naszierendes Peptid steuern.²⁶⁾ Die Analyse zeigte eine sehr gute Korrelation zwischen einem bestimmten Sequenzmotiv in diesem Abschnitt mit der Substratspezifität der jeweiligen A-Domäne, über die evolutionären Distanzen zwischen verschiedenen Spezies und sogar zwischen Bakterien und Pilzen. Diese Erkenntnis führte zu der Entwicklung von Domain- und Module-swapping-Experimenten.²⁷⁾ Es wurde auf ein verkürztes Modellsystem auf Basis der Tyrocidin-Synthetase zurückgegriffen, das durch gezielte Erweiterungen in die Lage versetzt wurde, kurze Peptide mit vorhersagbarer Sequenz biosynthetisch zu erzeugen.

Der Austausch einzelner NRPS-Domänen oder -Module wurde intensiv untersucht, von besonderer Relevanz waren dabei Studien zu Protein-Protein-Wechselwirkungen, die sich bei Domain- oder Module-swapping-Experimenten oft als limi-

tierend erwiesen hatten.²⁸⁾ Dieses Prinzip griffen mehrere Arbeitskreise auf, was zu der Biosynthese einer Reihe nichtnatürlicher Peptide führte.

Beispielhaft sind die Arbeiten von Baltz und Mitarbeitern mit dem antibiotisch wirksamen Lipopetid Daptomycin. Durch den gezielten Austausch einzelner oder mehrerer Domänen aus der Daptomycin-NRPS stellten sie mehrere ebenfalls biologisch aktive Daptomycinderivate her (Abbildung 10). Die Ausbeuten lagen dabei sogar in einigen Fällen im präparativ nützlichen Bereich.²⁹⁾ Insgesamt beschreibt diese Veröffentlichung die Erzeugung von über 30 Daptomycin-Derivaten, bei denen die Aminosäuresequenz modifiziert, Glutamat methyliert (Glu → 3mGlu) und die Struktur der Lipidkette verändert war. Ein Teil dieser 30 Substanzen ließ sich in hinreichender Menge aus der Fermentation reinigen, um sowohl Struktur als auch biologische Aktivität zu bestimmen. Keine der auf diese Weise erzeugten Substanzen ist Daptomycin in seiner antibiotischen Wirksamkeit überlegen, allerdings haben einige Derivate ein leicht verändertes Wirkungsspektrum.

Basierend auf diesen Ergebnissen zielte eine weitere Studie aus der gleichen Gruppe darauf, die Produktionsleistungen der rekombinanten NRPS-Systeme zu verbessern.³⁰⁾ Dabei gelang es, die Verknüpfungen verschiedener NRPS-Fragmente zu optimieren und so die nichtnatürlichen Peptide in Ausbeuten von bis zu 134 mg·L⁻¹ zu gewinnen. Einer

alternativen Strategie folgend beschrieben Marahiel und Mitarbeiter die Variabilität in der Ringgröße makrozyklischer Peptide durch eine Deletion einzelner Module innerhalb einer NRPS.³¹⁾

Sonstige Naturstoffklassen

◆ Alkaloide und Terpene sind bislang in erheblich geringerem Ausmaß in Bezug auf die kombinatorische Biosynthese untersucht worden. Ein bemerkenswertes Beispiel zur Variabilität der Alkaloidbiosynthese in Pflanzen gelang der Gruppe von O'Connor: Durch Eingriffe in die Alkaloidbiosynthese des Madagaskar-Immergrüns (*Catharanthus roseus*) bildeten sich viele nichtnatürliche Monoterpen-Indol-Alkaloide.³²⁾ Die wohl größte Herausforderung in diesen Experimenten ist die Isolation signifikanter Mengen neuer Metabolite. Bislang werden überwiegend hochkomplexe und schwer analysierbare Gemische erzeugt. Eine weitere Diskussion steht beispielsweise in Lit.^{33,34)}

Entsprechende Arbeiten zu Terpenen waren bislang vor allem mit Carotenoiden erfolgreich. Die biosynthetische Erzeugung zahlreicher nichtnatürlicher Carotenoide gelang mehreren Gruppen.³⁵⁻³⁸⁾

Zusammenfassung

◆ Die vergangenen Jahre zeigten zwar das große Potenzial der kombinatorischen Biosynthese, aber auch ihre Grenzen. Gegenwärtig ist die

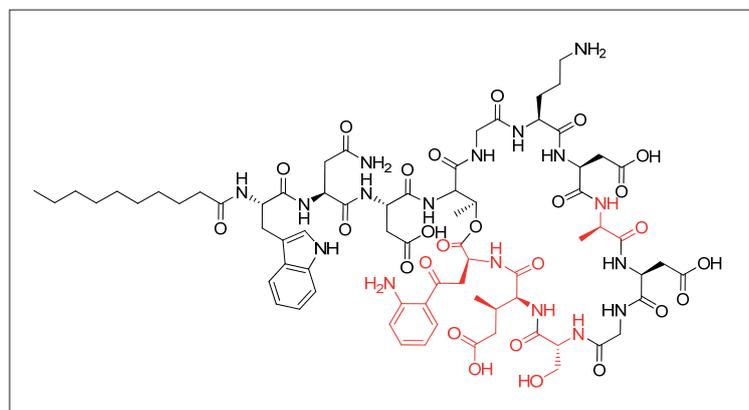


Abb. 7. Struktur des Lipopetid-Antibiotikums Daptomycin. Die von Baltz und Mitarbeitern erfolgreich variierten Positionen 8, 11, 12 und 13 innerhalb des Peptids sind rot hervorgehoben.

größte Herausforderung, Naturstoff-Derivate in präparativ nützlichen Mengen und in hinreichend großen und strukturell diversen Substanzbibliotheken herzustellen. Bislang gelang entweder die Biosynthese kleiner Substanzbibliotheken, beispielsweise im Fall des Lipopeptids Daptomycin. Oder aber die präparierbaren Mengen strukturell komplexer Verbindungen waren für eine weitere Untersuchung zu gering. Zudem ist das erforderliche enzymologische Wissen noch eher begrenzt. Ein möglicher Durchbruch gelang hier Marahiel und Essen für nichtribosomale Peptid-Synthetasen, indem sie die erste Kristallstruktur eines vollständigen NRPS-Moduls aufklärten.³⁹⁾

Die genetische Manipulation der natürlichen Produktionsorganismen ist in vielen Fällen kompliziert und zeitaufwändig. Eine Alternative bietet in diesen Fällen die heterologe Expression ganzer Biosynthesewege in leicht handhabbaren Mikroorganismen, wie durch Katz und Khosla beschrieben.^{40,41)} Diese Technik beschleunigt die Erzeugung von Substanzbibliotheken ebenso wie das Studium der Enzymologie, jedoch oft zum Preis einer stark verringerten Fermentationsausbeute. Im Fall von NRPS ist die enorme Größe der an der Biosynthese beteiligten Gencluster eine zusätzliche Schwierigkeit.

Die kombinatorische Biosynthese übt dennoch eine große Anziehungskraft auf die Naturstoffbiochemie aus. Die Aussicht, in einem Experiment viele komplexe Verbindungen durch den meist relativ einfachen Weg der Fermentation zu erzeugen, rechtfertigt den hohen Forschungsaufwand.

Literatur

- 1) J. Shendure, H. Ji, *Nat. Biotech.* 2008, 26, 1135.
- 2) 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.
- 3) K. Zhang, J. He, M. Yang, M. Yen, J. Yin, *ChemBioChem* 2009, 10, 2599.
- 4) C. Thibodeaux, C. Melançon, H. w. Liu, *Angew. Chem.* 2008, 120, 9960.
- 5) F. Lombó, C. Olano, J. A. Salas, C. Méndez, A. H. David, in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 458, Academic Press, 2009, pp. 277.
- 6) J. Härle, A. Bechthold, A. H. David, in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 458, Academic Press, 2009, pp. 309.
- 7) C. J. Thibodeaux, H. W. Liu, *Pure Appl. Chem.* 2007, 79, 785.
- 8) J. A. Salas, C. Méndez, *Trends Microbiol.* 2007, 15, 219.
- 9) K. Madduri, J. Kennedy, G. Rivola, A. Inventi-Solari, S. Filippini, G. Zanusso, A. L. Colombo, K. M. Gewain, J. L. Occi, D. J. MacNeil, C. R. Hutchinson, *Nat. Biotechnol.* 1998, 16, 69.
- 10) A. P. Salas, L. Zhu, C. Sánchez, A. F. Braña, J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 17.
- 11) A. Luzhetskyy, A. Bechthold, *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 3.
- 12) X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1467.
- 13) B. R. Griffith, J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 622.
- 14) C. Albermann, A. Soriano, J. Jiang, H. Vollmer, J. B. Biggins, W. A. Barton, J. Lesniak, D. B. Nikolov, J. S. Thorson, *Org. Lett.* 2003, 5, 933.
- 15) A. W. Truman, M. V. B. Dias, S. Wu, T. L. Blundell, F. L. Huang, J. B. Spencer, *Chemistry & Biology* 2009, 16, 676.
- 16) C. Zhang, B. R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I.-K. Lee, L. Li, J. S. Thorson, *Science* 2006, 313, 1291.
- 17) G. J. Williams, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 657.
- 18) J. L. Houghton, K. D. Green, W. Chen, S. Garneau-Tsodikova, *ChemBioChem* 2010, 11, 880.
- 19) N. M. Llewellyn, J. B. Spencer, *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 864.
- 20) N. M. Llewellyn, J. B. Spencer, *Chem. Commun.* 2008, 3786.
- 21) F. Kudo, T. Eguchi, *J. Antibiot.* 2009, 62, 471.
- 22) M. Strieker, A. Tanovic, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010, 20, 234.
- 23) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* 2006, 106, 3468.
- 24) T. Dürfahrt, M. A. Marahiel, *Nachr. Chem.* 2005, 53, 507.
- 25) S. A. Samel, M. A. Marahiel, L.-O. Essen, *Mol. Biosyst.* 2008, 4, 387.
- 26) T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chemistry & Biology* 1999, 6, 493.
- 27) H. D. Mootz, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 5848.
- 28) M. Hahn, T. Stachelhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 275.
- 29) K. T. Nguyen, D. Ritz, J.-Q. Gu, D. Alexander, M. Chu, V. Miao, P. Brian, R. H. Baltz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 17462.
- 30) S. Doekel, M.-F. Coeffet-Le Gal, J.-Q. Gu, M. Chu, R. H. Baltz, P. Brian, *Microbiology* 2008, 154, 2872.
- 31) H. D. Mootz, N. Kessler, U. Linne, K. Eppelmann, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 10980.
- 32) W. Runguphan, S. E. O'Connor, *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 151.
- 33) M. K. Julsing, A. Koulman, H. J. Woerdenbag, W. J. Quax, O. Kayser, *Biomol. Eng.* 2006, 23, 265.
- 34) G. A. Cordell, M. L. Quinn-Beattie, N. R. Farnsworth, *Phytother. Res.*, Vol. 15, John Wiley & Sons 2001, pp. 183.
- 35) F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, 14, 174.
- 36) B. N. Mijts, P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert, *Chemistry & Biology* 2005, 12, 453.
- 37) G. Sandmann, *ChemBioChem* 2002, 3, 629.
- 38) A. V. Tobias, F. H. Arnold, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* 2006, 1761, 235.
- 39) A. Tanovic, S. A. Samel, L.-O. Essen, M. A. Marahiel, *Science* 2008, 321, 659.
- 40) B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* 2001, 291, 1790.
- 41) C. Kao, L. Katz, C. Khosla, *Science* 1994, 265, 509.

Uschi Sundermann, Jahrgang 1983, ist seit dem Jahr 2008 Doktorandin im Arbeitskreis von Frank Schulz und Mitglied der International Max Planck Research School on Chemical Biology in Dortmund. Sie studierte von 2003 bis 2008 Biotechnologie/Chemietechnik an der Hochschule Emden/Leer. Zusätzlich hat sie einen BSc in Toxikologie (Studium am Athlone Institute of Technology, Irland)



Susanna Kushnir, Jahrgang 1966, ist seit dem Jahr 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Chemischen Biologie an der Fakultät für Chemie der TU Dortmund. Sie promovierte 1996 bei Viktor Fedorenko an der ukrainischen Universität Lemberg. Bis zum Jahr 2000 war sie dort wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Genetik und Biotechnologie. Danach wechselte sie als Postdoktorandin an das Hans-Knöll-Institut und das Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena. 2003 kam sie an das Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie nach Dortmund.



Frank Schulz, Jahrgang 1979, ist seit Oktober 2009 Beilstein-Stiftungsprofessor für Bioorganische Chemie an der TU Dortmund. Er promovierte im Arbeitskreis von Manfred T. Reetz am MPI für Kohlenforschung in Mülheim. Im Jahr 2007 ging er als Postdoktorant an die Universität Cambridge in den Arbeitskreis von Peter F. Leadley. Ende 2008 kam er als Liebig-Stipendiat zum Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe zurück nach Deutschland. Seine Arbeitsgruppe befasst sich mit fermentativen und chemoenzymatischen Synthesen von Naturstoffen.



frank3.schulz@tu-dortmund.de