

Биологически активные нерибосомальные пептиды. III. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов

Т. И. ОРЛОВА, В. Г. БУЛГАКОВА, А. Н. ПОЛИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Biologically Active Nonribosomal Peptides. III. Mechanism of Biosynthesis of Nonribosomal Peptides

T. I. ORLOVA, V. G. BULGAKOVA, A. N. POLIN

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Третья часть обзора посвящена изучению нерибосомальных пептидов.

Ключевые слова: нерибосомальные пептиды, механизм биосинтеза.

The third part of the review is concerned with investigation of nonribosomal peptides.

Key words: nonribosomal peptides, mechanism of biosynthesis.

Образуемые микроорганизмами биологически активные пептиды, при биосинтезе которых формирование пептидной связи происходит без участия рибосом, получили название нерибосомальных, а мультиэнзимные комплексы, осуществляющие их биосинтез, — нерибосомальных пептидсинтетаз (НРПС) [1, 2].

Этот путь биосинтеза благоприятен для создания многообразия химических структур за счёт включения в биосинтез белковых и небелковых аминокислот, эфирных и тиоэфирных связей вместо амидных, введения модифицирующих фрагментов, образования гибридных систем НРПС с другими белками, образования циклических структур. Преобладает образование циклических структур — циклопептидов и циклодепептидов, которые предохраняют пептиды от деградации пептидазами, увеличивают физико-химическую стабильность, в большей степени отвечают конформационным потребностям при взаимодействии с мишенью. Нарушение циклической структуры приводит к потере биологической активности [1, 2].

Продуктами НРПС являются антибиотики различного спектра действия, противоопухолевые вещества, иммунодепрессоры, токсины, антисклеротические соединения [3–6]. В данной работе представлены литературные данные о механизме биосинтеза нерибосомальных пептидов.

Успехи в этом направлении расширяют перспективы использования микроорганизмов (актиномицетов, бактерий, грибов, многих морских микроорганизмов) в качестве ресурса для получения новых фармацевтических препаратов.

Основные сведения о химических структурах нерибосомальных антибиотиков, механизмах их действия на микробную клетку, механизмов устойчивости продуцентов к собственным антибиотикам, возникновению устойчивости к ним у других микроорганизмов представлены нами в обзорах [5, 6]. Аналогичные сведения относительно нерибосомальных пептидов с разнообразными практически важными биологическими свойствами представлены в обзоре [6].

1. Нерибосомальные пептидсинтетазы (НРПС)

Биосинтез нерибосомальных пептидов осуществляется большими мультиэнзимными системами, состоящими из модульных белков, каждый из которых содержит 1000–1500 аминокислотных остатков и действует как независимый фермент [7]. Основные положения о механизме нерибосомального биосинтеза были заложены в 70-х годах прошлого столетия тремя группами исследователей — F. Lipmann et al. [8], S. Laland et al. [9] и K. Karahashi [10], изучавшими механизм образования грамицидина S и тироцидина культурами *Bacillus brevis*. Предполагалось, что биосинтез нерибосомальных пептидов осуществляется на тиоматрице, где происходит аденилирование субстратной ами-

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12. Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

нокислоты, а затем связывание её с активной SH-группой 4'-фосфопантотеина (ФП), простетической группой белка-переносчика. При взаимодействии этого интермедиата с соседней тиоэтерифицированной аминокислотой серией реакций транспептидации и транслокации шаг за шагом удлиняется пептидный продукт.

В дальнейшем в результате многочисленных исследований были сформулированы модульные принципы строения и функционирования НРПС [11, 12].

В общем случае НРПС представляет собой линейную конструкцию, состоящую из отдельных модулей, соединенных между собой короткими пептидами (пептиды коммуникационного взаимодействия) (ПКВ) [13]. Каждый модуль отвечает за включение в синтезируемый продукт одной аминокислоты в той последовательности, в какой они запрограммированы в линейной конструкции, в большинстве своём подчиняясь правилу коллинеарности на геномном уровне [14].

По данным [15], в клетке продуцента НРПС расположены вдоль мембраны. Домены в модулях могут иметь различные геометрические формы и располагаться под произвольными углами по отношению друг к другу. Минимальный модуль состоит из трёх ферментов-доменов, связанных между собой небольшими пептидами-линкерами (рис. 1) [3, 16, 17].

Домен А узнает и удерживает из субстратного пула аминокислоту, соответствующую месту данного модуля в системе НРПС, в присутствии ионов магния и АТФ активирует её, превращая в аминокислотаденилат [14].

Тиолирующий домен — белок-переносчик (БП) связывает аминокислотаденилат аминокислоты с SH-группой ФП и переносит её к каталитическому центру следующего модуля [7].

Образование пептидной связи катализируется конденсационным доменом С, в результате длина синтезируемого пептида увеличивается на одну аминокислоту с С-конца [17].

Крайний С-концевой модуль содержит домен тиоэстеразу (ТЕ), удаляющую готовый пептид с тиоматрицы [2].

Модули могут также содержать эпимеразу, метилтрансферазу и др. [2]. В ряде случаев стартовый модуль дополнен доменом ацилирования N-концевой аминокислоты жирной кислотой [18].

1.1. Инициация биосинтеза нерибосомального пептида. Биосинтез нерибосомального пептида начинается переносом ФП с коэнзима А (Со А) на остаток серина БП, где ФП заякоривается [19]. При этом апо-НРПС превращается в холо-НРПС. Состав и строение стартового модуля зависят от стартовой N-концевой аминокислоты синтезируемого пептида. При стартовой L-аминокислоте это минимальный модуль без домена

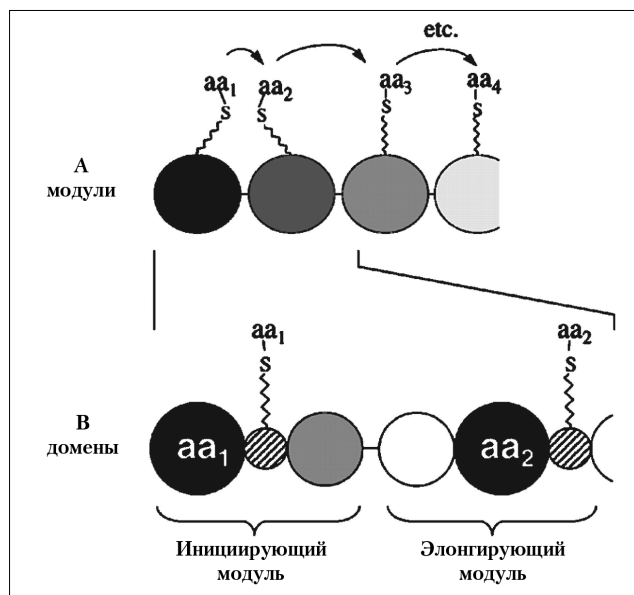


Рис. 1. Общая схема биосинтеза нерибосомальных пептидов [17].

А — aa₁, aa₂, aa₃ и т.д. — модули; каждый включает в пептид одну аминокислоту. В — домены: 1) иницирующий (aa₁), 2) элонгирующий (aa₂).

С. В случае D-аминокислоты модуль дополнен эпимеразой. Эпимеризации подвергается уже активированная L-аминокислота. Однако описаны случаи активации D-аланина [1, 20, 21].

Биосинтез липопептидных антибиотиков начинается с биосинтеза N-ацилированной N-концевой аминокислоты. Стартовый модуль содержит двойной фузирванный домен, который активирует жирную кислоту и переносит её на SH-группу ФП, а затем на NH₂-группу будущей N-концевой аминокислоты [18].

Для активации стартовых небелковых аминокислот существуют гены специальных модулей [21].

1.2. Аденилирующий домен А.

«Узнавание» и аденилирование субстратных аминокислот. Домены А из НРПС относятся к обширному семейству аденилирующих ферментов. Ближе всего — к люциферазе насекомых [22]. Они выбирают и аденилируют (активируют) субстратную аминокислоту согласно запрограммированной первичной структуре синтезируемого пептида и являются поэтому важнейшими доменами модуля [12, 14, 23, 24].

Сравнительное кристаллографическое исследование кристаллических структур люциферазы светлячка и активирующего L-фенилаланин домена А (PhA) из НРПС биосинтеза грамицидина S (продуцент *Bacillus brevis*) положило начало изучению механизма узнавания [11, 22]. Оказалось, что в кристаллических структурах пептидные цепи обоих объектов перегибаются и складываются в виде двух компактных субдоменов, удерживаемых водородными связями (рис. 2). N-концевой, наи-



Рис. 2. Структурные основы активации фенилаланина при нерибосомальном биосинтезе грамицидина S [11].

более обширный субдомен, образованный аминокислотными остатками 17–428 (цифры указывают на положение аминокислоты в пептидной цепи фермента с N-конца) подразделяется еще на три субструктуры. Значительно меньший С-концевой субдомен образован аминокислотными остатками 429–530, он также образует дополнительные субструктуры. На основании сходства кристаллических структур люциферазы и PhA был сделан вывод, что аденилирующие ферменты имеют одинаковую топологию.

Сравнение кристаллических структур, содержащих и не содержащих аденилат фенилаланина,

показало, что образование аденилата вызывает поворот субдоменов на 94° по отношению друг к другу. Активная зона располагается между соседними субдоменами, их поворот закрывает образовавшийся «карман», здесь происходит «узнавание» и аденилирование фенилаланина [11, 12, 25].

Биохимическими, генетическими и кристаллографическими методами было установлено, что карман для активации фенилаланина с одной стороны ограничен Asp 235 и Lys 517 с другой (рис. 3). Стороны разделены индольным циклом триптофана Trp 239 на дне «кармана», связанного каналом с окружающей жидкостью. α -Аминная и карбоксильная группы субстратного фенилаланина стабилизируют его положение взаимодействием с Asp 235 и Lys 517 соответственно (аминокислоты в пептидной цепи фермента с N-конца).

Более 200 аминокислот образуют «карман» PhA, но для удержания в нём L-фенилаланина и его активации необходимы только 8–10 аминокислот: Asp 235, Ala 236, Ile 330, Cys 331 с одной стороны и Ala 322, Ala 301, Ile 299, Thr 278, Lys 517 с другой.

В результате исследования был полностью идентифицирован L-фенилаланин-связывающий карман PhA — его топология, аминокислотные остатки, значимые для узнавания субстратного L-фенилаланина, их положение в пептидной цепи. Было предложено считать PhA структурной моделью, которой могут соответствовать активирующие домены всех НРПС [11].

В последующих работах было показано, что на филогенетическом древе аминокислотные последовательности «карманов» кластировались по признаку активирования одинаковой субстратной аминокислоты, независимо от вида микроорганизма [14]. Из сотни аминокислотных остат-

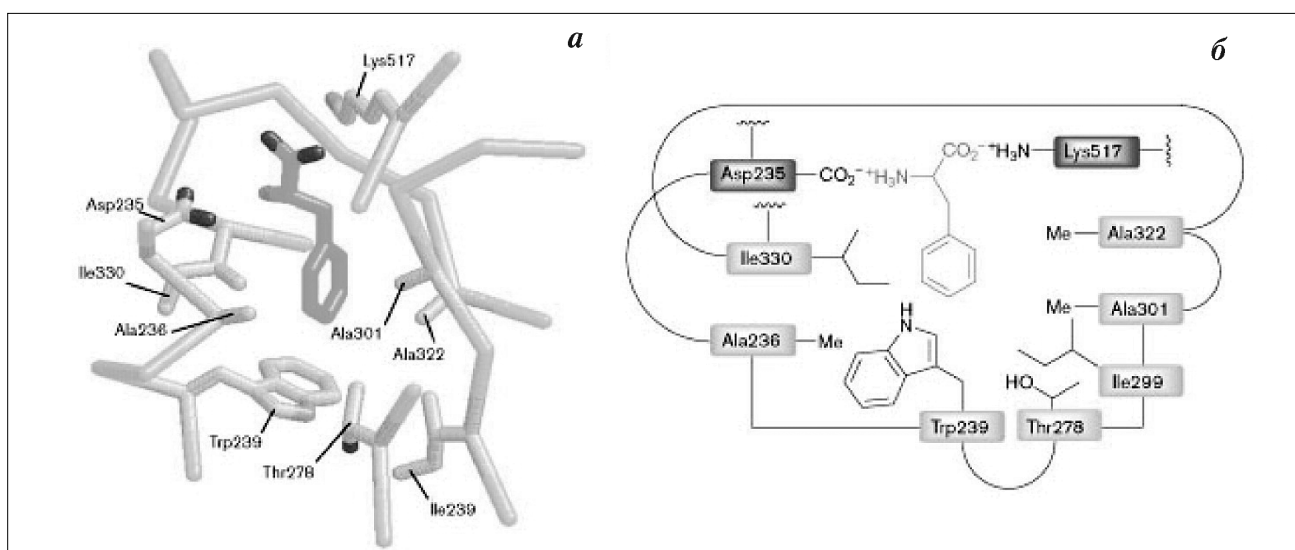


Рис. 3. Предполагаемая структура специфичного «кармана» активации фенилаланина [26]

а — трёхмерное изображение; б — линейная структура.

ков, образующих «карман» домена А, значимыми для узнавания субстратной аминокислоты являлись 8—10 остатков [14, 24].

В группе доменов А, активирующих одинаковые субстраты, значимые аминокислотные остатки были в основном идентичны друг другу, но отличались от значимых остатков (в соответствующих положениях пептидной цепи) эталонного PhA [26], т. е. проявлялась селективность активации.

Идентификация структур, ответственных за специфичность активации субстратных аминокислот «карманами», осуществлялась анализом данных филогенетического древа, водородных связей, электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, проведённым с каждым доменом А из базы данных их аминокислотного состава. Последовательность аминокислотных остатков изучаемых доменов переносили на матрицу (модель PhA) с известными значимыми последовательностями аминокислотных остатков.

Все структуры разделились на две группы, специфичность которых зависела от химической структуры боковой цепи субстратной аминокислоты. Домены, активирующие аминокислоты с полярными боковыми цепями, всегда содержали 1—2 остатка, взаимодействующих с субстратной боковой цепью через водородные и электростатические связи.

Для субстратных аминокислот с гидрофобными боковыми цепями остатки, определяющие специфичность карманов, были, за небольшими исключениями, гидрофобными. Кроме того, обнаруживались вариации в составе остальных значимых остатков. В связи с этим многие из доменов этого типа имеют более низкую субстратную специфичность, чем домены активации полярных аминокислот.

Совокупность представленных данных позволила сформулировать представление о нерибосомальном коде аминокислотной селекции: последовательность аминокислот в нерибосомальных пептидах определяется последовательностью аминокислотных остатков самих синтетаз (домена А), являющихся продуктами трансляции соответствующих генов.

8—10 значимых аминокислотных остатков, образующих активирующий «карман», представляют собой кодоны, аналогичные кодонам рибосомального биосинтеза, а субстратные аминокислоты — антикодоны [14, 24].

Параллельно генетическому коду нерибосомальный код имеет вырожденный характер. Так, возможны случаи, когда «карманы» с одинаковой последовательностью значащих аминокислотных остатков узнавали и активировали различные субстратные аминокислоты; один «карман» мог активировать несколько субстратных аминокис-

лот [26], лейцин, изолейцин, валин активировались несколькими «карманами».

Расшифровка нерибосомального кода позволяет предсказывать тип структуры неидентифицированных аминокислот в синтезируемых продуктах.

1.3. Домен тиолирования (белок-переносчик). Домен тиолирования — белок-переносчик (БП), назначение которого в системе НРПС — перенос промежуточных продуктов биосинтеза в виде тиоэфиров к каталитическим центрам. Структурно он близок БП поликетидсинтетазы. Перенос осуществляется с помощью своеобразной «руки», представляющей собой кофактор ФП, эфирно связанный с ОН-группой серина (Ser 45) белковой части. Источником ФП является CoA [7].

БП и С-концевая часть аденилирующего домена А располагаются на каталитической платформе, образованной N-концевой частью домена А и конденсационным доменом С. При этом возникают условия для продвижения активированного интермедиата (пептида или аминокислоты), связанного с БП, к реакционному центру. Происходит перенос интермедиата с SH-группы ФП на NH₂-группу активированной аминокислоты следующего модуля. Далее происходит каскад однообразных переносов с участием БП соответствующих модулей, т. е. тиолирование и перенос субстратной аминокислоты осуществляется каждым модулем своим БП [7]. Ранее предполагалось, что перенос осуществлялся одним БП для всего мультиэнзима, как это происходит при биосинтезе жирных кислот [8—10].

Полагают, что конформационные изменения домена А во время активации субстрата координируются с положением и конформацией БП, так как параметры «руки» недостаточно велики, чтобы достигать реакционного центра. Возникновение других конформаций позволяет БП и ФП присутствовать в обоих реакционных центрах — исходного модуля и следующего за ним [2].

БП выполняет не только чисто механическую роль, но и принимает участие в контроле узнавания аминокислоты доменом А [7]. Так, исследование 94 БП из различных НРПС показало, что они кластируются по группам, взаимодействующим с доменами эпимеразы, метилтрансферазы, некоторых небелковых аминокислот, т. е. распознают аминокислоты [27].

1.4. Конденсационный домен (образование пептидной связи, элонгация). Образование пептидной связи катализируется конденсационным доменом С. На каталитической платформе происходит нуклеофильная атака БП-связанной аминокислоты модуля n+1 на тиоэфирную связь БП пептида модуля n, происходит её разрыв, пептид (донор) переносится на α -аминную группу БП-связанной аминокислоты модуля n+1 (акцептор).

Пептидная связь удлиняется на одну аминокислоту с С-конца растущего пептида.

Активный центр этого процесса находится в плоскости расположения БП-доменов модулей n и $n+1$ с противоположных сторон конденсационного домена, определённую каталитическую роль играет гистидин 147 [17].

Конденсационный домен принимает участие в узнавании аминокислот, исправляет ошибки, допущенные доменом А. На примере 74 доменов С из различных НРПС показано их кластрирование по группам пар аминокислот, участвующих в реакциях конденсации: L и L, L и N-метиলামинокислота, L и D, α -L и δ -L [24]. Более широкой специфичностью обладает донорная (пептидильная) сторона С доменов, более селективна акцепторная сторона.

Если НРПС не содержит домена эпимеризации Е, его заменяет вариант фузирванного белка, совмещающий функции конденсации и эпимеризации (С/Е). Эпимеризационная активность вызывается конформационными изменениями С/Е домена, которые индуцируются аминокислотами БП (акцептор), необходимым для образования следующей пептидной связи. Эпимеризации не происходит до тех пор, пока БП модуля $n+1$ не будет заряжен акцепторной аминокислотой, после чего происходит образование пептидной связи с хиральностью D/L [28].

Тип домена С/Е присутствует в НРПС, синтезирующих синрингомицин [2], артрофактин [28], эндурацин [2] и др.

Часто домен С совмещается с циклизационным доменом циклазой (Су), которая катализирует дегидратацию серина, треонина, цистеина в молекулах антибиотиков с образованием остатков оксазолина и тиозолина [29], которые при участии O_x (флавиномононуклеотид) превращаются в остатки оксазола и тиазола [24].

1.5. Завершение биосинтеза (терминация). Когда пептид достигает запрограммированной длины, что определяется количеством модулей в НРПС, он покидает БП С-концевого модуля. Снятие готового пептида начинается его переносом с ФП на ОН-группу серина тиюэстеразы (ТЕ) домена С-концевого модуля, при этом образуется пептидил-О-интермедиат, легко гидролизующийся водой.

Дальнейшая судьба этого интермедиата зависит от структуры пептида и тиюэстеразы, но он всегда претерпевает дальнейшие превращения, после чего становится биологически активным веществом.

После гидролиза линейный пептид может остаться линейным, но его С- и N-группы блокируются (линейный грамицидин) [30]. При наличии в структуре пептида внутреннего нуклеофила (например, OH^- , NH_2) образуются цикломакролактон или цикломакролактон с боковой цепью [31].

Если в катализе участвует конденсационный домен С, происходит конденсация по типу голова-хвост (циклоспорин, тироцидин) [32].

Описан ряд тиюэстераз, обладающих одновременно свойствами лигазы и тиюэстеразы. Тетрамерная НРПС антибиотика тиюкоралина синтезирует октапептид в качестве фрагмента хинолил-депсипептида. Таким образом, четыре модуля работают дважды, используя механизм повтора [33]. Механизм повтора используется также при биосинтезе грамицидина S [34] и сафрамицина [23].

Тиюэстеразы обладают и рядом других особенностей в зависимости от микроорганизма-продуцента, структуры синтезируемого пептида, индивидуальных свойств НРПС.

Тиюэстераза тироцидин-синтезирующей НРПС образует по типу голова-хвост не только циклопептид, но и циклодепсипептид [32]. Тиюэстераза НРПС сурфактина циклизует синтетический субстрат с образованием этого антибиотика, аналогичная тиюэстераза НРПС мутанта продуцента, имеющая несколько изменённый аминокислотный состав, антибиотика не образует [35].

Высокая субстратная специфичность тиюэстераз связана с природой аминокислоты БП, расположенной рядом с серином, к которому привязана тиюэстераза [27].

Молекулярные основы субстратной селективности доменов А ещё не поняты полностью, но предложенная модель с успехом использована для предсказания селективности вновь открытых НРПС. Нерибосомальные пептиды «растут» в результате последовательного добавления активированных мономеров. Удлиняющаяся цепь каждый раз переносится на следующий модуль, заряженный соответствующей аминокислотой. Когда пептид достигает запрограммированной длины, он покидает матрицу, освобождая биохимический механизм для следующего цикла. Последовательность аминокислотных остатков нерибосомальных пептидов следует из транслируемых последовательностей аденилирующего домена.

2. Гены биосинтеза НРПС и особенности некоторых НРПС

2.1. НРПС и поликетидсинтетазы (ПКС). Значительная часть лекарственных антимикробных препаратов, применяемых в медицинской практике, производится культивированием микроорганизмов, выделенных из природных источников. Эти микроорганизмы в течение длительного времени, измеряемого миллионами лет эволюции, сосуществовали в окружающей конкурентной среде и, следовательно, прошли селекцию на биосинтез антимикробных веществ и образова-

ние собственной устойчивости к активным структурам конкурентных микроорганизмов. Примером могут служить нерибосомальные циклопептиды и циклодепсипептиды, устойчивые к микробным гидролитическим ферментам, хотя продуценты гидролитических ферментов встречаются крайне редко [36].

Нерибосомальные пептиды и поликетиды — экологически важные вторичные метаболиты, образуемые бактериями и грибами. Как и НРПС, ПКС являются мультиферментами и организованы по модульному принципу. Модули располагаются в определенном порядке, образуя линейную конструкцию. Каждый модуль содержит несколько доменов (ферментов) — до 9 видов [37], некоторые из которых аналогичны доменам НРПС. Важной особенностью генов биосинтеза НРПС и ПКС является их способность к горизонтальному переносу как внутривидовому [38], так и между генетически отдалёнными родами [39], что играет важную роль в изменчивости, видообразовании, эволюции прокариотов [40].

Структурное и каталитическое сходство между НРПС и ПКС позволяет их модулям участвовать в комбинированном биосинтезе. Было показано, что существуют молекулярные основы межмолекулярных коммуникаций между модулями НРПС и ПКС, в результате чего возникают природные гибридные продукты двух видов — или их биосинтез не включает функциональные реакции между НРПС и ПКС модулями, или биосинтез катализируется гибридными системами НРПС/ПКС, включая прямое взаимодействие между модулями НРПС и ПКС (именно они ответственны за комбинаторный биосинтез). Каталитические центры в гибридах остаются такими же, как и в НРПС и ПКС. Специфические линкеры могут играть важную роль в коммуникационных взаимодействиях, способствуя переносу растущих интермедиатов между взаимодействующими модулями НРПС и ПКС. Фосфопантотеин-трансфераза с широкой специфичностью переноса важна для получения функциональных гибридных мегасинтетаз НРПС/ПКС/НРПС/ПКС или ПКС/НРПС/ПКС/НРПС [41–44].

Мегасистемы, как правило, участвуют в биосинтезе усложнённых структур нерибосомальных пептидов с противоопухолевым действием (см. раздел 2.4).

Хотя нерибосомальный пептидный синтез — ключевой механизм, используемый для синтеза биоактивных пептидных метаболитов микроорганизмами, часто гены НРПС составляют только часть мультигенных кластеров, необходимых для получения готового продукта. Остальной генетический материал может представлять собой гены биосинтеза ПКС, биосинтеза жирных кислот или экзотических аминокислот и др.

В разделах 1.1–1.5 были представлены классические схемы строения и функционирования НРПС и роль каждого домена в этом процессе. В разделах 2.1–2.3 приведены некоторые данные о генах, кодирующих НРПС, особенностях строения и функционирования НРПС, составе аминокислот, участвующих в биосинтезе отдельных конкретных антибиотиков и других соединений с отклонениями от классической схемы.

2.2. Липопептидные антибиотики. *Дантомицин* синтезируется *Streptomyces roseosporus fungicidicus*. Гены биосинтеза небелковых аминокислот — кинуренина и 3-метил-глутаминовой кислоты (структурные компоненты циклической части молекулы антибиотика) расположены рядом с генами НРПС [45, 46].

У продуцента *фриулимицина* *Actinoplanes friuliensis* в кластер генов синтеза антибиотика входят гены биосинтеза пипеколиновой, 3-метил-аспарагиновой, 2,3-диаминомасляной кислоты — структурных компонентов молекулы фриулимицина и гены регуляции биосинтеза и обеспечения устойчивости к собственному антибиотику [37, 47].

В геноме продуцента *микосубтилина* оперон 38 kb интегрирует гены биосинтеза НРПС и β -аминожирной кислоты, образующейся из β -ациотио-эфира (полупродукта биосинтеза жирных кислот) под действием аминотрансферазы. Полагают, что конденсационный домен первого модуля НРПС катализирует присоединение этого тиоэфира к первой активированной аминокислоте в системе НРПС [31].

Сирингомицин синтезируется *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Кластер генов биосинтеза антибиотика состоит из двух частей, разделённых участком 175 bp, правило коллинеарности не соблюдается, отсутствует единая транскрипционная единица, отсутствуют домены эпимеразы [48, 49].

У продуцента *фузарицидина* *Paenibacillus polymyxa* кластер генов биосинтеза содержит 32,4 kb, кодирует шестимодульную НРПС. Вторым, четвёртым и пятым модулями содержат домены эпимеразы. Шестым модулем не содержит этого домена, но домен А активирует D-аланин непосредственно. Кластер генов включает гены, участвующие в биосинтезе липидной части молекулы. Гены, определяющие регуляцию синтеза, системы транспорта антибиотика из клетки и антибиотикоустойчивость, не обнаружены [20].

2.3. Антибиотики, не являющиеся липопептидами. Антибиотики грамицидины синтезируются вариантами культур *Bacillus brevis*. Кластер генов биосинтеза *линейного грамицидина* расположен на двух непересекающихся фосмидах и вместе с фрагментом-мостиком в 13 bp. занимает участок 74 kbp, 4 рамки считывания кодируют НРПС с двумя, четырьмя, шестью и четырьмя модулями

соответственно. Среди 16 модулей семь доменов эпимеризации, домен формилирования, слившийся с первым модулем, и домен редуктазы, прикнувшийся к С-концевому модулю. С-концевой глицин предположительно восстанавливается соседним доменом редуктазы до этаноламина [30].

Особенность НРПС *граммидина С* состоит в том, что двухмодульная тиэстераза обладает активностью лигазы и циклазы, вследствие чего пятимодульная НРПС синтезирует циклодекапептид, т. е. работает механизм двукратного повтора. Первый экземпляр синтезированного пентапептида образует эфирную связь с серином (активный центр тиоэстеразного домена). Второй экземпляр пентапептида взаимодействует с соседним БП с образованием декапептидил-тиоэфира, который затем переносится на тиоэстеразу и циклизуется с образованием циклодекапептида [34].

У *напсамиина* — уридилпептидного антибиотика, образуемого *Streptomyces* DSM5940, 3'-дезоксиуридин связан амидной связью с карбоксильной группой N-метил-2,3-диаминомасляной кислоты, которая ацилирована по одной из аминных групп 6-окситетрагидроизохинолиновой кислотой, а по другой — метионином или метилтирозином. Анализ кластера генов показал, что структура пептидного ядра строится нелинейным нерибосомальным синтезом — механизмом, использующим одиночные или двудоменные белки. Направление биосинтеза пептидной цепи дважды меняется. Антибиотики этой группы (муредомицин, пасидамицин) ингибируют бактериальную транслоказу, подавляя биосинтез пептидогликана [50].

2.4. Противоопухолевые соединения. Синтезируемый *Chromobacterium* бициклический противоопухолевый *денсуненмид FK228* представляет собой 16-членный макролактон, имеющий общую эфирную связь с 17-членным циклом, содержащим дополнительно дисульфидную связь. В структуру входят: блок из трёх аминокислот (D-cys, D-val, Val), 2,3-дегидротреонин, L-(S,E)-3-окси-7-меркапто-4-гептеновая кислота. Последняя образована одним остатком цистеина и двумя углеродными единицами C₂ из малонил-CoA. Депсипептид FK228 синтезируется гибридной системой НРПС/ПКС/НРПС с дополнительной активностью образования дисульфидной связи [51]. Однако используемые в реакции два модуля ПКС утратили функцию домена ацетилтрансферазы. Этот недостаток, возможно, восполняет ацетилтрансфераза синтетазного комплекса жирных кислот, т. к. гены этого комплекса обнаружены в кластере генов биосинтеза FK228 [52].

Лейнамидин — макролактон, *спио*-связанный с 1,3-диоксо-1,2-дитиолоном, образуется *Streptomyces atroolivaceus*. Биосинтез осуществляется мегагибридной синтетазой, гены которой

расположены на двух пересекающихся космидах. Для образования структуры необходимы два модуля НРПС и 6 модулей двууглеродных единиц из ПКС. Аденилирующий домен иницирующего модуля НРПС активирует непосредственно D-аланин, связывает его в положении транс с БП, образуя интермедиат D-Ala-S-БП как результат специфических коммуникаций между белками А и БП. Домен А второго модуля активирует цистеин, связывает его с БП, образуя конструкцию C_γ-C_γ-А-БП-О_х. Один C_γ катализирует образование пептидной связи с D-Ala, второй вызывает циклизацию дипептидного интермедиата с образованием тиазола. Домен О_х превращает его в тиазол, затем ПКС завершает элонгацию углеродного скелета молекулы [21, 53, 54].

Кластер генов агликона гликопептидного антибиотика *блеомицина* (продуцент *Streptomyces verticillus*) содержит 10 генов НРПС, кодирующих 9 модулей, и один ген ПКС, кодирующий один модуль ПКС. Клонированием и биохимическими экспериментами показано, что в биосинтезе блеомицина участвуют модули НРПС и ПКС, образуя мегасинтетазу НРПС/ПКС/НРПС, служащую моделью для гибридных систем НРПС/ПКС или ПКС/НРПС. Каталитические центры одинаковы в гибридных и негибридных системах НРПС и ПКС. Специфические внепептидные линкеры играют важную роль во внемодульных взаимодействиях для переноса растущих интермедиатов между модулями НРПС и ПКС [43, 44].

Сафрамицин, синтезируемый *Streptomyces lavendulae*, относится к тетрагидроизохинолиновому семейству антибиотиков. Секвенированием установлено 30 генов, составляющих кластер: необычная НРПС, сшивающие ферменты, белки устойчивости и регуляции биосинтеза. НРПС содержит три аденилирующих модуля для включения в пептид аланина, глицина и тирозина. Однако синтезируется тетрапептидил-интермедиат, что не соответствует правилу коллинеарности. Полагают, что последний модуль, включающий тирозин, повторяет образование пептидной связи дважды [23].

Актиномицин С₃ (актиномицин D) образуется *Streptomyces chrysomallus* при окислительной конденсации двух молекул антраноил-пентапептидил лактона (антраноил — остаток 4-метил-3-окси антраниловой кислоты, 4-МОА). При этом возникает хромофорная часть молекулы антибиотика [55].

4-МОА-пептидолактон синтезируется НРПС-АМ-синтетазой, гены которой расположены на хромосоме в середине кластера генов и организованы в виде двух транскрипционных единиц, отделённых пространственно друг от друга. Иницирующий модуль содержит домен, активирующий 4-МОА, и домен БП. Две мульти-

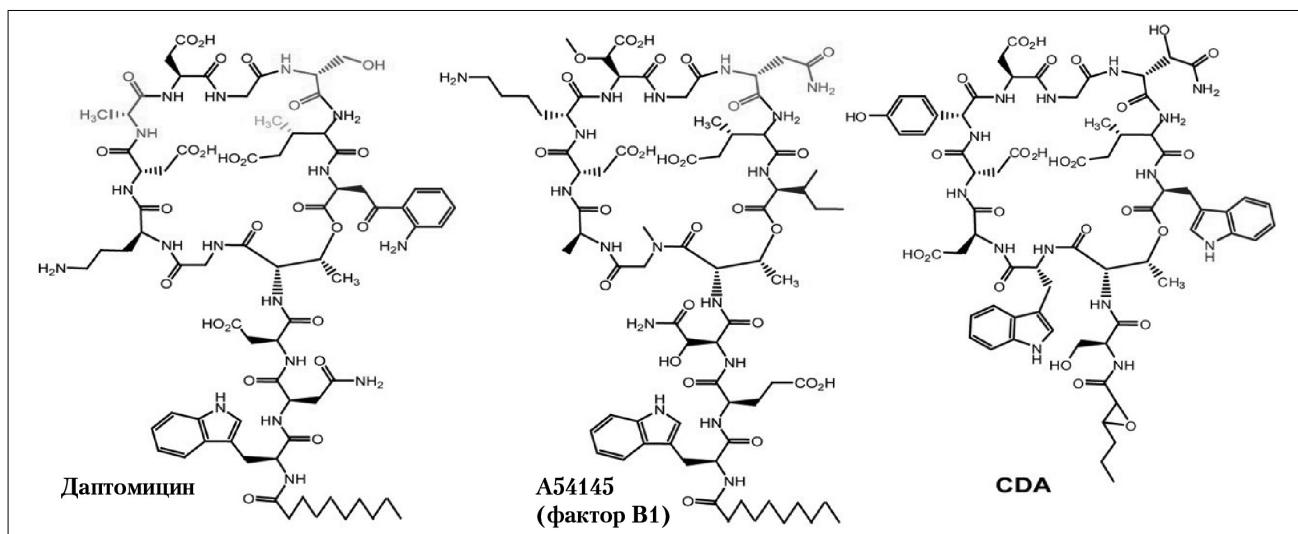


Рис. 4. Химическая структура Са-зависимых липопептидов [72].

функциональные субъединицы состоят из 5 модулей, последний модуль содержит ТЕ, снимающую пептидолактон с матрицы.

Гены, кодирующие АМ-синтазы, попарно ориентированы инверсивно [56]. В кластер генов входят также гены: биосинтеза 4-МОА как продукта деградации триптофана, гены N-метилтрансферазы, феноксазидин синтазы, принимающей участие в окислительной конденсации 4-МОА-пентапептидолактонов, гены белков, определяющих устойчивость продуцента [57, 58].

Продуцентом *тиоокоралина* является морской актиномицет. Вещество представляет собой бициклический тиюктадепсипептид, N-концевые группы которого ацилированы 3-окси-хинолиновой кислотой. НРПС содержит 4 модуля, достаточных только для биосинтеза тетрапептида D-Cys-Gly-NMet-Cys-3,5-ди-Met-LCys. Однако в результате того, что ТЕ данной НРПС функционирует как повторяющаяся лигаза, синтезируя второй экземпляр тетрапептида, при этом образуется тиюктадепсипептид. В то же время ТЕ является платформой, катализирующей макролактонизацию и макротриоллактонизацию. Две тиолактонные связи образуются между SH-группой цистеина одного тетрапептида и карбоксильной группой 3,5-N,S-диметилцистеина второго тетрапептида [33].

3. Перепрограммирование НРПС

В 50-х годах прошлого столетия был предложен метод «направленного биосинтеза», целью которого была модификация аминокислотного состава антибиотиков-полипептидов [59]. Метод основан на замещении структурных аминокислотных остатков в антибиотиках в процессе культивирования продуцента в присутствии определенных экзогенных аминокислот. При этом

предполагалась низкая специфичность ферментов биосинтеза данного антибиотика.

Были получены многочисленные «биосинтетические» актиномицины с интересными фармакологическими свойствами [60–63] и сафрамицины [64].

Успехи в изучении механизма биосинтеза нерибосомальных пептидов, установление модульного строения НРПС пробудили генно-инженерный интерес — перепрограммировать НРПС с целью получения новых вариантов пептидов, более эффективных по фармакологическим показателям.

Прослеживается несколько инженерных стратегий генетических манипуляций как на уровне изменения субстратной специфичности «узнающих» и активирующих доменов А, так и на уровне замены целых модулей. Были использованы разнообразные методы генной инженерии: модульный обмен с участием плазмид, фузия модульных белков, хемоэнзиматический биосинтез с использованием циклаз, мутагенез, блокирующий некоторые энзиматические пути.

Основные работы проведены с НРПС даптомицина и его аналогов, тироцидина, сарфактина.

Антибиотики липопептиды даптомицин, CDA и A54145 близки между собой по химической структуре, содержат 13 аминокислот, 10 из которых образуют циклопептид, а 3 аминокислоты — экзоциклические, ацилированные жирными кислотами. Антибиотики отличаются друг от друга несколькими небелковыми аминокислотами (рис. 4). Это обстоятельство делает достаточно удобным проведение экспериментов по перепрограммированию НРПС с продуцентами именно этих антибиотиков.

Отсутствие природной конкуренции и применение различных методов трансформации для большинства рекомбинантных штаммов проду-

центров нерибосомальных пептидов *in vivo* нарушает нормальное функционирование генов этих штаммов. Для устранения этого влияния генно-инженерными методами сконструирован штамм *Bacillus subtilis* с искусственной хромосомой, суррогатный хозяин для биосинтеза бацитрацина. Часть хромосомы *B. subtilis*, кодирующую сарфактинсинтетазу, замещали частью хромосомы продуцента бацитрацина *Bacillus licheniformis*. Суррогатный хозяин экспрессировал гены чужеродной НРПС с высоким выходом бацитрацина, включая посттрансляционную модификацию молекулы бацитрацина и гены устойчивости к антибиотику [65].

Два первых модуля НРПС биосинтеза тирцидина *Bacillus brevis* в определенных условиях образуют фенилаланил-пролил — дикетопиперазин, обладающий антибиотической активностью. Ген этих двух модулей в гетерологичном хозяине *E. coli* синтезирует дикетопиперазин с хорошим выходом, продукт выделяется в среду, нетоксичен для *E. coli* [66].

Тиоэстеразы НРПС в большинстве случаев обладают циклазной активностью и находят применение как в циклизации природных пептидов, так и в циклизации субстратов, синтезируемых твердофазным синтезом [1]. Циклазы являются подвижными катализаторами и могут быть использованы для генерации новых нерибосомальных пептидов.

Было показано, что синтетаза сарфактина может быть модифицирована перенесением региона С-концевой тиоэстеразы на конец того или иного домена А с образованием новых усеченных пептидов с предсказуемой последовательностью аминокислотных остатков [67].

Рекомбинантная циклаза нерибосомальной пептидсинтетазы Са-зависимого липопептида CDA была использована в качестве инструмента для получения новых производных даптомицина. Тиоэфиры синтетических линейных ундекапептидов, по аминокислотному составу идентичные CDA и отличающиеся от даптомицина остатками в положении 6, были циклизованы действием циклазы из НРПС биосинтеза CDA. Сочетание химического синтеза пептидов с их энзиматической циклизацией позволило получить ряд производных даптомицина, различающихся остатками в положении 6. Полностью химическим синтезом получить подобные структуры затруднительно [68, 69].

Получены разнообразные аналоги даптомицина, модифицированные в его циклической части. В работе использовали НРПС биосинтеза нативных антибиотиков CDA и A54145, близких даптомицину по структуре и аминокислотному составу. Модифицированные антибиотики получали посредством γ Red рекомбинаций, комбинируя единственный и мультимодульный обмен, субъединич-

ный обмен, инактивацию сшивающего фермента 3-метилтрансферазы. Элиминация модулей осуществлялась удалением соответствующих линкеров, связывающих модули. Среди полученных аналогов не было вариантов, превосходящих даптомицин по фармакологическим показателям, однако обнаружили некоторые закономерности в рамках проблемы аминокислотный состав — активность. Аминокислоты в положениях 12 и 13 играют ключевую роль для уровня антибиотической активности, а в положении 11 — незначительную. В положении 8 возможны Ser или Lys при условии Asn в положении 11 [45].

Делеционным мутагенезом и конъюгационным переносом плазмидой из *E. coli* был разработан метод генетической модификации *Streptomyces fradiae* — построение искусственной бактериальной хромосомы. Хромосома была клонирована с помощью плазмидного вектора в *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces roseosporus*, в мутанты *Streptomyces fradiae* с подавленной функцией метилтрансферазы. Некоторые новые липопептиды были высокоактивны против стафилококков и пневмококков и не связывались с сывороткой крови [70, 71].

Осуществлялся модульный обмен на стадии нуклеиновых последовательностей, кодирующих межмодульные линкеры в гене двухмодульной субъединицы НРПС, которая включает в даптомицин 3-метил-глутаминовую кислоту (3-метGlu₁₂) и кинуренин (Kyn₁₃) в даптомицин. Гибридные субъединицы были получены фузией модуля 3мGlu₁₂ с концевыми модулями из НРПС антибиотиков CDA или A54145. Рекомбинанты образовывали с высоким выходом аналоги даптомицина, содержащие Trp₁₃ или Ile₁₃. Рекомбинант с гибридным модулем, содержащий дидомен из DKyn₁₃, продуцировал аналог даптомицина, включающий D-Asn₁₃ [45].

Генно-инженерными методами сконструирована надёжная биосинтетическая платформа для получения новых нерибосомальных антибиотиков в достаточных количествах для их дальнейшего исследования. Была применена γ Red рекомбинация, чтобы произвести замены одиночных или мультиплетных модулей в субъединице D_{pl}BC из НРПС для модификации циклической пептидной части антибиотика даптомицина. Комбинировали обмен модулей, НРПС-субъединиц, инактивировали 3-метилтрансферазу, природные варианты липидного остатка. В результате была создана библиотека новых липопептидов, некоторые из них были активны против грамположительных бактерий на уровне даптомицина. Один компонент был активнее даптомицина против *E. coli imp*, мутанта с большей проницаемостью внешней мембраны [72].

4. Нерибосомальный и рибосомальный пептидный синтез

Сравнительное рассмотрение нерибосомального и рибосомального пептидного синтеза с точки зрения образования пептидной связи показывает, что, несмотря на существенные различия, между ними есть и значительное сходство.

1. В обоих случаях биосинтез происходит в 4 этапа: инициация, узнавание аминокислоты и её активация, элонгация и терминация.

2. Источником энергии биосинтеза является АТФ (активация аминокислоты).

3. Пептидная цепь растёт с N-конца к C-концу продукта.

4. Первичная структура синтезируемого пептида определяется кодом — генетическим кодом в рибосомальном биосинтезе, нерибосомальным кодом в нерибосомальном биосинтезе [13, 14, 24].

5. Оба кода имеют вырожденный характер: одна и та же аминокислота (некоторые аминокислоты) может кодироваться несколькими кодонами, один кодон может кодировать несколько аминокислот [26].

6. В обоих случаях непосредственное образование пептидной связи (элонгация) происходит в результате химической реакции нуклеофильного замещения [26] между C-концевой группой растущего пептида и свободной аминной группой последующей активированной аминокислоты. Реакция катализируется пептидилтрансферазой при рибосомальном биосинтезе и конденсационным доменом C при нерибосомальном.

Биологический смысл каждого из четырёх этапов аналогичен один другому, но осуществляются этапы разными инструментами. Это обусловлено тем, что последовательность аминокислотных остатков задается принципиально разными кодами. Генетический код биосинтеза белка основан на комплементарности нуклеиновых оснований и аминокислот и в взаимодействии белок — нуклеиновая кислота.

Последовательность аминокислотных остатков в нерибосомальном биосинтезе пептидов определяется последовательностью аминокислотных остатков самих синтетаз, которые, в свою очередь, являются продуктами трансляции соответствующих генов [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hancock R. E. W., Chapple D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 6: 1317—1323.
2. Grünwald Y., Marahiel M. A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Revs* 2006; 70: 1: 121—146.
3. Strieker M., Marahiel M. A. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *Chem Biochem* 2009; 10: 4: 607—616.
4. Булгакова В. Г., Орлова Т. И., Полин А. Н. Устойчивость актиномицетов — продуцентов к собственным антибиотикам. *Антибиотики и химиотер* 2010; 55: 1—2: 42—49.
5. Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. I. Нерибосомальные антибиотики полипептиды. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 3—4: 57—68.
6. Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. II. Нерибосомальные пептиды различного биологического действия. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 11—12.
7. Stein T., Vater J., Krufi V. et al. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* 1996; 271: 26: 15428—435.

При рибосомальном биосинтезе мРНК, связанная с рибосомой, содержит информацию о последовательности аминокислотных остатков в виде триплетов нуклеотидов, которые являются антикодонами для аминоацил-т-РНК (для каждой аминокислоты свой антикодон). Происходит перевод с «языка нуклеотидов» на «язык аминокислот».

При нерибосомальном биосинтезе 10 значимых аминокислотных остатков «кармана» представляют собой аналог кодона. Антикодоном в данном случае являются свободные субстратные аминокислоты, поступившие в «карман» и (в соответствии с их структурой и структурой значимых аминокислот) задерживаются в нём, активируются и переносятся белком-переносчиком к месту образования пептидной связи.

Таким образом, в отличие от рибосомального биосинтеза при нерибосомальном не требуются молекулярные адапторы (аминоацил-т-РНК), поскольку процесс происходит на «языке аминокислот».

Конечными продуктами рибосомального биосинтеза являются белки, которые играют первостепенную роль в структурах и функциях клетки.

Молекулярная масса белков колеблется в пределах 6000—1000000. Белки представляют собой молекулярный инструмент, с помощью которого реализуется генетическая информация.

Конечными продуктами нерибосомального пептидного синтеза являются пептиды достаточно невысокого молекулярного веса, часто циклические структуры. В состав пептидов входят кроме «белковых» и «небелковые» аминокислоты, а также непептидные фрагменты. Все это способствует разнообразию синтезируемых структур. Эти продукты считаются вторичными метаболитами. Их роль в жизнедеятельности самого микроорганизма-продуцента недостаточно ясна, но их участие в экологии и коммуникационных взаимодействиях весьма вероятно.

Однако два представленные типа биосинтеза пептидных соединений не являются альтернативными.

8. Lipmann F., Gevers W., Kleinkauf H. et al. The enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv Enzimol* 1971; 35: 1–34.
9. Laland S. G., Zimmer T. L. The protein thiotemplate of mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by *Bacillus brevis*. *Essays Biochem* 1973; 9: 31–57.
10. Karahashi K. Biosynthesis of small peptides. *Annu Rev Biochem* 1974; 43: 445–459.
11. Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M. A., Brick P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* 1997; 16: 4174–4183.
12. Lautru S., Challis G. L. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* 2004; 150: 6: 1629–1636.
13. Hahn M., Stachelhaus T. Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 44: 15585–15590.
14. Stachelhaus T., Mootz H. D., Marahiel M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 1999; 6: 8: 493–505.
15. Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-C. et al. Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. *J Biol Chem* 2007; 282: 8: 5608–5621.
16. Chiochini C., Linne U., Stachelhaus T. In vivo biocombinatorial synthesis of lipopeptides by COM domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex. *Chem Biol* 2006; 13: 8: 899–908.
17. Stachelhaus T., Mootz H. D., Bergendahl V., Marahiel M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 35: 22773–22781.
18. Kraas F. I., Helmetag V., Wittmann M. et al. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* 2010; 17: 8: 872–880.
19. Lee T. V., Johnson L. J., Johnson R. D. et al. Structure of eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J Biol Chem* 2009; 285: 4: 2415–2431.
20. Li J., Jensen S. E. Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. *Chem Biol* 2008; 15: 2: 118–127.
21. Tang G.-L., Cheng Y.-Q., Shen B. Chain initiation in the leinamycin-producing hybrid nonribosomal peptide/polyketide synthetase from *Streptomyces atroolivaceus* S-140. Discrete, monofunctional adenylation enzyme and peptidyl carrier protein that directly load D-alanine. *J Biol Chem* 2007; 282: 28: 20273–20285.
22. Conti E., Franks N. P., Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throw light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 1996; 4: 287–298.
23. Li L., Deng W., Song J. et al. Characterization of the saframycin A gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *J Bacteriol* 2008; 190: 1: 251–263.
24. von Döhren H., Dieckmann R., Pavela-Vrancic M. The nonribosomal code. *Chem Biol* 1999; 6: R273–R279.
25. Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., Kleinkauf H., von Döhren H. Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase. *J Mol Biol* 1999; 288: 129–140.
26. Challis G. L., Ravel J., Tompsend C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* 2000; 7: 3: 211–224.
27. Belshaw P., Walsh C. T., Stachelhaus T. Aminoacyl-CoAs as a probe of condensation domain selectivity in nonribosomal synthesis. *Science* 1999; 284: 486–489.
28. Balibar C. J., Vallancourt F. H., Walsh C. T. Generation of D amino acid residues in arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol* 2005; 12: 11: 1189–1200.
29. Schneider T. L., Shen B., Walsh C. T. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry* 2003; 42: 32: 9722–9730.
30. Kessler N., Schuhmann H., Mornweg S. et al. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* 2004; 279: 9: 7413–7419.
31. Duitman E. H., Hamoen L. W., Rembold M. et al. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Nat Acad Sci* 1999; 96: 23: 13294–13299.
32. Trauger J. W., Kohli R. M., Walsh C. T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 2001; 40: 24: 7092–7098.
33. Robbel L., Hoyer K. M., Marahiel M. A. TioS-T-TE — a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodopsipeptides. *FEBS J* 2009; 276: 6: 1641–1653.
34. Hoyer K. M., Mahiert C., Marahiel M. A. The iterative gramicidin S thioesterase catalyzed peptide ligation and cyclization. *Chem Biol* 2006; 14: 1: 13–22.
35. Tseng C. C., Bruner S. D., Kohli R. M. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*. 2002; 41: 45: 13350–13359.
36. Kato H., Tsuji K., Harada K. Microbial degradation of cyclic peptides produced by bacteria. *Microbial degradation of cyclic peptides*. *J Antibiot* 2009; 62: 4: 181–190.
37. Ridley C. P., Lee H. Y., Khosla C. Evolution of polyketide synthases in bacteria. *PNAS* 2007; 105: 12: 4595–4600.
38. Tsuge K., Inoue S., Ano T. et al. Horizontal transfer of iturin A operon, itu, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 11: 4541–4648.
39. Lawrence D. P., Kroken S., Pryor B. M., Arnold A. E. Interkingdom gene transfer of a hybrid NPS/PKS from bacteria to filamentous *Ascomycota*. *PLoS One* 2011; 6: 11: e28231.
40. Шестаков С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий. *Экологическая генетика* 2007; 5: 2: 12–24.
41. Walsh C. T. Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chem BioChem* 2002; 3: 2–3: 124–134.
42. Du L., Shen B. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4: 2: 215–228.
43. Shen B., Du L., Sanchez C. et al. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001; 27: 6: 378–385.
44. Shen B., Du L., Sanchez C. et al. Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *J Nat Prod* 2002; 65: 3: 422–431.
45. Doekel S., Coëffet-LeGal M.-F., Gu J.-Q. et al. Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus*. *Microbiology* 2008; 154: 9: 2872–2880.
46. Miao V., Coëffet-LeGal M.-F., Brian P. et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* 2005; 151: 5: 1507–1523.
47. Müller C., Nolden S., Gabhardt P. et al. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic friulimycin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3: 1028–1037.
48. Guenzi E., Galli G., Grgurina I. et al. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* 1998; 273: 49: 32857–32863.
49. Zhang J. H., Quigley N. B., Gross D. C. Analysis of the syrB and syrC genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J Bacteriol* 1995; 177: 14: 4009–4020.
50. Kaysser L., Tang X., Wemakor E. et al. Identification of a napsamycin biosynthesis gene cluster by genome mining. *Chem BioChem* 2011; 12: 477–487.
51. Cheng Y.-Q., Yang M., Matter A. M. Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No.968. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 11: 3460–3469.
52. Wesener S. R., Potharia V. Y., Cheng Y.-Q. Reconstitution of the FK228 biosynthetic pathway reveals cross talk between modular polyketide synthases and fatty acid synthase. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 4: 1501–1507.
53. Cheng Y.-Q., Tang G.-L., Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam

- leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. J Bact 2002; 184: 24: 7013—7024.
54. Tang G-L., Cheng Y-Q., Shen B. Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. Chem Biol 2004; 11: 1: 33—45.
55. Katz E., Weissbach H. Biosynthesis of the actinomycin chromophore. Enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxy-antranilic acid to actinocin. J Biol Chem 1962; 237: 882—886.
56. Keller U., Lang M., Crnovcic I. et al. The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. J Bacteriol 2010; 192: 10: 2583—2595.
57. Foster I. J. W., Katz E. Control of actinomycin D biosynthesis in *Streptomyces parvulus*: regulation of tryptophan oxygenase activity. J Bacteriol 1981; 148: 3: 670—677.
58. Perlman D., Otani S., Perlman K., Walker V. 7-Hydroxy-4-methyl-kynurenin as an intermediate in actinomycin biosynthesis. J Antibiot 1973; 26: 5: 289—296.
59. Schmidt-Kastner G. Über neue biosynthetische actinomycine. Medizin und chemie 1956; 5: 463—476.
60. Егоров Н. С., Силаев А. Б., Камруха Г. С. и др. Антибиотики-полипептиды. 1987; 159—204.
61. Шапошников В. Н., Нефелова М. В., Орлова Т. И. и др. Образование новых фракций аурантина и изучение их химических и биологических свойств. ДАН 1962; 147: 6: 1476—1479.
62. Соколов Ю. Н., Кучкарев Р. Н. Отчет о результатах кооперированного клинического изучения нового противоракового антибиотика актинолевалина (Ау₇) В кн. Химиотерапия опухолей в СССР. 1972; 15—16: 105—113.
63. Mason K., Katz E., Mauger A. Studies on the biological activities of actinomycins Z₁ and Z₅. Arch Biochem Biophys 1974; 160: 2: 402—411.
64. Arai T., Yazawa K., Takahashi K. et al. Directed biosynthesis of new saframycin derivatives with resting cells of *Streptomyces lavendulae*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 1: 5—11.
65. Eppelmann K., Doekel S., Marahiel M. A. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 2001; 276: 37: 34824—34831.
66. Gruenewald S., Mootz H. O., Stehmetz P., Stachelhaus T. In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6: 3282—3291.
67. de Ferra F., Rodrigues F., Tortora O. et al. Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. J Biol Chem 1997; 272: 40: 25304—25309.
68. Grünwald J., Sieber S. A., Mahlert C. et al. Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics. J Amer Chem Soc 2004; 126: 51: 17025—17031.
69. Grünwald J., Sieber S. A., Marahiel M. A. Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. Biochemistry 2004; 43: 10: 2915—2925.
70. Alexander D. C., Rock J., He X. et al. Development of a genetic system for combinatorial biosynthesis of lipopeptides in *Streptomyces fradiae* and heterologous expression of the A54145 biosynthesis gene cluster. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 20: 6877—6887.
71. Nguyen K. T., He X., Alexander D. C. et al. Genetically engineered lipopeptide antibiotics related to A54145 and daptomycin with improved properties. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4: 1404—1413.
72. Nguyen K. T., Ritz D., Gu J-Q. et al. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. PNAS 2006; 103: 46: 17462—17467.