



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Analysis of the angucycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. QL37 and implications for lugdunomycin production

Heul, H.U. van der

Citation

Heul, H. U. van der. (2022, December 21). *Analysis of the angucycline biosynthetic gene cluster in Streptomyces sp. QL37 and implications for lugdunomycin production*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3503629>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3503629>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Nederlandse Samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De toename van resistentie, zoals antibioticaresistente pathogene bacteriën en chemotherapie-resistente tumorcellen, vraagt om nieuwe aanknopingspunten voor de ontdekking van nieuwe medicijnen (Wright, 2017, Huang *et al.*, 2021). Streptomyceten zijn een rijke bron van secundaire metabolieten met een ruime chemische diversiteit en veelal met een geneeskrachtige werking (Baltz, 2008). Deze filamenteuze bodembacteriën zijn verantwoordelijk voor de productie van bijna de helft van alle in de kliniek gebruikte antibiotica, als ook van secundaire metabolieten die voor andere medische, biotechnologische en landbouwdoeleinden worden gebruikt (Berdy, 2005, Hopwood, 2007). Vooruitgang op het gebied van "genome mining" strategieën heeft aangetoond dat de genomen van streptomyceten veel meer biosynthetische genclusters (BGC's) voor secundaire metabolieten bevatten dan eerder gedacht, waarvan vele niet tot expressie komen onder standaard laboratoriumomstandigheden (Bentley *et al.*, 2002, Medema *et al.*, 2011). Specifieke signalen of "elicitors" zijn nodig om de expressie van deze BGCs te activeren (van Bergeijk *et al.*, 2020). Zoals besproken in **hoofdstuk 2** worden signalen vanuit de omgeving opgevangen en doorgegeven door een complex regulatie systeem in de streptomyceet. Dit systeem reguleert de groei, het primaire metabolisme en de productie van secundaire metabolieten (van der Heul *et al.*, 2018).

Angucyclines zijn chemische verbindingen die bekend staan om hun antibacteriële en anti-tumor activiteit. Deze groep moleculen behoort tot een van de grootste familie van secundaire metabolieten: de polyketiden. Veel van deze moleculen zijn klinisch relevant als antibioticum of als chemotherapie, zoals oxytetracycline en doxorubicin (Tibrewal & Tang, 2014). Streptomyceten hebben verschillende polyketide synthasen (PKS) die behoren tot de klassen PKS I, PKS II, of PKS III. Deze enzymen creëren verschillende structuren van kleine koolstofverbindingen. De gevormde structuur wordt dan verder gemodificeerd door post-PKS modificatie enzymen zoals oxygenases, methyltransferases en glycosidases (Tibrewal & Tang, 2014). Het angucycline-skelet, gekenmerkt door zijn typische benzo[a]antracene-structuur, wordt opgebouwd van 1 acetyl-CoA en 9 malonyl-CoA moleculen door een enzymgroep genaamd de minimale "type II polyketide synthase" (PKS II). Het angucycline-skelet wordt vervolgens gemodificeerd door post-PKS-enzymen hetgeen leidt tot een breed scala aan chemische verbindingen (Kharel *et al.*, 2012).

De biosynthese van verschillende angucyclines is uitgebreid bestudeerd, zoals die van gaudimycine, urdamycine en landomycine (Kharel *et al.*, 2012). Vooral het openen van één van de aromatische ringen in het angucycline-skelet zorgt voor een drastische structurele diversificatie. Mooie voorbeelden zijn de jadomycines, kinamycines en gilvocarcines, welke zijn afgeleid van een typisch angucycline tussenproduct waarvan de B-ring is gesplitst door een monooxygenase (Fan & Zhang, 2018).

De ontdekking van lugdunomycine binnen de familie van angucyclines laat zien dat zelfs in een bekende moleculaire familie een totaal nieuwe structuur kan worden gevonden. Lugdunomycine, geproduceerd door *Streptomyces* sp. QL37, wordt gekenmerkt door een uniek benzaza[4,3,3]propellaan-6-spiro-2'-2H-nafto[1,8-bc]furan-skelet en vertegenwoordigt een nieuwe subklasse van polyketiden (Wu *et al.*, 2019). De voorspelde biosyntheseroute bevat een Baeyer-Villiger oxidatieve splitsing, expansie van de C-ring, gevolgd door een Diels-Alder reactie tussen een C-ring-gesplitste angucycline als diene en *iso*-maleimycine als dienofiel. Hoewel sinds de identificatie van lugdunomycine veel verschillende C-ring-gesplitste angucyclines zijn ontdekt, is het reactiemechanisme voor de opening van het angucycline-quinone gedeelte (de C-ring) onbekend. Lugdunomycine biedt dus veel mogelijkheden voor de ontdekking van nieuwe organische chemie en van enzymen die kunnen worden toegepast in de combinatoire (bio)synthese van nieuwe secundaire metabolieten of de ontdekking van nieuwe BGC's (Mikhaylov *et al.*, 2021). Lugdunomycine heeft antibacteriële activiteit tegen Gram-positieve bacteriën (Wu *et al.*, 2019). Het molecuul wordt in zeer kleine hoeveelheden geproduceerd door *Streptomyces* sp. QL37; slechts 0,5 mg van het molecuul kon worden verkregen uit 7,5 Liter agar, wat de mogelijkheid om farmacologische en farmacokinetische testen te doen beperkt (Wu *et al.*, 2019).

In dit proefschrift is een fundamentele benadering toegepast om kennis te verkrijgen over de biochemische reacties en de regulatie van de lugdunomycinebiosynthese, door middel van een combinatie van bioinformatische analyse, gen-deletie-experimenten, heterologe expressie, metabolomics, proteomics en transcriptomics. Dit heeft geleid tot een beter begrip van de enzymen die door het *lug* gencluster worden gecodeerd, de regulatie ervan en de biosynthese van lugdunomycine. Een mogelijk toepassing is het verbeteren van de opbrengst van lugdunomycine en het verder uitbreiden van de chemische diversiteit van angucyclines in het algemeen.

Karakterisering van het *lug* gencluster

Angucyclines worden gesynthetiseerd door een type II polyketide synthase (PKS). Analyse van het *Streptomyces* sp. QL37 genoom met behulp van anti-SMASH (Medema *et al.*, 2011) leidde tot de identificatie van een polyketide type II-gencluster (genaamd *lug*) wat sterk lijkt op de BGC voor kiamycine, een angucycline geproduceerd door *Streptomyces* sp. W007 (Zhang *et al.*, 2012, Cao *et al.*, 2021, Kibret *et al.*, 2018). De genen *lugA-Oll*, waaronder *lugA-C* die coderen voor de zogenaamde minimale PKS-enzymen die nodig zijn voor de productie van het angucycline-skelet (KS α , KS β en ACP), werden uitgeschakeld en het metabolische profiel werd vergeleken met dat van de wild-type stam (Wu *et al.*, 2019). Deze *lug-pks* mutant produceerde geen angucyclines en lugdunomycine, wat bevestigt dat dit gencluster inderdaad nodig is voor de productie van deze moleculen (**Hoofdstuk 3**).

Voor een volledige transcriptie-analyse werd RNA-sequencing toegepast op RNA geïsoleerd uit *Streptomyces* sp. QL37, welke 24, 36, 48 of 60 uur was gegroeid op lugdunomycine-productiemedium. Hieruit bleek dat de genen *lugRI-lugOV* op een zeer vergelijkbare manier zijn gereguleerd, wat suggereert dat deze genen zeer waarschijnlijk deel uitmaken van één gencluster. Volgens deze gegevens omvat het *lug* gencluster daarom 27 genen, waaronder genen die coderen voor de minimale PKS, vijf oxygenases en vijf regulator eiwitten.

Om de omvang van het *lug* gencluster verder te verifiëren en om andere mogelijke lugdunomycine producenten te vinden, werd een verzameling van meer dan 1000 genomen van *Streptomyces*- en *Kitasatospora*-stammen onderzocht op de aanwezigheid van angucycline BGC's. Ongeveer 25% van deze stammen bevatten de minimale PKS die kenmerkend is voor de angucycline BGC's, hetgeen suggereert dat angucyclineproductie wijdverspreid is. We identificeerden 36 stammen (waaronder *Streptomyces* sp. QL37 zelf) die angucycline BGC's hadden, waarbij 18 of meer genen gedeeld waren met het *lug* gencluster. Vergelijking van BGC's die zeer sterk lijken op het *lug* gencluster wees uit dat 28 genen voorkomen in meerdere BGC's, hetgeen dicht in de buurt komt van wat werd voorspeld met behulp van RNA-sequencing data. Op basis van de bioinformatica data in combinatie met de RNA-sequencing data concluderen wij dat het *lug* gencluster 28 genen omvat. Mogelijk wordt de expressie van *lugM* anders gereguleerd dan

die van *lugRI-lugOV*, wat resulteert in verschillende expressielevels voor dit ene gen ten opzichte van de andere 27 genen.

Van de 35 angucycline BGC's bevatte er slechts één een ortholoog van de *lugRI* regulator, namelijk het BGC in het genoom van *Streptomyces* sp. 94 (Hulcr *et al.*, 2011). Anderzijds ontbraken in alle stammen homologen van *lugX* en *lugK*. Geen enkele stam had een homoloog van *lugX*, zelfs niet buiten de geïdentificeerde angucycline BGCs en dit gen werd zelfs überhaupt niet in de NCBI database gevonden. Het is daarom onduidelijk of dit gen een functioneel eiwit codeert en zo ja, wat de functie ervan is. Echter, aangezien *lugX* transcripten werden gedetecteerd, nemen we aan dat het geen pseudogen is. Homologen van *lugK*, dat codeert voor een fosfopantetheinyltransferase (PPTase) dat in meerdere biosyntheseroutes kan worden gebruikt (Bunet *et al.*, 2014), werden elders in het genoom van 28 van de 35 stammen aangetroffen.

Er werd een fylogenetische boom gegenereerd op basis van huishoud genen van 1020 *Streptomyces* en *Kitasatospora* stammen. Hieruit bleek dat stammen die een *lug* gencluster bevatten over de hele fylogenetische boom zijn verspreid en dat het *lug* gencluster dus niet aan de fylogenie is gerelateerd. Stammen die nauw verwant zijn aan *Streptomyces* sp. QL37, zoals *Streptomyces* sp. LamerLS-316 en *S. atroolivaceus* ISP5137 bevatten het *lug* gencluster niet. Vergelijking van het *lug* gencluster met 27 goed gekarakteriseerde angucycline BGC's die nodig zijn voor de productie van typische, A-ring- of B-ring-gesplitste angucyclines, toonde aan dat er in totaal acht genen specifiek zijn voor de *lug*(-type) genclusters ofwel genclusters die verantwoordelijk zijn voor de productie van C-ring-gesplitste moleculen. Deze omvatten regulatie-genen *lugRI-lugRIII* en *lugRV*, de oxygenase-genen *lugOIII* en *lugOIV* en het transporter gen *lugTI* (**Hoofdstuk 3**). De genen *lugOIII* en *lugOV* zijn waarschijnlijk nodig voor de C-ring splitsing (zie hieronder). Hoewel genen konden worden aangewezen die *lug*-genclusters onderscheiden van typische en B-ring-gesplitste angucycline BGC's, bleef de vraag wat er zo bijzonder is aan het *lug* gencluster dat het verantwoordelijk is voor de productie van zo'n complex molecuul. Heterologe expressie van het *lug* gencluster en flankerende gebieden in de heterolge productie stam *Streptomyces coelicolor* M1152 resulteerde in de productie van C-ring-gesplitste en typische angucyclines, maar niet van lugdunomycine (**Hoofdstuk 4**). Dit wees erop dat het *lug* gencluster een angucycline gencluster is dat verantwoordelijk is voor de productie van typische

en C-ring-gesplitste angucyclines. De vraag blijft daarom welke andere genen er nodig zijn voor de biosynthese van lugdunomycine.

Een tweede gencluster is nodig voor de laatste stappen van de biosynthese van lugdunomycine

Lugdunomycine productie vereist twee substraten: een C-ring-gesplitste angucycline en *iso*-maleimycine. Aanvankelijk dachten we dat *iso*-maleimycine zou kunnen worden afgeleid van de limamycines, omdat er geen genen aanwezig zijn die het anders zouden kunnen verklaren (Wu *et al.*, 2019). Echter, dit wordt tegengesproken door experimenten die laten zien dat *iso*-maleimycine ook wordt geproduceerd door mutanten die geen angucyclines kunnen maken (Uiterweerd, 2020). Dit suggereerde dat *iso*-maleimycine niet kan zijn afgeleid van de limamycines. Uit de RNA-sequencing data bleek dat het *lug* gencluster samen met onder andere BGC23 tot expressie kwam. Dit BGC bevat genen die betrokken zijn bij de biosynthese van β -lactone en codeert voor een "amino-group-carrier" eiwit (BGC23a) en biosynthese van γ -butyrolactones (BGC23b) (Wolf *et al.*, 2017a, Robinson *et al.*, 2019, Matsuda *et al.*, 2017). Een "amino-group-carrier"-eiwit is betrokken bij de biosynthese van maleimycine, een molecuul dat wordt geproduceerd door *S. showdoensis* ATCC 15227 (Makato, 2012-2017, Prima *et al.*, 2017, Matsuda *et al.*, 2017, Elstner *et al.*, 1973). BGC23 en het BGC voor maleimycine lijken sterk op elkaar, wat sterk suggereert dat dit cluster verantwoordelijk is voor de productie van *iso*-maleimycine. Zo'n soort BGC ontbreekt in *S. coelicolor*, hetgeen zeer waarschijnlijk verklaart waarom de heterologe gastheer *S. coelicolor* M1152 met het *lug* gencluster wel angucyclines en limamycines maar geen lugdunomycine produceert (**Hoofdstuk 4**).

De rol van de oxygenase-genen van het *lug* gencluster bij de biosynthese van lugdunomycine

Een van de belangrijkste reacties bij de productie van lugdunomycine is de splitsing van de C-ring in de angucycline, die nodig is om zowel C-ring-gesplitste angucyclines als lugdunomycine te genereren en die waarschijnlijk wordt gekatalyseerd door een Baeyer-Villiger oxidatie (Wu *et al.*, 2019). Het *lug* gencluster codeert voor vijf mogelijke oxygenases, namelijk *lugOI*–*lugOV* en hun functie in de productie van lugdunomycine werd bestudeerd door mutagenese en analyse van het metaboolom (**Hoofdstuk 5**).

De aanwezigheid van een reeks oxygenasegenen met verschillende functies in angucycline BGC's is belangrijk voor de diversificatie van de angucyclines die worden geproduceerd (Fan & Zhang, 2018). Orthologen van LugOI en LugOII, zoals PgaE en PgaM, zijn belangrijk voor de diversificatie van typische angucyclines (Patrikainen *et al.*, 2012, Fan & Zhang, 2018). Deletie van *lugOI* of *lugOII* resulteerde in mutanten die de meeste typische angucyclines niet produceerden. Bovendien produceren deze mutanten noch de C-ring-gesplitste angucyclines noch lugdunomycine zelf. Deze genen zijn dus waarschijnlijk betrokken bij de vroege post-PKS modificaties. Deze resultaten komen overeen met de bekende functie van de homologen van LugOI (PgaE, UrdE, LanE) en LugOII (PgaM, UrdM, LanV), die betrokken zijn bij de biosynthese van respectievelijk gaudimycine, urdamycine en landomycine (Kharel & Rohr, 2012, Mayer *et al.*, 2005). Functionele analyse toonde aan dat LugOII een C6 ketoreductie katalyseert, vergelijkbaar met andere LugOII-achtige enzymen. Interessant is dat eerdere *in vitro* experimenten lieten zien dat LugOII ook een C1 ketoreductie kan katalyseren, wat nog niet eerder voor LugOII-homologen is gerapporteerd (Xiao *et al.*, 2020). Het uitschakelen van *lugOIV* had geen significante invloed op de biosynthese van angucyclines. Of dit gen een rol speelt in de biosynthese van lugdunomycine – en zo ja, welke – is vooralsnog onbekend.

LugOIII en LugOV vertonen weinig gelijkenis met andere mono-oxygenases die bekend zijn van de biosynthese van secundaire metabolieten. De *lugOIII*- en de *lugOV*-mutanten produceren standaard angucyclines, maar niet de C-ring-gesplitsten. Deze resultaten suggereren dat deze enzymen mogelijk betrokken kunnen zijn bij de splitsing van de C-ring. Interessant is dat analyse van het moleculaire netwerk van de *lugO* mutanten een waarschijnlijke hiërarchie tussen LugOIII en LugOV aan het licht bracht, waarbij LugOIII de productie van een angucycline-epoxide katalyseert dat door LugOV wordt gebruikt voor de daaropvolgende Baeyer-Villiger oxidatiereactie, resulterend in de C-ring splitsing van angucyclines. Inderdaad zijn TacS en TacT, orthologen van respectievelijk LugOIII en LugOV, nodig voor de productie van C-ring-gesplitste angucyclines door *Streptomyces* sp. CB00072 (Cao *et al.*, 2021). Al met al legt deze studie de basis voor het genereren van nieuwe C-ring-gesplitste angucyclines met behulp van combinatoire biosynthese. *In vitro* testen met de gezuiverde oxygenases kunnen verder inzicht geven in de functionele rol van de oxygenases gecodeerd door het *lug* gencluster.

Nader inzicht in de regulatie van het *lug* gencluster

Streptomyceten bevatten tot wel 1000 verschillende transcriptiefactoren, die een enorm complex systeem vormen dat hen in staat stelt te reageren op de kakofonie van signalen die ze uit de omgeving ontvangen. Op deze manier komen reacties in gang die aangepast zijn aan de natuurlijke omgeving, waaronder groei en de productie van secundaire metabolieten. Studie van de regulatie van het *lug* gencluster zou inzicht kunnen geven in de rol van lugdunomycine in de natuurlijke omgeving van *Streptomyces* sp. QL37 en waarom het nauwelijks in het laboratorium wordt geproduceerd (van Bergeijk *et al.*, 2020). De expressie van BGC's wordt gecontroleerd door zowel pleiotrope als clustergerichte regulatoren (Liu *et al.*, 2013). In deze studie werden de cluster-gesitueerde regulatoren (CSRs) gecodeerd door het *lug* gencluster bestudeerd.

Uit een mutatiestudie bleek dat LugRII (LuxR-type), LugRIV (atypische response regulator) en LugRV (SARP-regulator) nodig zijn voor de angucyclineproductie in *Streptomyces* sp. QL37 en dus ook voor de productie van lugdunomycine, terwijl LugRIII (TetR-regulator) slechts een ondergeschikte rol speelt in de regulatie van het *lug* gencluster. Overexpressie van LugRIV of LugRV leidde tot een verhoogde angucyclineproductie in vergelijking met het wildtype in vroege groeistadia en – belangrijk – overexpressie van *lugRV* leidde tot een verbeterde lugdunomycine productie. Op basis van deze resultaten werd de rol van LugRIV en LugRV verder onderzocht. De rol van LugRIV en LugRV als transcriptie-activatoren werd verder gevalideerd door kwantitatieve proteomics, waaruit bleek dat de expressie van de Lug-eiwitten afhankelijk was van LugRIV of LugRV. Opmerkelijk was dat in latere groeistadia de expressie van LugRV de productie van de angucyclines verhoogde, maar niet die van lugdunomycine zelf (**Hoofdstuk 6**). Dit wordt zeer waarschijnlijk verklaard door het feit dat lugdunomycinebiosynthese naast een afgeleide van angucyclines zelf ook *iso*-maleimycine nodig heeft (Wu *et al.*, 2019, Uiterweerd, 2020). Daarom moet ook de expressie van BGC23 worden verhoogd.

Regulatoren die specifiek zijn voor de controle van een bepaald gencluster werken vaak hiërarchisch, waarbij de ene de andere activeert; tegelijk kan de activiteit van de regulatoren worden beïnvloed door moleculen die tijdens de biosynthese worden geproduceerd (van der Heul *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2009). Deze twee aspecten leiden tot (meerdere) feedback en/of feedforward loops, waarbij nog geen rekening is gehouden met pleiotrope regulatoren die een meer algemeen rol

spelen. Voorbeelden van zulke complexe regulatoire netwerken zijn die van de auricine- en jadomycine BGC's van respectievelijk *S. aureofaciens* CCM 3239 en *S. venezuelae* ISP5230 (Kormanec *et al.*, 2014, Zou *et al.*, 2014). Kruis-complementatie van de mutanten suggereerde dat de responsregulator LugRIV de expressie van de SARP-regulator LugRV activeert, die op zijn beurt de expressie van de structurele *lug* genen controleert (**Hoofdstuk 6**). Verder moleculair biologisch onderzoek, zoals DNA-bindingsexperimenten en uitgebreide transcriptie-analyse, moet meer inzicht verschaffen in het precieze regulatienetwerk van het *lug* gencluster.

Chemische diversiteit van het secundaire metabool van *Streptomyces* sp. QL37

Met 35 voorspelde BGC's in zijn genoom heeft *Streptomyces* sp. QL37 het vermogen om een overvloed aan andere secundaire metabolieten dan angucyclines en *iso*-maleimycine te produceren. Onder de in deze studie geteste condities bleek het wildtype ook γ -butyrolactonen (geproduceerd door BGC16, BGC23 en BGC33), tetramaat macrolactams (geproduceerd door BGC6) en sceliphrolactam (geproduceerd door BGC9) te produceren (Yang *et al.*, 2005, Moree *et al.*, 2014, Low *et al.*, 2018) (**Hoofdstuk 4**). Bovendien werden enkele moleculaire families die geen verband hielden met angucyclines gedetecteerd in sommige van de *lugO* deletie mutanten. Op MM agar werden moleculen gerelateerd aan *N*-acyl glutamine en aminoalcoholen gedetecteerd, met name in *lugOI*, *lugOII* en *lugOIII* deletiemutanten (Battista *et al.*, 2019, Won *et al.*, 2014, Harrison *et al.*, 2018). Op R5 agar werd een nieuwe lipopeptide gedetecteerd in extracten afkomstig van de *lugOI* mutant (mogelijk geproduceerd door BGC21) (**Hoofdstuk 5**). Uit verschillende studies is al gebleken dat beïnvloeding van de productieniveaus van secundaire metabolieten die overvloedig door de gastheer worden geproduceerd, kan leiden tot aanzienlijke wijzigingen in de productie van ongerelateerde metabolieten (Iorio *et al.*, 2021, Culp *et al.*, 2019). Uitschakelen van de BGC's voor de antibiotica streptomycine en streptothricine leidde daarbij tot de productie van niet eerder waargenomen secundaire metabolieten (Culp *et al.*, 2019). Bovendien leidde het blokkeren van verschillende stappen in de pseudouridimycine (PUM)-route in *Streptomyces* sp. ID38640 tot de productie van nieuwe metabolieten van andere metabole routes. Het verstoren van de expressie van het ene gencluster kan dus een ander gencluster aanzetten, wat een mogelijke strategie is om nieuwe antibiotica te ontdekken (Iorio *et al.*, 2021).

Morfologische veranderingen geassocieerd met angucyclineproductie

Productie van angucyclines verstoort de groei en blokkeert de ontwikkeling, waarschijnlijk door cytotoxiciteit als gevolg van hun DNA-afbrekende eigenschappen (Kharel *et al.*, 2012). In overeenstemming daarmee werden grote verschillen waargenomen in morfologische differentiatie tussen de wild-type stam enerzijds en angucycline mutanten ($\Delta lug-pks$, $\Delta lugRII$, $\Delta lugRIV$ en $\Delta lugRV$) anderzijds, met name op R5 agar (**Hoofdstuk 6**). De stammen die geen angucyclines produceerden ontwikkelden zich goed, terwijl de angucycline-producerende stammen, waaronder het wild-type, geremd werden in hun ontwikkeling, wat resulteerde in een blokkade van de sporulatie. Eerder bleek al dat de DNA-beschadigende prodiginines, geproduceerd door *S. coelicolor*, de sporulatie van de stam op rijke media remmen. De *redD* mutant van *S. coelicolor*, die deze moleculen niet kan produceren, vertoonde een vroegtijdige morfologische differentiatie op R2YE-agarplaten in vergelijking met het wild-type (Tenconi *et al.*, 2020). Prodiginines bevorderen de celdood in het vegetatieve mycelium, waardoor de ontwikkeling van de bacterie wordt uitgesteld totdat er zoveel biomassa is afgebroken dat er voldoende voedingsstoffen zijn om de volgende fase van de levenscyclus te doorlopen (Tenconi & Rigali, 2018). Angucyclines kunnen door hun DNA-beschadigende eigenschappen een soortgelijke rol spelen bij de controle van celdood en ontwikkeling.

Slotopmerkingen en toekomstperspectieven

Deze studie verschaft nieuwe inzichten in de biosynthese en regulatie van angucyclines en de sterk gemodificeerde angucycline, lugdunomycine. Deze nieuwe inzichten kunnen worden toegepast om de productie van lugdunomycine door *Streptomyces* sp. QL37 te verhogen met het doel om grotere hoeveelheden lugdunomycine te isoleren en het werkingsmechanisme ervan en dat van verwante moleculen te bepalen. Het *lug* gencluster bestaat waarschijnlijk uit 28 genen, waaronder de genen voor de minimale PKS, voor vijf oxygenases en vijf regulatoren. Oxygenases *LugOIII* en *LugOV* katalyseren waarschijnlijk de cruciale C-ring splitsing, één van de sleutelreacties tijdens de biosynthese van lugdunomycine. Een angucycline-epoxide is mogelijk het substraat voor de C-ring splitsing. Streptomyceten met angucycline BGC's die homologen van *lugOIII* en/of *lugOV* bevatten, produceren waarschijnlijk een diversiteit aan C-ring-gesplitste angucyclines en misschien ook lugdunomycine. De laatste reactie in de lugdunomycine-route vereist waarschijnlijk twee BGC's, één die het diene

(angucycline) produceert en de andere die het dienofiel (*iso*-maleimycine) van een Diels-Alder reactie produceert. Deze Diels-Alder reactie is waarschijnlijk spontaan, een conclusie die we baseren op het feit dat *Streptomyces* sp. QL37 een racemisch mengsel van lugdunomycine produceert (Wu *et al.*, 2019).

Een belangrijke vraag is of lugdunomycinebiosynthese een evolutionair voordeel biedt voor de producent. Het concept dat moleculen door samenwerking van enzymen uit meerdere BGC's kunnen worden geproduceerd lijkt vaker voor te komen dan tot nu toe werd gedacht. Voorbeelden zijn onder meer de biosynthese van endofenasiden door *Kitasatospora* sp. MBT 66, waarbij glycosylering gebeurt door enzymen van een ander gencluster en bij de biosynthese van actinomycine L door *Streptomyces* sp. MBT 27, waarbij anthranilamide wordt ingebouwd om zo een nieuwe variant van het aloude actinomycine te vormen (Wu *et al.*, 2016b, Machushynets *et al.*, 2022). Het idee dat één molecuul wordt afgeleid van één BGC vormt de basis voor het ontwikkelen van nieuwe antibiotica middels de synthetische biologie. Het voorbeeld van lugdunomycine laat opnieuw zien dat op deze manier zeer interessante chemische diversiteit kan worden gemist en dat het belangrijk is om de chemische diversiteit van de oorspronkelijke productiestam nooit uit het oog te verliezen.

