



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring the metabolism and toxicity of amino sugars and 2-deoxyglucose in *Streptomyces*

Li, C.

Citation

Li, C. (2024, October 30). *Exploring the metabolism and toxicity of amino sugars and 2-deoxyglucose in Streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4107470>

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/1887/4107470>

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

n

Nederlandse Samenvatting

Streptomyceten zijn Gram-positieve, multicellulaire bacteriën die behoren tot het fyllum Actinobacteriën. Ze spelen een belangrijke rol in de bodemecologie vanwege hun uitzonderlijke vermogen om complexe koolstofbronnen te benutten, met name door de hydrolyse van een breed scala aan polysachariden, zoals cellulose, chitine, xylaan en agar, evenals andere natuurlijke macromoleculen (Chater *et al.*, 2010). Streptomyceten vertonen een complexe levenscyclus die morfologisch lijkt op die van filamenteuze schimmels. Deze levenscyclus begint met het ontkiemen van een spore, wat leidt tot de vorming van een vertakt netwerk van lange, multinucleaire hyfen. Onder ongunstige omstandigheden, zoals voedselgebrek, starten streptomyceten een complex ontwikkelingsprogramma. Een belangrijke gebeurtenis in dit proces is de lysis van het vegetatieve of substraatmycelium door geprogrammeerde celdood (PCD), wat voedingsstoffen levert voor het nieuw gevormde luchtmycelium (Méndez *et al.*, 1985, Miguélez *et al.*, 1999). Uiteindelijk genereren de luchthyfen ketens van sporen, elk met een enkel chromosoom. Het begin van de ontwikkeling is nauw verbonden met de productie van antibiotica en andere bioactieve moleculen (Bibb, 2005, van Wezel & McDowall, 2011).

N-acetylglucosamine (GlcNAc) is een zeer belangrijke voedingsstof voor streptomyceten en fungeert ook als een signaal dat de voedingsstatus van de omgeving aangeeft, wat bekend staat als “feast and famine”, oftewel “feest en honger” ((Rigali *et al.*, 2008); besproken in **Hoofdstuk 2**). Onder voedselrijke (feest) omstandigheden onderdrukken hogere concentraties GlcNAc (maar niet GlcN) de ontwikkeling en antibioticaproductie, terwijl GlcNAc deze processen onder voedselarme (honger) omstandigheden juist activeert. Het is duidelijk dat de nutriëntsensor en pleiotrope regulator DasR een belangrijke rol speelt; het heeft een groot regulon bestaande uit genen voor GlcNAc-metabolisme en -transport, chitinasen, sideroforen en antibioticaproductie, waarbij de DNA binding wordt gecontroleerd door aminosuikerfosfaten. Echter, hoewel belangrijk, is dit slechts een deel van een complex geheel. Aangezien GlcNAc ook een essentieel onderdeel is van bacteriële celwand (Vollmer *et al.*, 2008), kan zijn signaalrol in streptomyceten gekoppeld zijn aan de perceptie van omgevingsnutriënten, vooral in de context van myceliumlysis als gevolg van PCD door voedselgebrek. Dit suggereert een nauwe verbinding tussen aminosuikermetabolisme, PCD en de ontwikkeling van *Streptomyces*.

Stand van zaken aan het begin van deze thesis

Hoge concentraties GlcNAc of GlcN zijn toxisch in afwezigheid van het enzym glucosamine-6-fosfaat-deaminase (NagB) in *S. coelicolor* (Świątek *et al.*, 2012a). Op minimaal medium aangevuld met 10 mM GlcNAc of GlcN ondergaan *nagB* mutanten vaak spontane tweede-site mutaties die hun overleving mogelijk maken (Świątek *et al.*, 2012a, Świątek *et al.*, 2012b). Suppressormutaties werden voornamelijk gevonden in het gen voor *N*-acetylglucosamine-6-fosfaat-deacetylase (NagA), zowel op GlcN als GlcNAc (Świątek, 2012), wat suggereert dat

NagA een rol speelt in het metabolisme van beide aminosuikers. Dit wijst er ook op dat het substraat van NagA, GlcNAc-6P, op zichzelf niet toxisch is. Dit metaboliet zal immers in grote hoeveelheden accumuleren in *nagA* mutanten die groeien op GlcNAc. Naast *nagA* werden suppressormutaties geïdentificeerd in *rokL6* (SCO1447) en SCO4393. Mutaties in *rokL6* ontstonden alleen op GlcN, terwijl die op GlcNAc alleen op GlcNAc ontstonden. RokL6 is een ROK-familie regulator die specifiek betrokken is bij GlcN-transport of -metabolisme, aangezien frameshift-mutaties in dit gen alleen GlcN-toxiciteit verlichten (Urem, 2017). Echter, aan het begin van deze thesis waren de regulons van RokL6 en diens rol in het compenseren van GlcN-toxiciteit nog onbekend. SCO4393 bevat een voorspelde suikerisomerase (SIS) domein. Gezien de associatie met N-acetylglucosamine-gevoeligheid, hebben we dit gen recentelijk hernoemd naar *nagS*. Verrassend genoeg toonde een voorlopige isothermische titratiecalorimetrie (ITC) analyse aan dat alleen GlcNAc-6P het substraat was van het enzym (Urem, 2017), wat suggereert dat NagS GlcNAc-6P omzet in bepaalde toxische producten. Dit lijkt echter in tegenspraak met de observatie dat *nagA-nagB* dubbelmutanten volledig ongevoelig zijn voor GlcNAc, ondanks de accumulatie van grote hoeveelheden GlcNAc-6P. Dit was een decennium een groot raadsel binnen het van Wezel lab. Hoewel de structuren van apo-NagS en GlcNAc-6P-gebonden NagS waren bepaald (Urem, 2017), bleven de precieze functie en het katalytische mechanisme onopgelost. Bovendien waren, afgezien van de rol van DasR, de onderliggende mechanismen achter GlcNAc-gerelateerde nutriëntendetectie, vooral onder voedselrijke omstandigheden, nog steeds niet goed begrepen.

Tenslotte bestaat er nog een derde en gerelateerd toxisch molecuul, namelijk 2-deoxyglucose (2-DG). GlcN is 2-amino-deoxyglucose. 2-DG wordt momenteel ontwikkeld als een chemotherapeutisch middel tegen tumoren (Zhang *et al.*, 2014, Bost *et al.*, 2016). Echter, het werkingsmechanisme was nog onduidelijk, aangezien glycolytische remming alleen de toxiciteit voor eukaryote cellen niet volledig verklaart (Ralser *et al.*, 2008). In *S. coelicolor* resulteert blootstelling aan 2-DG in spontane 2-DG-resistente mutanten, die allemaal in het *glkA* gen zijn gelocaliseerd, dat codeert voor glucokinase, wat aangeeft dat fosforylatie van 2-DG naar 2-DG-6P vereist is voor de toxiciteit ervan (Van Wezel *et al.*, 2005).

Deze thesis begon dus met het bestaan van drie toxiciteitsroutes in het centrale metabolisme en had tot doel de belangrijke vragen die hierboven zijn geformuleerd, te beantwoorden.

Het oplossen van het mysterie rond GlcN- en 2-DG-detoxificatie door RokL6-SCO1448

Met behulp van de GlcN-toxiciteit wilden we de transporteurs van GlcN in *S. coelicolor* identificeren door de toxiciteit ervan te evalueren in verschillende potentieel gerelateerde mutanten. NagE1 en NagE2 zijn twee dichtstbijzijnde homologen van GamP in *S. coelicolor*, een van de GlcN-transporteurs in *B. subtilis*. Bovendien werd de transcriptie van genen die coderen voor de ABC-transporteur CsnEFG (SCO2658-SCO2660) significant verhoogd in de

aanwezigheid van GlcN (Li *et al.*, 2023). Echter, deze mutanten, gecreëerd in *ΔnagB*, *ΔnagBΔnagE1*, *ΔnagBΔnagE2* en *ΔnagBΔcsnEFG*, blijven gevoelig voor GlcN, wat aangeeft dat GlcN-transport en -metabolisme in *Streptomyces* waarschijnlijk complexer is dan in *E. coli* en *B. subtilis*.

Mutaties in *rokl6* in de mutant *ΔnagB* verlichten specifiek de toxiciteit van GlcN, maar niet van GlcNAc, wat erop wijst dat deze transcriptieregulator, RokL6, specifiek GlcN-gerelateerd transport of metabolisme controleert (Urem, 2017). **Hoofdstuk 3** van deze thesis had als doel de regulons van RokL6 te identificeren en de rol ervan in GlcN-toxiciteit te verduidelijken. Ons onderzoek toonde aan dat RokL6 de transcriptie van het naburige en divergent getranscribeerde SCO1448 onderdrukt en ook als autoregulator fungeert, door te binden aan overlappende promotoren in de *rokl6*-SCO1448 intergene regio. Een geconserveerde consensus voor de bindingsplaats van RokL6 (5' -C(T)TATCAGG - 7 nt - CCTGATAG(A)- 3') is daarbij geïdentificeerd. RokL6-onafhankelijke expressie van SCO1448 hief de toxiciteit van GlcN in *nagB* mutanten volledig op. De accumulatie van GlcN-6P en/of zijn metabolische derivaten is dodelijk voor *S. coelicolor*, wat overeenstemt met waarnemingen in *E. coli* en *B. subtilis* (Plumbridge, 2015). SCO1448 codeert voor een MFS transporteiwit, en gezien het feit dat overexpressie de toxiciteit opheft, is het logisch om aan te nemen (maar niet bewezen) dat het de export van een of meer toxische intermediären faciliteert. Echter, constitutieve expressie van SCO1448 heft specifiek de toxiciteit van GlcN op maar niet die van GlcNAc, wat wijst op significante verschillen in de perceptie van GlcN en GlcNAc door *Streptomyces* en suggereert dat GlcN- en GlcNAc-toxiciteit via onafhankelijke routes werken.

Verrassend genoeg heft de deletie van *rokl6* in *S. coelicolor ΔnagB* niet alleen de toxiciteit van GlcN op, maar ook die van 2-deoxyglucose (2-DG) (Urem, 2017), wat een verband legt tussen het metabolisme van deze twee glucose-analogen in *S. coelicolor*. 2-DG is een stabiele glucose-analoog die de groei van zowel normale als kwaadaardige cellen remt. Net als de effecten op *E. coli*, gist en zoogdiercellen remt 2-DG de groei van filamenteuze *Streptomyces*. Constitutieve expressie van SCO1448 kan ook 2-DG-toxiciteit in M145 verlichten (**Hoofdstuk 5**), wat suggereert dat de metabole paden die leiden tot de accumulatie van toxische verbindingen afgeleid van 2-DG en GlcN mogelijk overlappen in *Streptomyces*, waarbij SCO1448 fungeert als een exporteur om de toxische moleculen die daaruit voortkomen uit te pompen. In het bijzonder, waarom zouden streptomyceten een cryptische exporteur hebben om zichzelf te beschermen tegen toxische intermediären gerelateerd aan GlcN en 2-DG? Het systeem is waarschijnlijk belangrijk, aangezien de genetische syntenie en ook (de locatie van) de RokL6-bindingsplaats sterk geconserveerd zijn in *Streptomyces* (**Hoofdstuk 3**). Deze hoge conservering omvat de RokL6 bindingsplaats, wat voorspelt dat de expressie van SCO1448 wordt onderdrukt door RokL6 in veel, zo niet alle, streptomyceten. Hoewel de biologische betekenis van het RokL6-SCO1448-regulatiesysteem onduidelijk blijft, kan dit eiwit een cruciale rol spelen in het voorkomen van de accumulatie van overvloedige toxische

intermediären onder specifieke groeiomstandigheden in de natuurlijke omgeving. Echter, er blijven verschillende vragen onbeantwoord: (i) hoe en wanneer wordt het remmende effect van RokL6 op SCO1448 in de cel opgeheven; (ii) wat is het ligand dat de DNA-bindingscapaciteit van RokL6 verandert en wanneer wordt het systeem opgeheven; en (iii) de aard van de substraten die door SCO1448 worden getransporteerd. Deze vragen verdienen verder onderzoek.

2-DG-toxiciteit wordt gemedieerd via de pentosefosfaatroute

We onderzochten vervolgens de toxiciteit van 2-DG door ons te richten op de metabole enzymen die downstream liggen van glucose-6-fosfaat, aangezien 2-DG-6P waarschijnlijk verder wordt gemetaboliseerd via deze routes. We ontdekten dat 2-DG-6P geen substraat was voor glucose-6-fosfaat (Pgi), maar wel wordt gedehydrogeneerd door glucose-6-fosfaatdehydrogenase (Zwf) van *S. coelicolor*, *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*. We bevestigden ook de hydrolyse van 6-fosfo-deoxyglucono-1,5-lacton (6-PDL) door de 6-fosfogluconolactonasen (Pgl) van *S. coelicolor* en *S. cerevisiae*. Zo wordt 2-DG-6P gemetaboliseerd via de PPP in zowel prokaryoten als eukaryoten, en dit is de belangrijkste oorzaak van de toxiciteit; 2-DG-6P wordt gedehydrogeneerd tot 6-PDL door Zwf, gevolgd door hydrolyse tot 6-fosfo-deoxyglucanaat door Pgl (**Hoofdstuk 5**). Deletie van genen die Zwf coderen vermindert significant de toxiciteit van 2-DG, terwijl deletie van *pgl* deze juist versterkt, wat sterk bewijs levert dat het Zwf-product, 6-PDL, het belangrijkste toxische molecuul is dat verantwoordelijk is voor groeiremming door 2-DG. Chemisch gesynthetiseerde 2-deoxyglucono-1,5-lacton vertoont inderdaad een hoge toxiciteit voor *S. coelicolor*, ongeveer een orde van grootte hoger dan 2-DG. De verlichting van 2-DG-toxiciteit in $\Delta nagB\Delta rokL6$ is niet alleen te danken aan verbeterde SCO1448-expressie, aangezien *rokL6*-enkelvoudige mutants met vergelijkbare SCO1448-expressie gevoelig blijven voor 2-DG. Omdat GlcN-6P, het substraat van NagB, Zwf remt (Kanji *et al.*, 1976), vermindert de accumulatie ervan in $\Delta nagB\Delta rokL6$ de productie van 6-PDL, wat de waargenomen 2-DG-resistentie in $\Delta nagB\Delta rokL6$ maar niet in $\Delta rokL6$ verklaart.

In *S. cerevisiae* spelen 2-DG-6P-fosfatasen (Dog1 en Dog2) ook een rol in 2-DG-detoxificatie (Defenouillère *et al.*, 2019). Er zijn echter geen homologen van deze enzymen in *Streptomyces*. Dit suggereert verschillen in de mechanismen van 2-DG-resistentie tussen prokaryoten en eukaryoten. Daran en Pronk van de TU Delft voerden voorlopige studies uit naar 2-DG-toxiciteit in *zwf1* mutanten en *sol3-sol4*-dubbelmutanten van de eukaryotische gist *S. cerevisiae*. De *sol*-genen coderen voor 6-fosfogluconolactonase. Echter, noch $\Delta zwf1$ noch $\Delta sol3\Delta sol4$ vertoonden een veranderde gevoeligheid voor 2-DG. De resultaten gevonden in gist konden dus nog niet worden afgestemd op die in *S. coelicolor*, en verder onderzoek is nodig om de toxiciteit van de accumulatie van 6-PDL in *S. cerevisiae* te testen en de potentiële eukaryote cytotoxiciteit van 2-deoxyglucono-1,5-lacton te beoordelen.

De fosfosuikerdehydratase NagS heeft een totaal nieuwe functie

Groei van *nagB* mutanten in de aanwezigheid van GlcNAc leidt onder meer tot suppressormutaties in *nagS* (SCO4393). Het *nagS* gen ligt divergent van *dmdR1* (SCO4394) op het *S. coelicolor* genoom, en de syntenie rond *nagS* is sterk geconserveerd onder alle streptomyceten, vooral met betrekking tot *dmdR1*. DmdR1 is de globale regulator van ijzerhomeostase in *Streptomyces* die ook de productie van de sideroforen coelichelin en desferrioxamine controleert (Flores & Martín, 2004). De toevoeging van ijzer aan R2YE-media aangevuld met GlcNAc herstelt de ontwikkeling en antibiotica-productie in *S. coelicolor*, ook in de aanwezigheid van GlcNAc (Lambert *et al.*, 2014). Bovendien hadden *nagS* mutanten het vermogen verloren om de productie van sideroforen op R5 met toegevoegde GlcNAc te onderdrukken, wat wijst op een nauwe band tussen NagS en ijzergebruik in *Streptomyces*. NagS, dat geannoteerd staat als een fosfosuikerisomerase, vertoont een andere functie dan andere suikerisomerasen door zowel GlcNAc-6P als ManNAc-6P te dehydrateren tot het overeenkomstige 2,3-dehydroderivaat (**Hoofdstuk 4**), een reactie die nog niet in de huidige leerboeken is beschreven. Door structurele en mutageneseanalyse hebben we de actieve plaatsen van NagS geïdentificeerd, waaronder His53, Arg64, Glu94, Asp179, en konden we een mechanisme voorstellen voor het openen van de ring van GlcNAc-6P tijdens de katalyse. Bovendien hebben we de kristalstructuur van NagS gebonden aan zijn remmer 6-fosfogluconaat (6-PG) opgelost. Als een belangrijke intermediair in de pentosefosfaatroute werd 6-PG geïdentificeerd als een competitieve remmer van NagS, wat wijst op een remmende rol van 6-PG bij de vorming van toxische moleculen die afgeleid worden van GlcNAc. Onderzoek naar NagS heeft de kenmerken onthuld van een volledig nieuw enzym dat betrokken is bij aminosuikermetabolisme en biedt nieuwe inzichten in het metabolisme van aminosuikers en GlcNAc-gevoeligheid in *Streptomyces*.

De toxiciteit van GlcNAc hangt af van NagS en NagA

De basis voor GlcNAc-gevoeligheid in *S. coelicolor nagB* mutanten werd ook onderzocht in **Hoofdstuk 4**. We bestudeerden de essentiële rol van twee enzymen, NagA en NagS, in GlcNAc-toxiciteit, en ontdekten ook een nieuw katalytisch substraat van NagA, evenals een nieuwe metabole route voor GlcNAc. Op basis hiervan konden we eindelijk de oorsprong van de toxiciteit van GlcNAc in *S. coelicolor* oplossen. Naast deacetylering door NagA kan GlcNAc-6P door NagS worden gedehydrateerd tot **verbinding 1**, die verder door NagA wordt gedeacetyleerd tot de potentieel toxische moleculen **2** en **3** (**Hoofdstuk 4**). De ontdekking van deze nieuwe metabole route lost het eerder genoemde mysterie op waarom *nagA* mutanten, die grote hoeveelheden GlcNAc-6P accumuleren, goed groeien op GlcNAc: NagA heeft een tweede, promiscuë activiteit, waardoor deacetylatisering van het product van NagS mogelijk wordt, wat dan een toxische verbinding oplevert die lijkt op ribose. Zonder NagA wordt deze route afgesloten. De toevoeging van ribose vermindert GlcNAc-toxiciteit, wat suggereert dat GlcNAc

gevoeligheid verband houdt met een verstoorde nucleotidesynthese, die essentieel is voor celgroei en signaaltransductie. We veronderstellen dat de geaccumuleerde **verbinding 3** het waarschijnlijke toxische agens is, aangezien het een vergelijkbare chemische structuur heeft als ribose-5P. Deze hypothese moet worden bevestigd door metabole studies aan wildtype en *nagS* mutanten wanneer ze worden blootgesteld aan hoge concentraties GlcNAc.

Onze nieuwe data, gecombineerd met de uitkomsten van eerder werk, stellen ons in staat een nieuw model voor te stellen voor de controle van ontwikkeling en antibioticaproductie in *Streptomyces* in **Hoofdstuk 4**. Dit model integreert NagS, GlcNAc metabolisme, de regulatie door DasR en intracellulaire ijzerophoping om zowel de start als het einde van PCD in het mycelium te verklaren, wat de initiatie van morfologische en chemische differentiatie controleert. Ongetwijfeld is de concentratie van GlcN(Ac)-6P daarbij cruciaal. Naarmate de vegetatieve groei vordert en de kolonie groeit, wordt het mycelium afgebroken om de nieuwe biomassa te ondersteunen. Dit leidt tot de accumulatie van belangrijke bouwstenen zoals aminozuren, nucleotiden en GlcNAc. Verhoogde niveaus van GlcNAc activeren een PCD-achtig proces door de toxiciteitsroutes van NagS/NagA, ijzerimport en productie van prodiginines te activeren, die allemaal toxisch zijn voor cellen. Hoge GlcNAc-niveaus in regio's die uitgebreide lysis van het mycelium ondergaan, remmen DasR via het allosterische effect van GlcNAc-6P en GlcN-6P, waardoor DmdR1 wordt geactiveerd. Dit vermindert de ijzerimport en beperkt de celdood door reactieve zuurstofsoorten (ROS) die aan ijzer gerelateerd zijn (Cornelis *et al.*, 2011). Het weer uitzetten van NagS vindt waarschijnlijk post-translationeel plaats via een salvage route die NagS remt en de productie van toxische verbindingen stopt (**Hoofdstuk 4**). De belangrijkste ontdekking is dat het pentosefosfaatroute (PPP) intermediair 6-fosfogluconaat de enzymactiviteit van NagS remt. Deletie van *nagB* zal de omzetting van GlcN-6P naar Fru-6P en vervolgens via de PPP naar de NagS-remmer 6-PG voorkomen. De salvage route is niet toegankelijk en NagS blijft actief. Dit verklaart ten minste gedeeltelijk waarom *nagB* mutanten zo gevoelig zijn voor aminosuikers. Ten slotte, zodra PCD is uitgeschakeld vanwege verminderde ijzer-, prodiginine- en NagS-activiteit, dient nutriëntenuitputting als een belangrijk signaal voor het begin van de morfologische en chemische differentiatie.

Conclusies en vooruitzichten

Het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven beantwoordt verschillende langdurige mysteries rond aminosuiker en/of 2-deoxyglucosemetabolisme in *Streptomyces*, maar heeft zoals altijd ook weer nieuwe vragen opgeworpen die in de toekomst moeten worden opgelost. Het grootste mysterie was misschien wel dat rondom *nagS* en *nagA*. Wanneer *nagA* mutanten worden geconfronteerd met hoge concentraties GlcNAc, resulteert dit in sterke ophoping van GlcNAc-6P in de cel, wat blijkbaar niet toxisch is: *nagA-nagB* dubbelmutanten zijn totaal ongevoelig zijn voor beide aminosuikers. Hoe kan dan een suppressor van de *nagB* mutant in

het gen zitten voor een enzym dat GlcNAc-6P als substraat gebruikt? Dit is opgelost door te laten zien dat NagS en NagA in feite een nieuwe metabole route vormen, waarbij de deacetylering door NagA van het product van NagS de belangrijkste stap is richting toxiciteit. Zo hebben we zowel een volledig nieuw enzym in het primaire metabolisme (NagS) ontdekt als een nieuwe promiscuë functie voor NagA. Het werk laat ook zien dat NagS als een soort poortwachter fungeert van de ontwikkeling naar sporulatie en de antibioticaproductie, en zo ons begrip van de onderliggende mechanismen van gevoeligheid voor aminosuikers en "feest en honger" heeft verbeterd. We hebben ook de rol van de ROK-familie regulator RokL6 in GlcN-toxiciteit opgelost, waarbij we konden laten zien dat RokL6 fungeert als een transcriptionele repressor van SCO1448, voor een MFS-transporter. Deze transporter biedt weerstand tegen zowel GlcN- als 2-DG-toxiciteit. Verder toonden we ook aan dat 2-DG-toxiciteit wordt gemedieerd via de PPP, met 6-fosfo-2-deoxyglucono-1,5-lacton (6-PDL) als het cytotoxische agens.

Naar de toekomst kijkend is één van de belangrijke vragen die nog op tafel ligt, de vraag waarom GlcN niet toxisch is voor *nagB* mutanten als NagA afwezig is. Tenslotte is er geen rol bekend voor NagA in de omzetting van GlcN. En wat is de precieze link tussen de toxiciteitsroutes rond GlcN, 2-DG en GlcNAc? Over het algemeen begrijpen we nog steeds zeer weinig van GlcN metabolisme in *Streptomyces*, wat een belangrijke stap is naar het beantwoorden van de belangrijkste vragen die nog moeten worden aangepakt. Bovendien, om de mechanismen die het begin van de ontwikkeling beheersen beter te begrijpen, is opheldering van de ruimtelijk-temporale coördinatie van NagS-NagA, ijzergebruik en prodiginineproductie noodzakelijk. Aangezien SCO1448 betrokken is bij de detoxificatie van zowel GlcN als 2-DG, is het identificeren van diens substraat(en) cruciaal voor het onthullen van de basis van GlcN-toxiciteit in bacteriën. Het werk aan 2-DG heeft belangrijke implicaties op het gebied van kankeronderzoek, gezien de hoge toxiciteit ervan voor menselijke cellen. Een beter begrip van het precieze mechanisme waarmee 2-DG inwerkt op eukaryotische cellen is belangrijk voor de toepassing ervan in de kliniek, onder andere om medicijnresistentie te voorkomen. Hiervoor is verder onderzoek nodig naar 6-PDL in eukaryotische modelorganismen, wat hopelijk diepere inzichten zal bieden voor de ontwikkeling van effectievere anti-tumor therapieën op basis van 2-DG. Zo hebben we een lange weg afgelegd in het uitwerken van de moleculaire basis van de toxiciteit van aminosuikers en deoxysuikers in *Streptomyces*. Tegelijkertijd – zoals altijd – zijn er nieuwe wegen geopend voor verder onderzoek aan dit boeiende onderwerp. Dit laatste zal ongetwijfeld weer verdere inzichten bieden in de rol van de toxiciteitsroutes bij de controle van groei, ontwikkeling en antibioticaproductie door streptomyceten.

