



## **Schlussbericht**

BioProMare" – Verbundvorhaben: „ Erforschung und Nutzung des Biosynthesepotentials mariner Aktinobakterien" (EXPLOMARE) Teilprojekt D

### **Förderkennzeichen:**

161B0868D

### **Zuwendungsempfänger:**

Universität des Saarlandes, Postfach 15 11 50, 66041 Saarbrücken

### **Ausführende Stelle:**

Universität des Saarlandes, Institut für Systembiotechnologie, Campus A1 5,  
66123 Saarbrücken

### **Projektleitung:**

Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Christoph Wittmann

### **Projektlaufzeit**

01.5.2020 - 31.10.2023

## Inhalt

1. Kurzdarstellung.....	3
1.1 Aufgabenstellung.....	3
1.2 Voraussetzung unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde .....	4
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens .....	5
1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand .....	7
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	9
2 Eingehende Darstellung .....	10
2.1 Verwendung der Zuwendung, vorgegebene Ziele und erzielte Ergebnisse ....	10
2.1.1 Systembiologie (AP3).....	10
2.1.2 Metabolic Engineering (AP 4) .....	17
2.1.3 Fermentationsverfahren im Labormaßstab (AP5) .....	26
2.1.4 Produktion auf Basis von Algenrohstoffen (AP6) .....	28
2.1.5 Replikation (AP7) .....	37
2.1.6 Zusammenfassung.....	45
2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	53
2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	53
2.4 Voraussichtlicher Nutzen.....	53
2.5 Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen .....	54
2.6 Veröffentlichungen .....	54
2.6.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	54
2.6.2 Geplante Veröffentlichungen.....	54
2.6.3 Dissertationen .....	55
2.6.4 Geplante Dissertationen.....	55

# 1. Kurzdarstellung

## 1.1 Aufgabenstellung

Das Projekt sollte eine innovative Wertschöpfungskette zur ganzheitlichen Nutzung mariner Ressourcen entwickeln. Dabei standen ineinandergreifende Aspekte zur für die Synthese mariner Wirkstoffe, zum Einsatz mikrobieller mariner Zellfabriken sowie zur Verwertung mariner Rohstoffe im Fokus.

Zu diesem Zweck wurde ein interdisziplinäres Konsortium zusammengestellt, welches Systembiologie und synthetische Biologie mit chemischer und industrieller Biotechnologie integrierte, um maßgeschneiderte Stämme und Herstellungsprozesse mit optimierter Biosyntheseleistung und Robustheit und Fermentationsstrategien zu entwickeln.

Der neuartige Ansatz sollte zur Gewinnung von Nybomycin angewandt werden, eines neuartigen Antibiotikums, dessen Weiterentwicklung aufgrund ineffizienter Syntheseverfahren bislang kaum möglich ist. Für die Herstellung sollte ein neuer Weg für die Nybomycin-Produktion eingeschlagen werden, der rationalisierten synthetischen Zellfabriken basieren sollte. Das neuartige Produktionsverfahren sollte für eine gesteigerte Produktion im größeren Maßstab erprobt werden. Zudem sollte die Nutzung nachhaltiger Extrakte aus Makroalgen, deren Anbau in marinen Algenfarmen als Biomasse der dritten Generation derzeit massiv ausgebaut wird. Im weiteren Verlauf sollte auch andere marine Wirkstoffe auf ihre mögliche Gewinnung hin untersucht werden.

Zu diesem Zweck bündelten die Institute für Systembiotechnologie (iSBio) und Pharmazeutische Biotechnologie (PharmBio) der Universität des Saarlandes, das CeBiTec der Universität Bielefeld sowie das KMU MyBiotech ihre Expertisen in dem Verbundvorhaben EXPLOMARE.

## **1.2 Voraussetzung unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Vorversuche der Antragsteller bei Pharmbio hatten die prinzipielle Machbarkeit der heterologen Nybomycin-Produktion im Bodenbakterium *S. albus* gezeigt. Dabei gelangen auch Aufklärungen einzelner Syntheseschritte, eine wichtige Voraussetzung für die geplanten gezielte Stammoptimierung.

Die Antragsteller des Verbundes konnten zudem auf einer Reihe erfolgreicher nationaler und internationaler Projekte mit akademischen und industriellen Partnern aufbauen. Univ.-Prof. Christoph Wittmann, Projektleiter des Teilprojektes D (Systembiotechnologie), hat in den vergangenen 20 Jahren neue Konzepte zur Systembiotechnologie als Schlüsselmethod zukünftiger Prozessentwicklungen in der Biotechnologie maßgeblich vorangetrieben. Seine Projekte wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (z.B. im Rahmen von SFB 578 „Vom Gen zum Produkt“, SFB TR 51, „Marine Systembiologie“, SPP 1316 „Host-Pathogen Interaktionen“, SPP 2240 „Elektrobiotechnologie“), dem Ministerium für Bildung und Forschung (z. B. im Rahmen der Programme Bioindustrie21, Systembiologie von Mikroorganismen 1, Systembiologie von Mikroorganismen 2, Medizinische Infektionsgenomik, Biopharma Wettbewerb, Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe1, Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe 2), der EU (Eranet-Projekt CoBiotech, BBI-Projekt iFermenter, EU-Projekt RePurpose) und Partnern aus der Industrie gefördert.

Die ausführende Stelle, das Institut für Systembiotechnologie (iSBio) der Universität des Saarlandes, war für die Projektarbeiten mit verschiedenen Fermentationssystemen ausgestattet. Dazu gehörten Laborbioreaktoren im Litermaßstab mit Prozesskontrolle, Schüttelschränke und ein Biolektor-System für miniaturisierte Kultivierung. Das iSBio verfügte zudem über Einrichtungen zur systembiologischen (u.a. GC-MS, LC-MS/MS), biochemischen und prozessbegleitenden Analytik (u.a. HPLC, IC, Photometer, Abgas-MS, Fluoreszenzspektrometer), einen institutseigenen Server für Simulationen und Modellierung sowie Ausstattung für gentechnische Arbeiten (u.a. PCR, Ribolyzer, DNA/RNA-Quant, Elektrophorese).

### 1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Vor dem geschilderten Hintergrund sollte im Rahmen von EXPLOMARE ein nachhaltiges, biotechnologisches Produktionsverfahren für Nybomycin entwickelt und dabei die Nutzung nachhaltiger Rohstoffe marinen Ursprungs validiert werden. Das Projekt gliederte sich in drei Hauptteile: (i) Stammdesign und -optimierung, (ii) Demonstration und (iii) industrielle Erprobung und Umsetzung. CeBiTec und PharmBio sollten an Genomik, Transkriptomik und synthetischer Biologie arbeiten (WP1, WP2). iSBio und CeBiTec sollten zur systembiologischen Analyse beitragen (WP3). PharmBio und iSBio sollten verbesserte marine *S. albus*-Zellfabriken für die gewünschte Produktion schaffen (WP4, WP5). MyBiotech, PharmBio und iSBio sollten die Produktion von Nybomycin erproben (WP5). MyBiotech und iSBio sollten dabei an der Entwicklung der Produktion aus marinen erneuerbaren Rohstoffen, d. h. Algenextrakten, sowie an der Erprobung und Umsetzung des Prozesses arbeiten (WP6). Der neu etablierte Arbeitsablauf sollte dann für ein zweites Naturprodukt repliziert werden, wobei bis dahin entwickelte Chassis-Stämme, neu identifizierte BGCs und die gewonnene technologische Exzellenz verwendet werden sollten (WP7). Darüber hinaus wurden Projektkoordination, Projektmanagement und Datenmanagement vom Koordinator PharmBio (WP8) übernommen. Es wurde ein Arbeitsplan konzipiert, der beide Dimensionen der Fragestellung – Molekularbiologie und Bioprozesstechnik – verzahnte (Abb. 1).

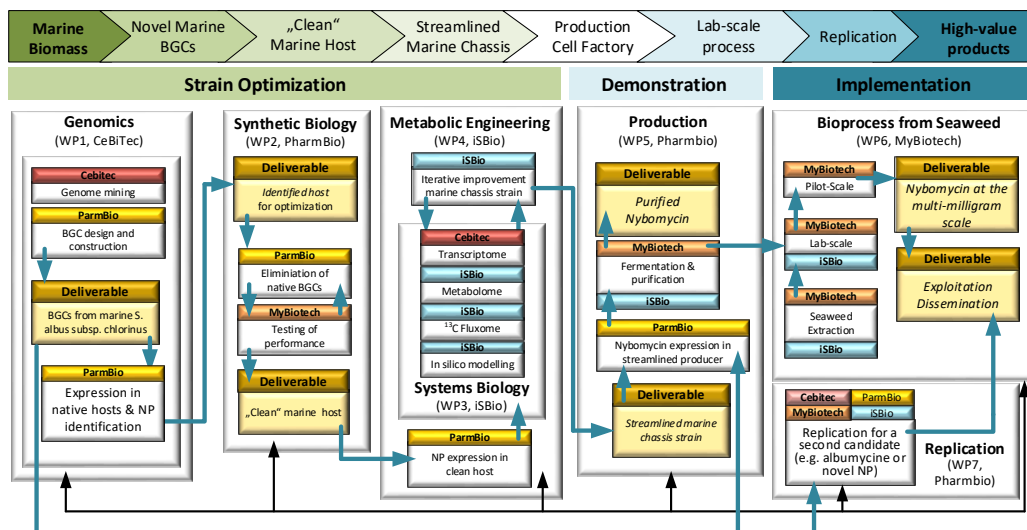
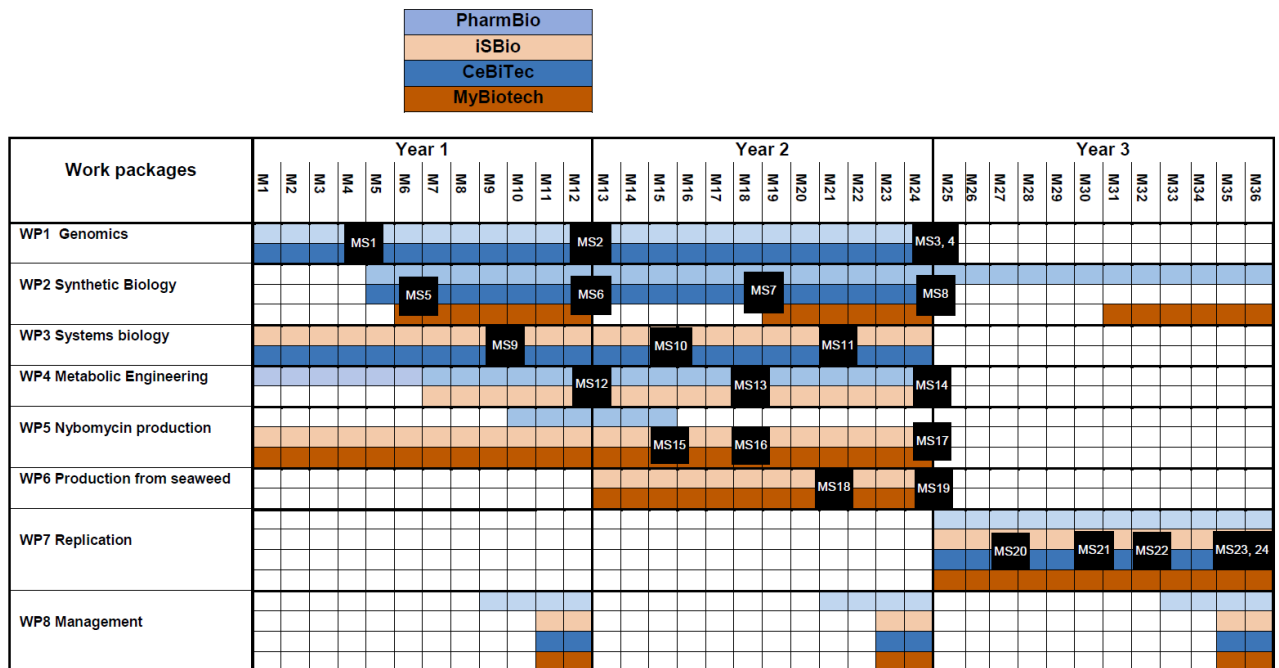


Abb. 1: Projektstruktur und Aufgabenteilung der beteiligten Partner. NP = Natural Product

Das iSBio wirkte in der Forschung vorwiegend an AP3, AP4, AP5 und AP7 mit. Die Planung der Meilensteine ist Tabelle 1 zu entnehmen. Der zeitliche Ablaufplan ist in Abb. 2 gezeigt.

**Tabelle 1:** Auflistung der iSBio-Meilensteine

MS Nr.	AP	Monat	Bezeichnung
MS9	AP3	9	Erstellung Multi-Omics Datensätze marine <i>S. albus</i> Wirtsstämme
MS10	AP3	15	Erstellung Multi-Omics Datensatz Produzent 1. Generation
MS11	AP3	21	Erstellung Multi-Omics Datensatz Produzent 2. Generation
MS12	AP4	12	1. Generation Nybomycin-Produzent
MS13	AP4	18	2. Generation Nybomycin-Produzent
MS14	AP4	24	3. Generation Nybomycin-Produzent
MS15	AP5	15	Fermentationsprozess für Nybomycin Basisproduzent (Labormaßstab)
MS18	AP6	21	Fermentationsprozess auf Basis Algen-Rohstoffe im Labormaßstab
MS21	AP7	30	Replikation zur Demonstration des Plattformcharakters



**Abb. 2:** Projektzeitplan (GANTT-Diagramm) und Meilensteinplanung (M1-M16).

#### 1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Ein wichtiger Grund für die Entdeckung neuartiger Sekundärmetaboliten ist die Umgehung des Problems resistenter Krankheitserreger, die für die derzeit verwendeten Medikamente nicht mehr empfänglich sind. In dieser Hinsicht liefert allein die Bakteriengattung *Streptomyces* bemerkenswerte 70 % der bisherigen kommerziellen Antibiotika [2], eine Biosynthesekapazität, die in der mikrobiellen Welt konkurrenzlos bleibt und bereits zweimal mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde: als Produzent von Streptomycin (1952) und Ivermectin (2015) [3]. *Streptomyzeten* aus terrestrischen Quellen wurden intensiv untersucht und für diesen Zweck sogar übermäßig genutzt. Infolgedessen sind die Chancen, einen neuen *Streptomyces*-Stamm und einen neuen Arzneimittelkandidaten aus terrestrischen Lebensräumen zu isolieren, gesunken [4], was eine ernsthafte Bedrohung für unsere Gesellschaft darstellt. Interessanterweise sind *Streptomyzeten* gut an die Meeresumwelt angepasst und kommen in Fischen, Mollusken, Schwämmen, Algen, Mangroven sowie in Meerwasser und Sedimenten vor [5]. Hier gedeihen sie erfolgreich unter ständig wechselnden, teilweise extremen Bedingungen. Interessanterweise sind marine *Streptomyces* viel weniger erforscht als ihre terrestrischen Gegenstücke. Erst in jüngerer Zeit wurden sie als Quelle neuartiger Antibiotika und Krebsmedikamente mit ungewöhnlichen Strukturen und Eigenschaften erkannt [6]. Heute gelten sie sogar als die beste Quelle für neuartige Arzneimittel [4]. Ein herausragendes Beispiel für Meeresarzneimittel ist das „umgekehrte Antibiotikum“ Nybomycin, ein äußerst wirksames Molekül gegen die Bedrohung durch multiresistente *Staphylococcus aureus* und andere multiresistente Bakterien und ein neues Paradigma für die zukünftige Chemotherapie [7]. Aufgrund der Bedeutung von Nybomycin haben weltweit führende Gruppen in der Vergangenheit versucht, das kodierende bakterielle Gencluster (BGC) zu identifizieren, aber erst vor kurzem hat das EXPLOMARE-Konsortium das BGC von Nybomycin in der marinen Spezies *S. albus subsp. chlorinus* entdeckt und erstmals Nybomycin durch heterologe Expression in dem terrestrischen Isolat *S. albus* hergestellt [8]. Dieser Erfolg stellte einen Meilenstein in der Erforschung dieses wichtigen Arzneimittels dar. Allerdings war der erzielte Nybomycin-Titer niedrig (0,2 mg/L), etwa tausendmal niedriger als der Titer anderer Naturprodukte aus terrestrischen *Streptomyces*, die im gleichen Wirt exprimiert wurden, was für die weitere Erforschung des Moleküls nicht ausreicht. Offensichtlich sind die „nicht-

marinen“ Bedingungen, z. B. niedrigere Salzgehalte, die bekanntermaßen einen starken Einfluss auf die Proteinstruktur und -aktivität haben [14], nicht mit der Nybomycin-Produktionslinie vereinbar. Die Ergebnisse zeigen, dass ein mariner *Streptomyces*-Wirt erforderlich ist. Im Hinblick auf die Verbesserung eines solchen neuartigen Wirts haben sich leistungsstarke Ansätze der synthetischen Biologie und des Systems Metabolic Engineering herausgebildet, die nun eine systematische Rationalisierung der Produzenten auf eine neue Effizienzstufe ermöglichen. Zu den vielversprechendsten Entwicklungen gehören die Eliminierung konkurrierender nativer BGCs aus dem Wirt [9] und das systematische Entkorken von Engpässen in seinem Stoffwechsel, um die Robustheit des Prozesses und die Versorgung mit Vorläufern, Energie und Reduktionskraft zu verbessern [10]. Im Hinblick auf eine nachhaltige Bioproduktion bietet die Meeresumwelt darüber hinaus erneuerbare Ressourcen. Im Mittelpunkt der aktuellen Forschung steht die Meeresalge als vielversprechendster erneuerbarer Rohstoff der dritten Generation [11]. Die marinen Makroalgen werden bis zu 70 Meter lang, weisen das schnellste lineare Wachstum der Erde auf und werden in 3D-Ozeanfarmen geerntet, ohne dass Düngemittel und Pestizide benötigt werden und Konkurrenz mit landwirtschaftlichen Flächen. Extrakte aus Meeresalgen lassen sich leicht gewinnen, indem man die Algen, die keine Zellwand haben, mit geringem Energieaufwand aufbricht. Sie enthalten erhebliche Mengen an Mannitol und verschiedenen Kohlenhydraten und Proteinen sowie einen hohen Salzgehalt und erscheinen als besonders geeignetes Rohmaterial für marine *Streptomyzeten*, die gut an Meersalz angepasst sind, Polymere aus Algen abbauen können [5] und gut auf Mannitol reagieren [2].

Das Konsortium verfügte über Patente und Patentanmeldungen im Bereich der industriellen Zellfabriken, was die technologische Führerschaft und das Potenzial zur Schaffung von geistigem Eigentum (IP) belegte. So hat PharmBio beispielsweise die Pamamycin-Produktion in *S. albus* (WO/2015/092575 A1, EP15183922.2) und empfindliche Biosensoren, die das Screening nach überlegenen Mutanten ermöglichen, geschützt (EP15202331.3). Ebenso hat iSBio Patentanmeldungen für Zellfabriken im Bereich der industriellen Biotechnologie eingereicht (SAR15413PCT). Für EXPLOMARE hat das Konsortium die Freiheit, mit marinen Stämmen wie *S. albus* PVA94-07, GBA94-10 oder LV1-4 zu arbeiten, um sie als Chassis weiterzuentwickeln und Gencluster aus dem marinen Stamm *S. albus subsp. chlorinus* NRRL B-24108

(aus der öffentlichen Sammlung des NRRL) zu verwenden, z. B. für Nybomycin und Albucidin. Die Partner von EXPLOMARE konnten auf eine erfolgreiche Zusammenarbeit zurückblicken, z.B. auf terrestrische *S. albus* für die industrielle Produktion des Insektizids Pamamycin (PharmBio, iSBio, CeBiTec: BMBF-Projekt MyBio), terrestrische *S. rimosus* für die Produktion des Antibiotikums Oxytetracyclin (PharmBio, iSBio: ERANET-Projekt MISSION), metabolisches Engineering von Mikroben für seltene Fettsäuren (iSBio, MyBiotech: BMBF-Projekt Myxo4Pufa) und antimikrobielle Peptide (iSBio, MyBiotech: EU-Projekt iFermenter).

- [1] Lam, 2006 et al., *Current Opinion Microbiology*. 2006. doi: 10.1016/j.mib.2006.03.004
- [2] Kieser et al., 2000 (2000) *Practical Streptomyces Genetics* (John Innes Foundation, Norwich, England).
- [3] Callaway et al., *Nature*. **2015**. doi: 10.1038/nature.2015.18507
- [4] Manivasagan et al., *Microbiology Research*. **2014**. doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014
- [5] Anderson and Wellington, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2001**. doi: 10.1099/00207713-51-3-797
- [6] Jensen et al., *Environmental Microbiology*. **2005**. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x
- [7] Kiramatsu et al., *J. Infection & Chemotherapy*. **2014**. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.001
- [8] Rodríguez et al., *Marine Drugs*. **2018**. doi: 10.3390/md16110435.
- [9] Myronovskyi et al., *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2018.09.004.
- [10] Becker & Wittmann, *Angew. Chemie Internationale Edition*. **2015**. doi.org/10.1002/anie.201409033
- [11] Hoffmann et al., *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.019.
- [12] Horbal et al., *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2018.09.010.
- [13] Rohles et al. *Green Chemistry*. **2018**. doi: 10.1039/c8gc01901k
- [14] Kohlstedt et al. *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2018.03.003
- [15] Schwechheimer et al., *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.005
- [16] Fürch et al., *BMC Microbiology*.
- [17] Klingner et al., *Applied and Environmental Microbiology*. 2015
- [18] Kohlstedt et al., *Environmental Microbiology*. 2014.
- [19] Barton et al., *Metabolic Engineering*. **2018**. doi: 10.1016/j.ymben.2017.12.001
- [20] Busche et al., *Frontiers in Microbiology*. **2018**. doi: 10.3389/fmicb.2018.01174.
- [21] Ian et al., *Plos One*. **2014**. doi: 10.1371/journal.pone.0096719.
- [22] Tortorella et al., *Marine Drugs*. **2018**. doi: 10.3390/md16100355.

## 1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit erfolgte in Form von Besprechungen, Wissenstransfer (u.a. Austausch von Protokollen, und Methoden), Bereitstellen von Stämmen, Medien und Equipment, sowie übergreifenden Versuchen zur Validierung von Analyse- und Kultivierungsmethoden. Während der Arbeiten ergab sich zudem für PharmBio und iSBio eine im Projektverlauf sehr erfolgreiche Zusammenarbeit mit der Universität Lwiw in der Ukraine, um ein neuartiges marines *Streptomyces*-Isolat mit vielversprechenden Produktionseigenschaften eingehend zu untersuchen und taxonomisch zu klassifizieren.

## 2 Eingehende Darstellung

### 2.1 Verwendung der Zuwendung, vorgegebene Ziele und erzielte Ergebnisse

Im Projektzeitraum wurden durch iSBio die Arbeitspakete AP3 (Systembiologie), AP5 (Metabolic Engineering), AP5 (Fermentation im Labormaßstab) und AP7 (Replikation) bearbeitet. Im Zentrum der Arbeiten stand die Optimierung der Produktion von Nybomycin in dem Basis-Stamm *S. albidoflavus* Del14 4N24, ehemals *S. albus* Del14 4N24. Die in AP3 vorgesehenen Fluxom-Analysen wurden gegenüber der ursprünglichen Planung nicht weiterverfolgt, da die umfangreichen Analysen auf der Ebene von Transkriptom und Metabolom bereits ausreichende Grundlagen für die Stammverbesserung lieferten und ein signifikanter Mehrwert durch Fluxom-Daten nicht zu erwarten war. Dafür wurden von iSBio zusätzliche systembiologische, taxonomische, und prozesstechnische Arbeiten in Bereich der Erforschung und Entwicklung eines weiteren neuartigen marinen Streptomyces-Stammes zur Nybomycin-Produktion übernommen (*Streptomyces* LV1-4) (AP3, AP7).

#### 2.1.1 Systembiologie (AP3)

Die Aufgabe von AP3 am iSBio war die Etablierung und Anwendung systembiologischer Methoden zur Charakterisierung von im Projekt entwickelten Nybomycin-Produktionsstämmen. Konkret kamen im Verlauf der Arbeiten zur Untersuchung des Basis-Produzenten sowie weiterentwickelter Stämme insbesondere Analysen auf der Ebene von Genom, Transkriptom, und Metabolom zum Einsatz. Am iSBio wurde ein minimales Kultivierungsmedium entwickelt (AP5), um klar definierte und reproduzierbare Prozessbedingungen zu gewährleisten und störende Einflüsse und Schwankungen durch undefinierte komplexe Nährstoffe ausschließen zu können. Dies erschien aus Vorerfahrungen in früheren Projekten insbesondere für die systembiologischen Versuche essenziell. Auf dieser Basis wurde der Produktionsprozess für Nybomycin zunächst für den Basisstamm *S. albidoflavus* Del14 4N24 und später für verbesserte Mutanten etabliert.

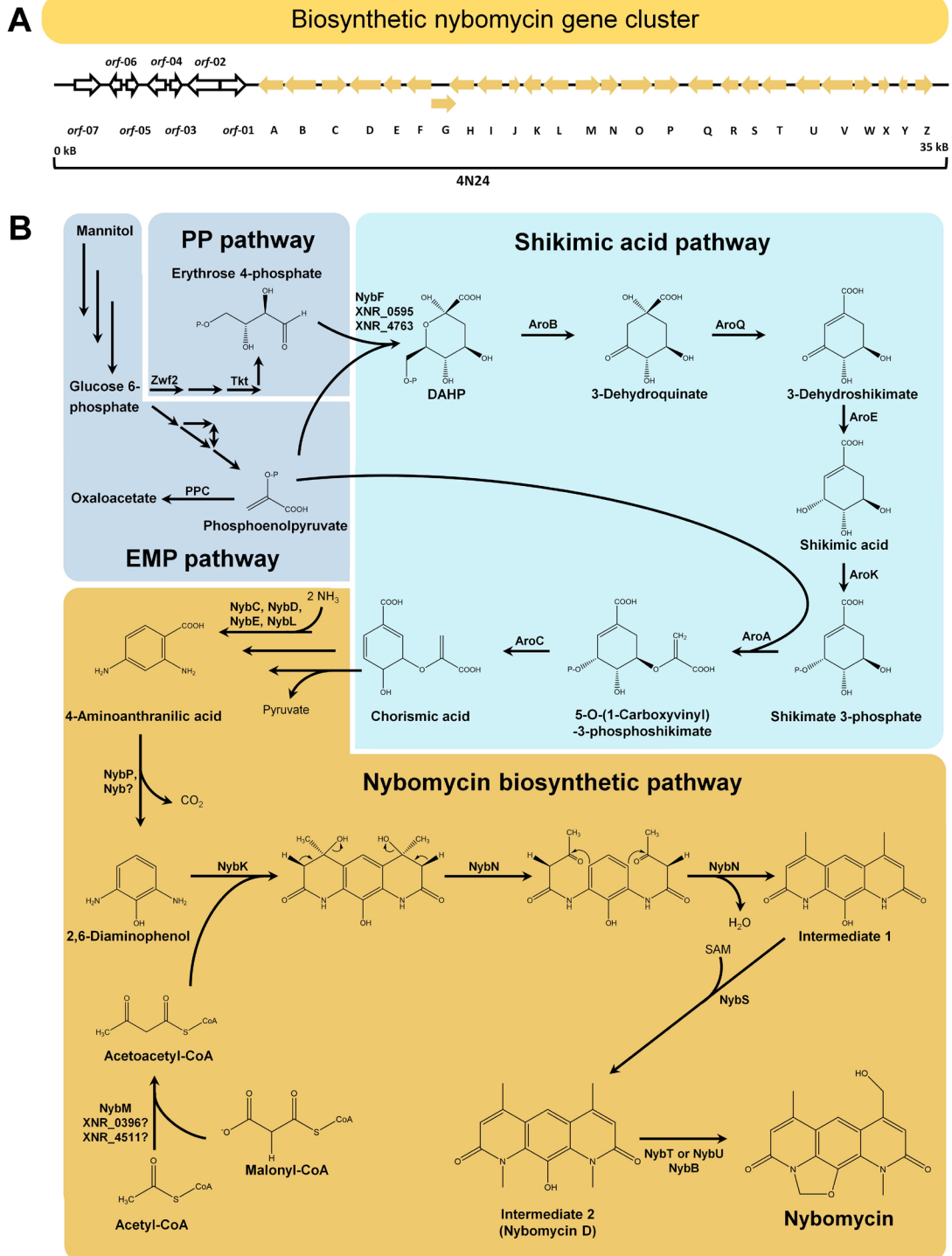
Dazu erfolgte am iSBio die mit den Partnern abgestimmte Etablierung wichtiger Analyseverfahren, die eine wichtige Basis für vergleichbare Experimente darstellten. Ein wichtiger Bereich war die Nutzung von RNA-Sequenzierung zur Erfassung der

Genexpression von Produktionsmutanten in Zusammenarbeit mit dem CeBiTec. Hierzu wurden am iSBio Protokolle zu Gewinnung, Kryokonservierung und Versand von Biomasseproben etabliert, die eine saubere Erfassung des Transkriptoms durch Messungen am CeBiTec ermöglichten. Die Auswertung der Transkriptom-Proben erfolgte gemeinsam mit dem CeBiTec. Die Analytik umfasste weiterhin Verfahren zur Extraktion von Nybomycin aus Kulturproben und zur Quantifizierung mittels LC-MS. Weiterhin wurden HPLC-basierte Verfahren für die Analyse der Zusammensetzung von Algenextrakten sowie von Kulturproben etabliert und validiert (u.a. Zucker, Aminosäuren, organische Säuren).

#### *2.1.1.1 Metabolisches Stoffwechselnetzwerk*

Es wurde am iSBio eine umfangreiche Analyse zum Stand der Technik der Biosynthese von Nybomycin auf der Ebene des Genclusters von *S. albus subsp. chlorinus* sowie auf der metabolischen Syntheserouten vorgenommen, die den stöchiometrischen Bedarf der beteiligten Metabolite und die Thermodynamik der bei der Umwandlung beteiligten Reaktionen berücksichtigten (Abb. 3).

Dabei wurde deutlich, dass neben der terminalen Synthese des Produktes auch Reaktionen des zentralen Kohlenstoffwechsels über die Bereitstellung von Reduktionskraft und Vorläufermolekülen potenziell beteiligt sind. Daraus wurden neuartige Strategien zur verbesserten Gewinnung von Nybomycin mittels Metabolic Engineering abgeleitet und in AP4 experimentell weiterverfolgt.



**Abb. 3. Genetik und Biochemie der Nybomycin-Biosynthese in Streptomyces.** Die Daten zeigen das *nyb*-kodierende Gencluster (Rodriguez Estevez et al., 2018) (A) und den vorgeschlagenen Biosyntheseweg (B). Bei letzterem werden Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) aus dem PP- und EMP-Weg zugeführt, um Shikimisäure und Chorisminsäure zu erhalten, hauptsächlich über die endogene aromatische Aminosäurebiosynthese (AroABCEKQ) (Euverink, 1995; Parthasarathy et al., 2018). Die weitere Umwandlung in 2,6-Diaminophenol über 4-Aminoanthranilsäure wird von den

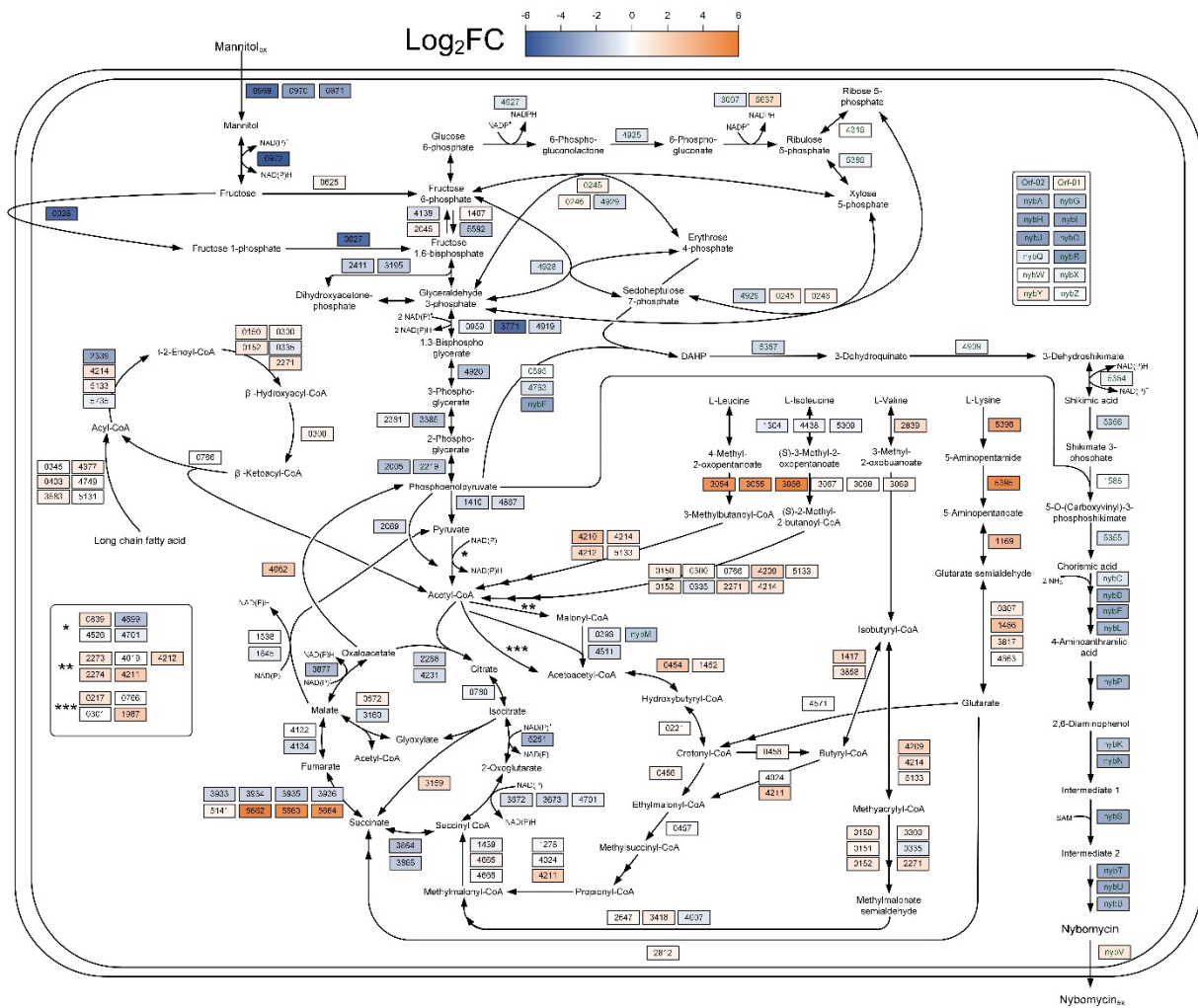
Genen *nybC*, *nybD*, *nybE*, *nybL* und *nybP* kodiert. Anschließend wird der aromatische Ring durch Anhängen von zwei Acetoacetyl-CoA-Resten verlängert, gefolgt vom Schließen der Pyridin-Ringe und der Methylierung der beiden Stickstoffatome. Die anschließende Bildung eines Oxazolin-Rings liefert Desoxy-Nybomycin, welches schließlich hydroxyliert wird, um Nybomycin zu erhalten (Rodriguez Estevez et al., 2018). Die Abbildung ist Stegmüller et al. (2023) entnommen.

### 2.1.1.2 Transkriptomik

Im Zuge der Optimierung der Nybomycin-Produktion wurden begleitende Transkriptom-Analysen gemeinsam mit dem CeBiTec durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Basis-Produzent *S. albidoflavus* Del14 4N24 von PharmBio untersucht, welcher geringe Mengen an Nybomycin produzierte und im Kultivierungsverlauf eine deutliche Dynamik in Wachstum und Produktion zeigte (AP 4).

Es wurden RNA-Sequenzierungen von *S. albidoflavus* Del14 4N24 durchgeführt, um Veränderungen im Zusammenhang mit dem Übergang vom Wachstum (13 h) zu Nybomycin-Produktion (70 h) zu beleuchten (Abb. 4). Die Expression von 2044 der 5790 kodierten Gene (35,3 %) unterschied sich signifikant zwischen Wachstums- und Produktionsphase ( $\log_2$ -fold change  $\geq 1$ ,  $p \leq 0,05$ ), wobei 868 Gene herunterreguliert und 1176 Gene hochreguliert waren, wie im Folgenden aufgeführt ist und darüber hinaus Stegmüller et al. (2023) entnommen werden kann.

Im Hinblick auf zentrale Wege des Kohlenstoff-Kernstoffwechsels, der Bereitstellung von Vorläufermolekülen und der Nybomycin-Biosynthese lieferte die Analyse wichtige Erkenntnisse (Abb. 4). So regulierten die Zellen während der stationären Phase Gene herunter, die für Mannitol-Import und -Metabolisierung, den EMP-Stoffwechselweg und die meisten TCA-Zyklus-Enzyme kodieren. Dieses Bild stimmte mit dem von verwandten Stämmen überein. Eine interessante Ausnahme war die Hochregulierung von Genen, die für den Succinat-Dehydrogenase-Komplex II (5662, 5663 und 5664) und die vorgeschaltete Umwandlung von L-Glutamat in Succinat kodieren.



**Abb. 4. Dynamische Veränderungen der Genexpression im Basis-Nybomycin-Produzenten *S. albidoflavus* 4N24.** Die Daten spiegeln Expressionsunterschiede zwischen der Wachstumsphase (13 h, als Referenz) und der Hauptphase der Nybomycin-Produktion (70 h) wider und umfassen Gene, die für Enzyme der wichtigsten katabolen und anabolen Stoffwechselwege, die Nybomycin-Biosynthese und die Versorgung mit Vorläufern kodieren. Die Enzyme wurden auf der Grundlage von KEGG-Wegkarten und Genannotationen, die bei der RNA-Sequenzierung gewonnen wurden, bestimmten Reaktionen zugeordnet. Die Nummern in den Kästen entsprechen den Locus-Tags in der Sequenz des Chromosoms von *Streptomyces albidoflavus* J1074 D14 4N24 (Zugangsnummer CP113229). Bei allen Proben lagen die biologischen Wiederholungen eng beieinander, was auf eine ausgezeichnete Datenqualität hindeutet. n=3. (für weitere Informationen siehe Stegmüller et al. 2023).

Darüber hinaus aktivierten die Zellen katabole Wege für den Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren (L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin) und Lipiden, wodurch schließlich interner Kohlenstoff mobilisiert wurde. Bemerkenswert war, dass diese Wege Acetyl-CoA als zentrales Zwischenprodukt lieferten. Darüber hinaus aktivierten

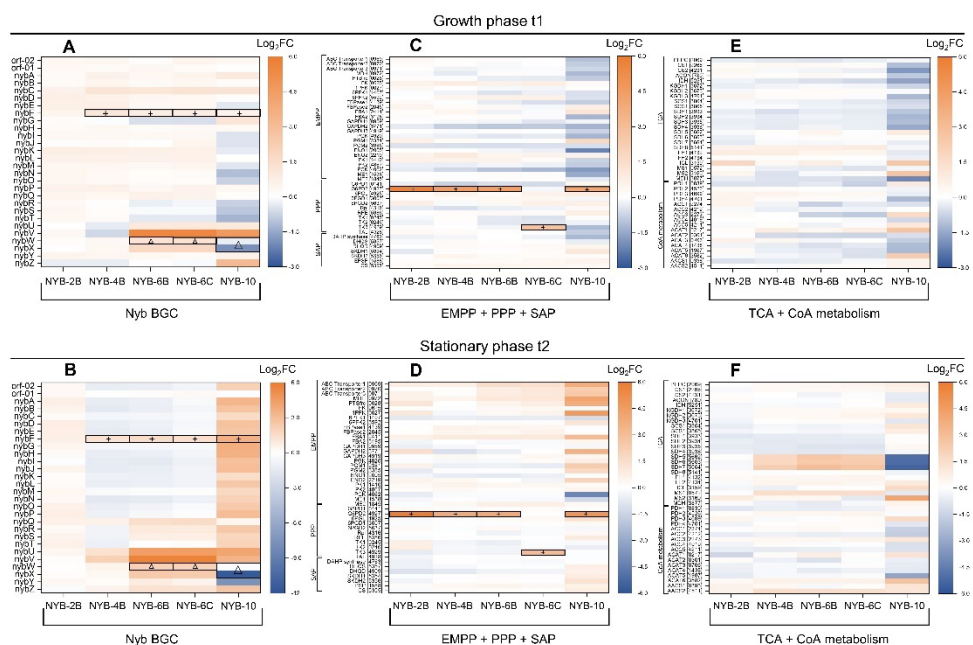
die Zellen Wege zur Synthese von Acetoacetyl-CoA aus Acetyl-CoA hoch. Die Nybomycin-Biosynthese erforderte Kohlenstoff auf CoA-Basis, so dass die aktivierte Acetyl-CoA-Versorgung insgesamt günstig erschien. Im Hinblick auf die Versorgung mit Vorstufen waren Gene, die für Enzyme des PP-Wegs und der Shikimat- und Chorismat-Route kodieren, während der Produktionsphase in ihrer Expression reduziert, was vermutlich die Versorgung mit 4-Aminoanthranilat für die Nybomycin-Biosynthese einschränkte.

Die Expression des Nybomycin-Clusters zeigte ein überraschendes Bild. Das Cluster war, während der nicht-produzierenden Wachstumsphase, stark exprimiert und während der Hauptphase der Nybomycin-Produktion deutlich herunterreguliert. Während der Hauptproduktionsphase waren fast alle Cluster-Gene in ihrer Expression reduziert (log<sub>2</sub>-fache Veränderungen bis zu -3,4), mit Ausnahme von *nybV*, das für den Nybomycin-Exporteur kodiert, und die mutmaßlichen Regulatoren *nybX*, *nybZ* und *nybY*. Dieses Verhalten erschien im Hinblick auf die Produktionsleistung als ungünstig. Normalerweise werden BGCs aktiviert, wenn die Zellen in die stationäre Phase eintreten und mit der Bildung von Naturstoffen beginnen, was als wichtiges Merkmal für die Produktion auf hohem Niveau angesehen wird. Die Daten lieferten wichtige Einblicke zur Verbesserung des Produzenten (AP4).

Im weiteren Verlauf wurden die Transkriptome ausgewählter Produzenten aus AP4 (Stämme der 2. Generation, der 4. Generation, der 6. Generation, der 10. Generation) verglichen, um Auswirkungen aufeinanderfolgender Runden der Stammentwicklung nachzuvollziehen (Abb. 5). Dies umfasste u.a. drei unterschiedlich leistungsfähige *zwf*-basierte Mutanten: NYB-2B (*zwf*), NYB-4B (*nybF zwf*) und NYB-6B ( $\Delta$ *nybW nybF zwf*). Die Analyse umfasste zudem auch das *tkf*-basierte Derivat NYB-6C ( $\Delta$ *nybW nybF tkf*), das jedoch mit NYB-6B fast identisch war, abgesehen von den beiden anders gestalteten Genen. Im Allgemeinen wurde festgestellt, dass die Zielgene (*nybF*, *zwf* und *tkf*) während der Wachstums- und Produktionsphase stark überexprimiert wurden, was zeigt, dass (i) der (in AP4 identifizierte *PkasOP\**-Promotor zuverlässig eine erhöhte Expression ermöglichte und (ii) die vorgenommenen genetischen Veränderungen tatsächlich die Nybomycin-Produktion erhöhten. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann der synthetische *PkasOP\**-Promotor und seine Derivate für metabolische Entwicklungsversuche in *S. albidoflavus* und verwandten Stämmen, die

eine wachstumsunabhängige konstitutive Überexpression von Zielgenen erfordern, als nützliches Werkzeug betrachtet werden.

Bemerkenswert war, dass die Deletion von *nybW* die Expression mehrerer stromaufwärts gelegener Clustergene, insbesondere *nybQRSTUV*, erhöhte, wobei der Anstieg bei *nybUV* viel höher war als bei den anderen Genen (Abb. 9B). Innerhalb des Clusters wurden die Gene *nybQRSTUV* in der gleichen Richtung transkribiert (Abb. 3) so dass ihre Expression augenscheinlich unter der Kontrolle des NybW-Repressors stand.



**Abb. 5. Globale Genexpression in verschiedenen Mutanten von *S. albidoflavus* 4N24 zur Überproduktion von Nybomycin.** Die Daten spiegeln die Unterschiede zwischen den Stämmen 4N24, NYB-2B, NYB-4B, NYM-6B und NYB-6C während der Wachstumsphase (13 Stunden) und der Hauptphase der Nybomycin-Produktion (70 Stunden) wider. Die Daten für den Basisproduzenten 4N24, der nach 13 Stunden analysiert wurde, dienen als Referenz. Die dargestellten Gene umfassen die Nybomycin-Biosynthese (A, D), den Emden-Meyerhof-Parnas (EMP)-, den Pentosephosphatweg (PP)- und den Shikimisäure-Weg (SA) (B, E) sowie den TCA-Zyklus und die mit dem Metabolismus der CoA-Thioester verbundenen Reaktionen (C, F). Die Enzyme wurden bestimmten Reaktionen auf der Grundlage von KEGG-Karten und Genannotationen, die während der RNA-Sequenzierung erhalten wurden, zugeordnet. Es ist zu beachten, dass (in den entsprechenden Stämmen NYB6B und NYB-6C) *nybW* nur teilweise deletiert wurde, um die assoziierte Promotorregion nicht zu beeinträchtigen und benachbarte Effekte auszuschließen. Die nachgewiesene *nybW*-Expression in NYB-6B und NYB-6C beweist daher die anhaltende Aktivität des Promotors, spiegelt aber nicht die Expression eines funktionellen NybW-Proteins wider. n=3. (für weitere Informationen siehe Stegmüller et al. 2023).

Im Vergleich zum Basisproduzenten wiesen die Stämme NYB-4B, NYB-6B und NYB-6C eine starke Abschwächung der anderen 18 Clustergene auf. Diese Veränderung deutet auf einen Engpass hin, der die Produktion einschränkt. Alle fortgeschrittenen Stämme wiesen aus unbekanntem Grund eine leicht erhöhte Expression von *nybXYZ* auf, das für zwei Regulatoren (*nybX*, *nybZ*) und ein kleines Protein (87 AA) mit unbekannter Funktion kodiert (Abb. 3). Da es sich bei den Regulatoren vermutlich um Repressoren handelt, könnte ihre Hochregulierung tatsächlich die beobachtete Herabregulierung der meisten Cluster-Gene verursacht haben, d. h. aller Gene, die nicht von *nybW* kontrolliert wurden. Die Expressionsdynamik deutete darauf hin, dass die vorhandenen Regulatoren zusammenwirkten oder voneinander abhingen, so dass die verbleibenden Repressor-Gene in den Einzelgen-Deletions-Mutanten das Cluster weiterhin unterdrücken konnten. Andererseits wirkten sich die genetischen Veränderungen des Primärstoffwechsels eher lokal auf die Expression des entsprechend gewählten Zielgens aus, verursachten aber keine breiteren Effekte, z. B. innerhalb der EMP- und PP-Wege, des TCA-Zyklus und verwandter Wege. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Gene, die für Enzyme kodieren, die dem veränderten Schritt im entsprechenden Stoffwechselweg vor- oder nachgeschaltet sind, ausreichend exprimiert wurden, um einen erhöhten Stofffluss zu ermöglichen. Die Daten wurden zur weiteren Stammverbesserung (AP4) genutzt.

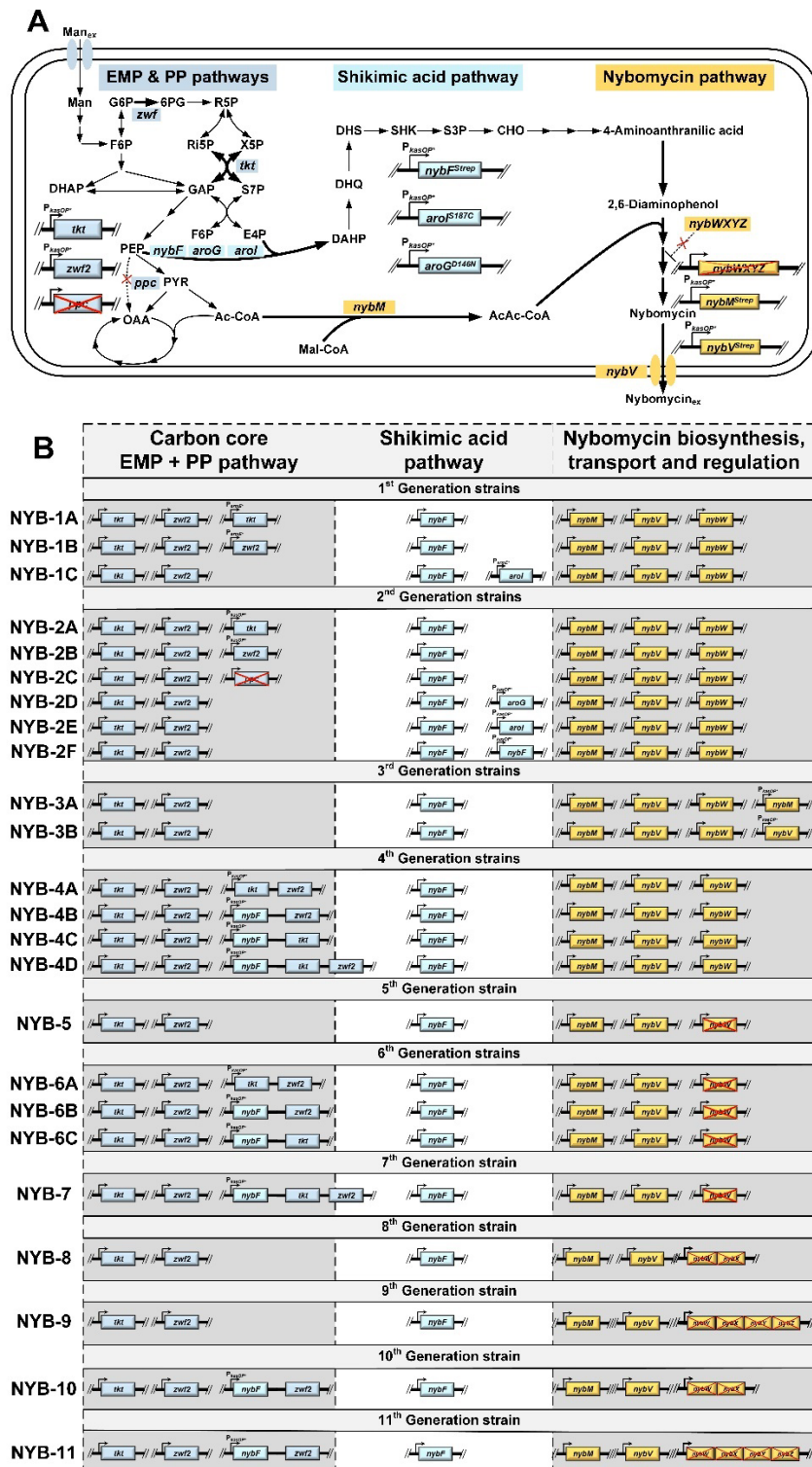
*Es wurden mit den Arbeiten alle iSBio-Meilensteine in AP 2 erreicht (MS09, MS10 und MS11). Es konnten durch die Fortschritte im Bereich Metabolic Engineering sogar deutlich umfangreichere systembiologische Analysen vorgenommen werden als ursprünglich vorgesehen.*

## 2.1.2 Metabolic Engineering (AP 4)

### 2.1.2.1 Strategischer Ansatz und Überblick über die entwickelte Stammfamilie

Ziel von AP3 am iSBio war die Entwicklung maßgeschneiderter Nybomycin-Produktionsstämme mittels Metabolic Engineering. Ausgangspunkt der Forschungsarbeiten war der von PharmBio bereitgestellte Basis-Produzent *S. albidoflavus* Del14 4N24. Im Verlauf des Projektes wurde mit Verbesserung der Produktionseigenschaften eine umfangreiche Familie Nybomycin-produzierender

Mutanten über 11 Generationen erzeugt, die in Abb. 6 zusammengestellt ist und deren schrittweise Entwicklung im Folgenden erläutert wird.



**Abb. 6. Strategie zur Herstellung von Nybomycin in *Streptomyces albidoflavus* Del14.** Die Übersicht veranschaulicht die Ziele des schrittweisen Metabolic Engineering im Primär- und Sekundärstoffwechsel (A) und den genetischen Aufbau der NYB-Stammfamilie über elf Entwicklungsgenerationen, die in dieser Arbeit entstanden sind (B). Für jeden Produzenten sind die genetischen Veränderungen gezeigt. Diese umfassten Modifikationen zur Versorgung mit Vorläufern,

d. h. die Überexpression von nativer Transketolase (*tkt*) und nativer Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf2*) im PP-Weg, die Deletion von Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ppc*) im EMP-Weg, die Überexpression von heterologen DHAP-Synthase-Varianten (*aroG*, *arol*, *nybF*) im Shikimisäure-Weg und die Überexpression von heterologer Acetoacetyl-CoA-Synthase (*nybF*). Darüber hinaus zielten die Veränderungen darauf ab, den Aufbau des Nybomycin-Moleküls und seinen Export zu verbessern. Dazu gehörten die Überexpression von *nybM* und *nybV* sowie die Deletion der Regulatorgene *nybW*, *nybX*, *nybY* und *nybZ*. Alle Änderungen wurden schrittweise in das Chromosom des Basis-Nybomycin-Produzenten *S. albidoflavus* 4N24 implementiert, das zuvor durch heterologe Expression des Nybomycin-Genclusters aus *S. albidoflavus subsp. chlorinus* gewonnen wurde (Rodriguez Estevez et al., 2018). Weitere Einzelheiten zum Genotyp der erzeugten Stämme sind in Stegmüller et al. (2023) zu entnehmen (dort Tabelle 1).

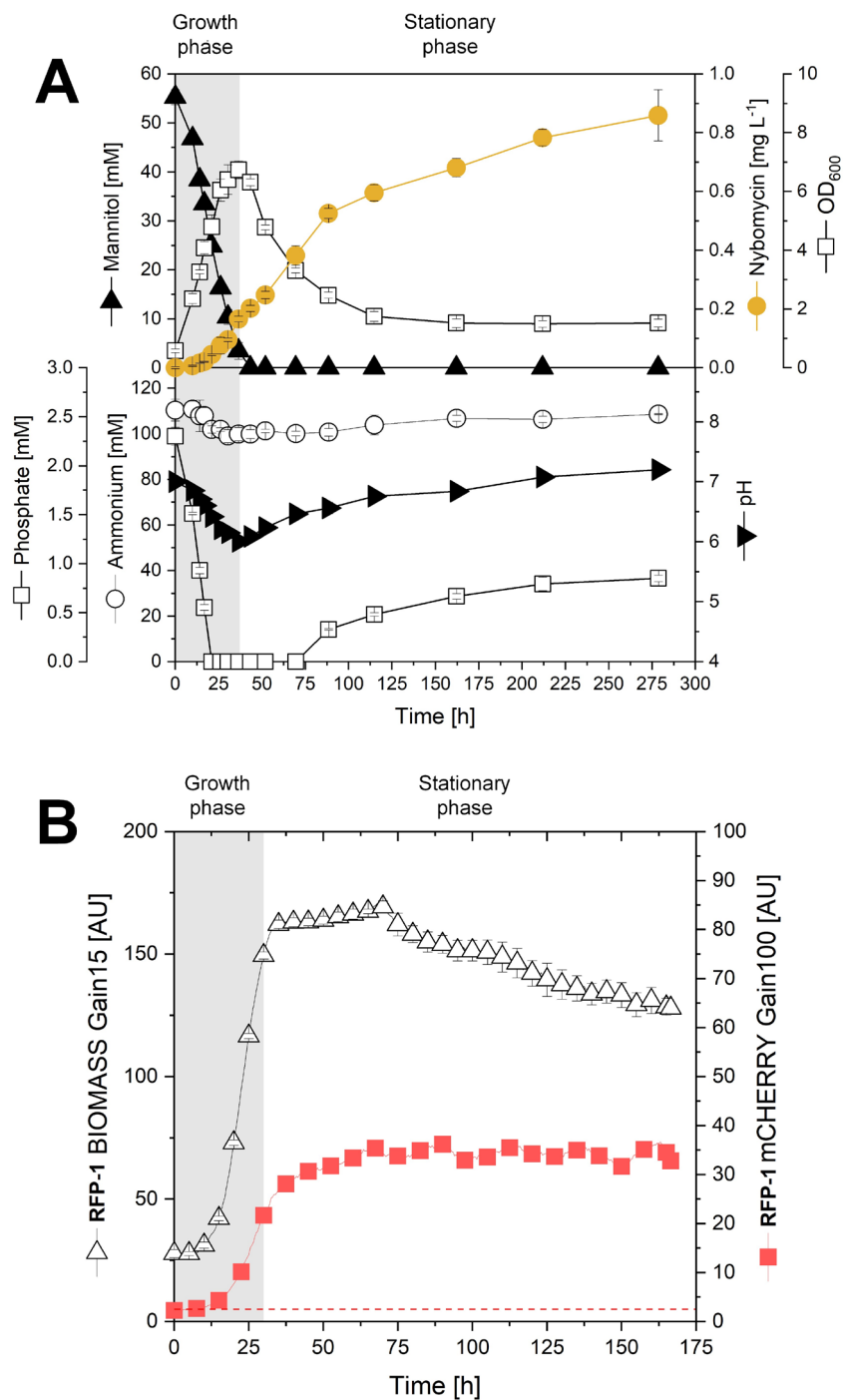
Dabei erfolgte die Etablierung der gentechnischen Methoden am iSBio in enger Zusammenarbeit mit PharmBio. Mit den Partnern wurde auch die weitere Optimierung ständig abgestimmt. Neue Erkenntnisse bei PharmBio und CeBiTec in AP1 und AP2 (zum minimalen Nybomycin-Cluster, zur Funktion einzelner Synthese-Gene, zur Funktionalität von Promotoren und zur Stoffwechselregulation) flossen iterativ in die Stamptoptimierung ein.

#### 2.1.2.2 Charakterisierung des Nybomycin-Basisproduzenten und erster Mutanten

Als Ausgangspunkt für die Stammentwicklung wurde die Nybomycin-Produktion im Basis-Produzenten untersucht. Mannitol wurde als Substrat gewählt, da es signifikant höhere Produktmengen als Glukose ermöglichte, wie es in jüngsten Studien auch an Oxytetracyclin-produzierenden Stämmen von *S. rimosus* beobachtet wurde (Beganovic et al., 2023). *S. albidoflavus* 4N24 bildete 860 µg L<sup>-1</sup> Nybomycin über 275 Stunden (Abb. 7A).

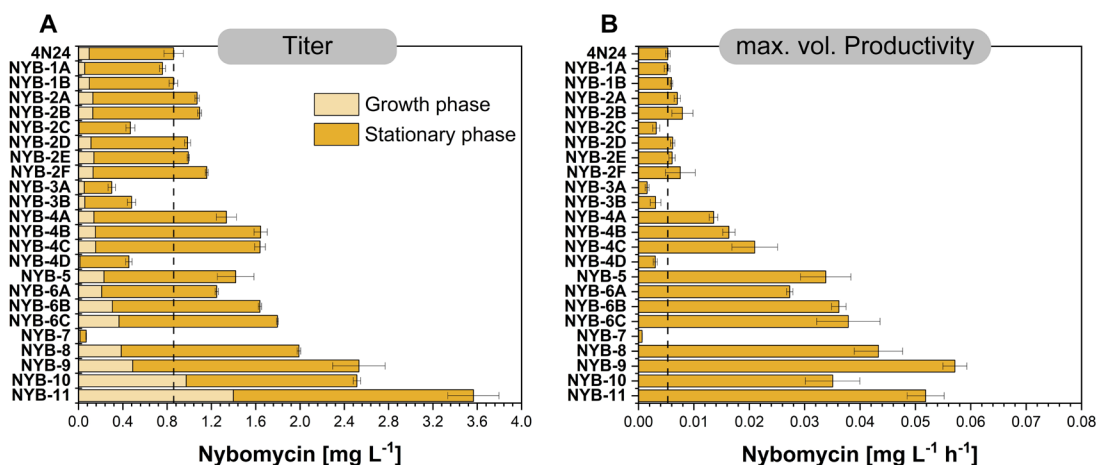
Nach der Inokulation begannen die Zellen exponentiell zu wachsen und verbrauchten dabei Mannitol, Ammonium und Phosphat. Innerhalb von 24 Stunden war das zugeführte Phosphat aufgebraucht. Die Zellkonzentration stieg weiter an, bis das Mannitol nach 32 Stunden aufgebraucht war, was dann zu einem Wachstumsstopp führte. Interessanterweise war Nybomycin während der Wachstumsphase nachweisbar, im Gegensatz zu den meisten Sekundärmetaboliten, die ausschließlich in der stationären Phase produziert werden. Der Produktionsstart wurde wahrscheinlich durch die gleichzeitig auftretende Phosphatlimitierung ausgelöst (Gläser et al., 2021b). Insgesamt wurden 20% des Nybomycins während der

Wachstumsphase gebildet. Die stationäre Phase erwies sich als die Hauptphase der Produktion (80 %).



**Abb. 7. Wachstum und Nybomycin-Produktion in *S. albidoflavus* 4N24.** Die Daten umfassen das Kultivierungsprofil in Schüttelkolben auf minimalem Mannitol-Medium (A) und die Aktivität des heterologen  $\text{PerME}^*$ -Promotors im Laufe der Zeit, die mit Hilfe eines fluoreszierenden Reporterstamms (*S. albidoflavus* 4N24  $\text{PerME}^*$  mCherry) und Online-Fluoreszenzmessung (B) bewertet wurde.  $n=3$ . Für ergänzende Informationen siehe Stegmüller et al. (2023).

Der PP-Stoffwechselweg und, weiter stromabwärts, der SA-Stoffwechselweg lieferten wie abgeleitet (Abb. 3). den gesamten Kohlenstoff zur Bildung von 2,6-Diaminophenol, dem Kernstück von Nybomycin. In einem ersten Schritt von Metabolic Engineering untersuchten wir das Potenzial, die Versorgung mit Vorstufen über den PP-Stoffwechselweg zu verbessern. Zwei native Gene des PP-Stoffwechselwegs wurden zur Überexpression ausgewählt: *tkt* (kodiert für Transketolase A im reversiblen Zweig) und *zwf2* (kodiert für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im oxidativen Zweig) (Abb. 6). Jedes Gen wurde separat unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *PermE\** (Garcia-Gutierrez et al., 2020) in das Chromosom von *S. albidoflavus* 4N24 integriert, was zu den Stämmen NYB-1A (4N24 *PermE\** *tkt*) und NYB-1B (4N24 *PermE\** *zwf2*) führte. Keine der beiden Mutanten zeigte jedoch eine verbesserte Produktion: NYB-1A erreichte einen Nybomycin-Titer von 760  $\mu\text{g L}^{-1}$ , während NYB-1B 860  $\mu\text{g L}^{-1}$  produzierte (Abb. 8).



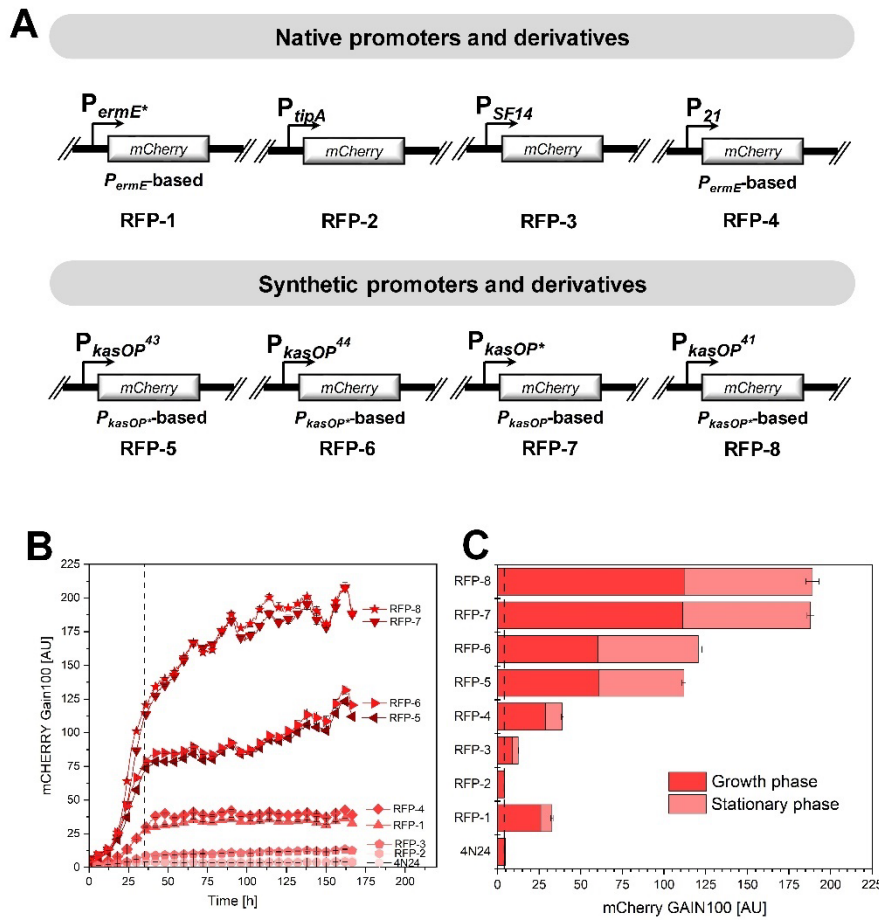
**Abb. 8. Metabolic Engineering von *Streptomyces albidoflavus* Del 14 für die Produktion von Nybomycin.** Während der Stammentwicklung wurde die Produktionsleistung der erzeugten Produzenten auf Minimalmedium mit 10 g L<sup>-1</sup> Mannitol als einziger Kohlenstoffquelle bewertet. Die Daten zeigen den endgültigen Nybomycin-Titer (A), wobei der Anteil des während der Wachstumsphase (hellorange Farbe) und der stationären Phase (stark orange Farbe) synthetisierten Produkts angegeben ist. Darüber hinaus ist die maximale volumetrische Nybomycin-Produktivität, die während des Prozesses beobachtet wurde, dargestellt (B). n=3.

Als nächstes wurde versucht, den Fluss durch den SA-Stoffwechselweg zu verbessern. Zu diesem Zweck wurde das Gen *aroIS187C* aus *C. glutamicum* für die heterologe Expression ausgewählt. Das Gen kodiert für eine rückkopplungsresistente

DAHP-Synthase (aro Typ-I DS) aus dem SA-Stoffwechselweg, die bereits erfolgreich zur Steigerung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren eingesetzt wurde (Liao et al., 2001). Der konstruierte Stamm NYB-1C (4N24 *PermE\** *aroIS187C*) (Abb. 6) unterschied sich jedoch nicht in der Nybomycin-Produktion (Daten nicht gezeigt). Es gab zwei Möglichkeiten, die etwas überraschende fehlende Verbesserung in den drei Stämmen zu erklären: (i) die Zielgene wurden unzureichend exprimiert und/oder (ii) die Nybomycin-Bildung war nicht durch das Vorläuferangebot begrenzt. Was den ersten Punkt betrifft, so ist *PermE\** ein bekannter Promotor, der bereits vielfach für die Genexpression in *Streptomyces* eingesetzt wurde (Chen et al., 2012; Huo et al., 2012; Kallifidas et al., 2018; Lu et al., 2016; Ma et al., 2020; Mo et al., 2019; van Wezel et al., 2000). Da die Stärke von Promotoren jedoch je nach den Bedingungen variieren kann und eine angemessene Promotorfunktionalität entscheidend erscheint, wurde *PermE\** genauer charakterisiert (Abb. 7B).

### 2.1.2.3 Promotorcharakterisierung

Zur Promotor-Charakterisierung konstruierten wir den Reporterstamm *S. albidoflavus* RFP-1 (4N24 *PermE\** mCherry). Das Konstrukt wurde über die  $\phi$ BT1-Integrationsstelle in das Chromosom integriert, was zur Expression von mCherry unter der Kontrolle von *PermE\** führte. Für die Integration verwendeten wir denselben Lokus wie für die oben gezeigten genetischen Ziele. Der erhaltene Reporterstamm wurde online auf Wachstum und Fluoreszenz analysiert. Interessanterweise wurde mCherry ausschließlich während der ersten 40 Stunden der Kultivierung, der Wachstumsphase, exprimiert (Abb. 3B). Die Fluoreszenz blieb während der gesamten stationären Phase unverändert, was eine bisher übersehene Abhängigkeit der *PermE\**-Aktivität vom Wachstumsstatus von *S. albidoflavus* aufzeigte (Myronovskyi und Luzhetskyy, 2016). In Bezug auf die Nybomycin-Produktion war die Dynamik der *PermE\**-Aktivität ungünstig. Die Verwendung dieses Promotors ermöglichte nicht die gewünschte Überexpression der Zielgene während der Hauptphase der Produktion, in der die kodierte Aktivität benötigt worden wäre. In einem nächsten Schritt suchten wir daher nach besseren Promotoren für die produktionsgekoppelte Genexpression (Abb. 9).



**Abb. 9. Bewertung heterologer Promotoren hinsichtlich ihrer Expressionseffizienz in *S. albidoflavus* 4N24 während des Nybomycin-Produktionsprozesses.** Jeder Promotor wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Reporterstamms und der Online-Erfassung der Fluoreszenz bewertet. Es wurde ein Satz von acht Promotoren getestet, darunter vier native und vier synthetische Varianten. Als Reporterprotein wurde in jedem Fall MCherry verwendet (A). Jeder Reporterstamm wurde im Hinblick auf die Dynamik der Expression auf minimalem Mannitol-Medium in einem miniaturisierten plattenbasierten Bioreaktor mit Online-Fluoreszenzsensor untersucht (B). Die Daten wurden verwendet, um die relative Expressionsstärke während des Wachstums (blassrote Farbe) und der stationären Phase (stark rote Farbe) abzuleiten (C). n=3. (weitere Informationen siehe Stegmüller et al. (2023).

Sieben alternative Promotoren wurden ausgewählt: der ThioStrepton-induzierbare Promotor *PtipA*, der eine beträchtliche nicht-induzierte Aktivität aufweist (Myronovskiy und Luzhetskyy, 2016), das mutierte *PermE\**-Derivat P21 (Siegl et al., 2013), der konstitutive, von Phagen abgeleitete Promotor PSF14 (Labes et al., 1997) und die deregulierte Promotorvariante *PkasOP\** und ihre synthetischen Derivate PSP41, PSP43 und PSP44 (Bai et al., 2015) (Abb. 7A). Jeder Promotor wurde vor mCherry

kloniert, und die jeweiligen Plasmide wurden in *S. albidoflavus* integriert, wodurch die Reporterstämme RFP-2 bis RFP-8 entstanden (Abb. 7A, Tabelle 1). Die Promotoren unterschieden sich stark in ihrem dynamischen Expressionsmuster (Abb. 7B, 7C). *PtipA* schien während der gesamten Kultur inaktiv zu sein, was darauf hindeutet, dass seine nicht-induzierte Aktivität im Gegensatz zu früheren Beobachtungen nicht signifikant war (Myronovskiy und Luzhetskyy, 2016). *PSF14* erwies sich als schwächer als *PermE\**, im Gegensatz zu dem, was bei *S. lividans* beobachtet worden war (Labes et al., 1997), was die Bedeutung einer fallspezifischen Bewertung unterstreicht. *P21* war ähnlich stark wie *PermE\**. Die Aktivität von *P21* und *PSF14* war fast vollständig auf die Wachstumsphase beschränkt. Keiner der alternativen Promotoren schien die Versorgung mit Vorläufern für die Nybomycin-Produktion effektiv zu ermöglichen.

Dieses Bild änderte sich, als die vier *PkasOP\**-basierten Promotoren analysiert wurden. Die beiden Varianten *PSP43* und *PSP44* erwiesen sich auf der Grundlage der Endfluoreszenz als dreifach aktiver als *PermE\** (Abb. 9). *PkasOP\** und sein synthetisches Derivat *PSP41* waren die beiden besten Promotoren, die die höchste Gesamtaktivität (siebenmal höher als *PermE\**) und vor allem eine konstant hohe Expression während des gesamten Kulturprozesses aufwiesen, einschließlich der stationären Phase, in der der größte Teil des Nybomycins hergestellt wurde.

#### 2.1.2.4 Optimierung der Nybomycin-Produktion in Stämmen der 3. bis 6. Generation

Der beste Promotor *PkasOP\** wurde zur Überexpression von *tkf* und *zwf2* verwendet, um die Versorgung mit dem PP-Weg-Zwischenprodukt E4P zu verbessern (Abb. 4B). Erfreulicherweise akkumulierten die beiden Mutanten NYB-2A (4N24 *PkasOP\** *tkf*) und NYB-2B (4N24 *PkasOP\** *zwf2*) 29% bzw. 31% mehr Nybomycin als der Elternstamm, d.h. 1.070 bzw. 1.095 µg L<sup>-1</sup> (Abb. 8). Gleichzeitig konnte die maximale spezifische Nybomycin-Produktionsrate um bis zu 50 % gesteigert werden (Abb. 9). Diese Verbesserung war in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Sie zeigte, dass die Synthese von Nybomycin durch das Angebot seiner zentralen Kohlenstoffkomponente begrenzt ist, und wies auf den hohen Wert von *PkasOP\** für die maßgeschneiderte Genexpression von produktionsunterstützenden Genen hin. Weitere neuen Mutanten NYB-2D (4N24 *aroGD146N*) und NYB-2E (4N24 *aroIS187C*) erzielten einen um 20 % höheren Nybomycin-Titer und eine um 15 % höhere Produktivität (Abb. 8). Ansätze

zur Überexpression von *nybF* und *nybV*, und sowie zur Deletion von *ppc* lieferten keine Verbesserung. Hingegen entkoppelte die Deletion des Regulators *nybW* die Produktion vom Wachstumszustand von *S. albidoflavus* und steigert die volumetrische Produktivität in Stämmen der fünften und sechsten Generation erheblich (Abb. 7, Abb. 8) (siehe dazu Stegmüller et al. 2023).

#### 2.1.2.5 Maximierte Produktion in Regulator-Mutanten der 10. und 11. Generation

Die in AP3 durchgeführten Transkriptom-Analysen entschlüsselten schließlich die Regulation des Clusters in den verbesserten Stämmen. Daraufhin wurde zu klären, der regulatorische Teil des Clusters modifiziert. Konkret wurden die Gene *nybWX* und *nybWXYZ* durch ein Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Die neuen Stämme NYB-8 (4N24  $\Delta nybWX$ ) und NYB-9 (4N24  $\Delta nybWXYZ$ ) wurden in Mannitol-Minimalmedium gezüchtet, nachdem die Richtigkeit der eingeführten Mutationen durch PCR und Sequenzierung überprüft worden war. NYB-8 akkumulierte 1.990  $\mu\text{g L}^{-1}$  an Nybomycin, während NYB-9 2.530  $\mu\text{g L}^{-1}$  bildete, bis zu dreimal mehr als der Basisstamm 4N24 (Abb. 8). Offenbar war die kombinierte Eliminierung von *nybW* plus *nybX* oder *nybW* plus *nybXYZ* erforderlich, um die natürliche Kontrolle außer Kraft zu setzen, während eine einzelne Deletion von *nybW*, *nybX*, *nybY* bzw. *nybZ* nicht ausreichte.

Alle gewonnenen Erkenntnisse wurden final zusammengeführt. Zu diesem Zweck wurden die deregulierten Clustermutanten NYB-8 und NYB-9 mit den besten Targets des Primärstoffwechsels ausgestattet. Die Transformation von NYB-8 und NYB-9 mit dem integrativen Plasmid *pBT1H-kasOP\*-nybF-zwf2* führte zu den neuen Stämmen NYB-10 (4N24  $\Delta nybWX$  *PkasOP\* nybF zwf2*) und NYB-11 (4N24  $\Delta nybWXYZ$  *PkasOP\* nybF zwf2*). Erfreulicherweise produzierten beide Zellfabriken mehr Nybomycin als jeder andere zuvor erzeugte Stamm (Abb. 8). Bei Tests in Batch-Kulturen akkumulierte NYB-10 2.510  $\mu\text{g L}^{-1}$  an Nybomycin, während NYB-11 sogar 3.570  $\mu\text{g L}^{-1}$  bildete, mehr als das Vierfache von 4N24. Die Zeit bis zum Erreichen des Spizentiters betrug bei beiden Stämmen ca. 200 h, im Vergleich zu 275 h bei dem Basisstamm 4N24.

Damit wurde insgesamt eine Familie hocheffizienter Zellfabriken für die Synthese von Nybomycin erzeugt, die im weiteren Verlauf zur Verfahrensentwicklung eingesetzt wurden (AP5).

Weiterhin wurde am iSBio das Substratspektrum von *S. albidoflavus* durch Metabolic Engineering erweitert, um Zuckergemische und Algenextrakte umfänglich nutzen zu können (siehe AP6).

*Es wurden alle vorgesehenen Meilensteine in AP4 erreicht: MS12, MS13, MS14, Verbesserte Stämme der 1. , 2. Und 3. Generation. Die Stammentwicklung konnte darüber hinaus bis zu Stämmen der 11. Generation weitergeführt werden.*

### 2.1.3 Fermentationsverfahren im Labormaßstab (AP5)

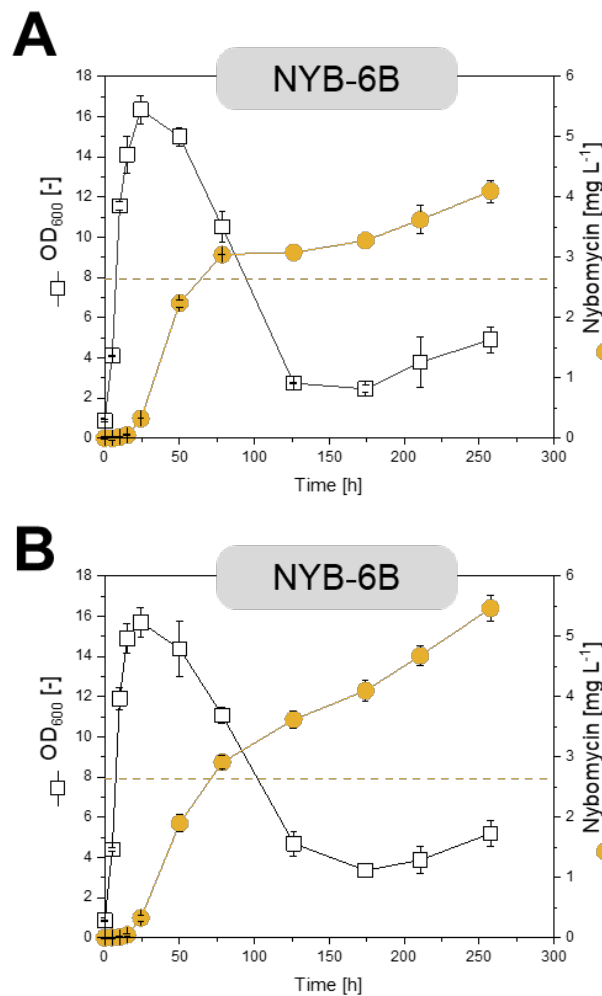
Im Folgenden wurde am iSBio Fermentationsexperimente zur Herstellung von Nybomycin auf Basis der neu entwickelten Zellfabriken (AP4) durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle wurde Mannitol gewählt, das bereits in ähnlichen Verfahren erfolgreich zum Einsatz kam und zudem den Hauptzucker der später anvisierten Produktion aus Algenextrakten darstellte (AP6).

#### 2.1.3.1 Optimierung der Prozessbedingungen

Der verbesserte Stamm *S. albidoflavus* NYB-6B wurde ausgewählt, um die Produktion zu etablieren. Dabei wurde zunächst DNPM-Medium auf Dextrin-Basis verwendet, ein komplexes Gemisch, das üblicherweise für die Bildung von Naturprodukten in *Streptomyces* gewählt wird (Ahmed et al., 2020; Estevez et al., 2020; Paulus et al., 2022), einschließlich der früheren Produktion von Nybomycin in *S. albidoflavus* 4N24 (Rodriguez Estevez et al., 2018).

Beim Wachstum auf einer Formulierung mit 40 g L<sup>-1</sup> Dextrin (DPNM 40) bildete der NYB-6B-Überproduzent 4,1 mg L<sup>-1</sup> Nybomycin, fast 60 % mehr als der Basisstamm. Interessanterweise fand die Produktion hauptsächlich während der ersten Wachstumsphase statt. Die Verwendung einer erhöhten Dextrin-Menge (75 g L<sup>-1</sup>)

fürte zu einer verlängerten Produktion und einem endgültigen Nybomycin-Titer von  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$  (Abb. 10).



**Abb. 10:** Wachstum und Nybomycin-Produktion bei *Streptomyces albidoflavus* NYB-6B auf DPNM-Medium mit  $40 \text{ g L}^{-1}$  (A) und  $75 \text{ g L}^{-1}$  Dextrin (B). Der Stamm wurde in Schüttelkolben kultiviert.  $n=3$ .

Als nächstes untersuchten wir den Stamm auf Minimalmedium mit erhöhtem Anfangsgehalt an Mannitol ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ,  $50 \text{ g L}^{-1}$ ,  $75 \text{ g L}^{-1}$ ) und Phosphat ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ) (Abb. 8). Der rekombinante Stamm schnitt in allen Versuchsanordnungen gut ab und erreichte beim höchsten getesteten Substratgehalt einen Nybomycin-Titer von  $7,2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $7.185 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), was eine insgesamt 8,3-fache Verbesserung der Produktion bedeutete. Je höher die Anfangskonzentration von Mannitol war, desto länger hielt die Nybomycin-Produktion an und desto höher war der Endtiter. Allerdings war das Wachstum der Zellen bei Verwendung von  $75 \text{ g L}^{-1}$  Mannitol leicht verzögert,

so dass die Produktion etwa 200 h benötigte. Bei 25 und 50 g L<sup>-1</sup> Mannitol wurde das Wachstum nicht beeinträchtigt, und die Biomasse wurde schnell aufgebaut, bis das Mannitol vollständig verbraucht war. Dementsprechend wurde der maximale Titer früher erreicht, was zu einer wesentlich höheren maximalen Produktivität führte. Bemerkenswert ist, dass das Produkt in allen Fällen in Gegenwart von Phosphat gebildet wurde; die deregulierte Clusterexpression ermöglichte diesen Produktionsphänotyp.

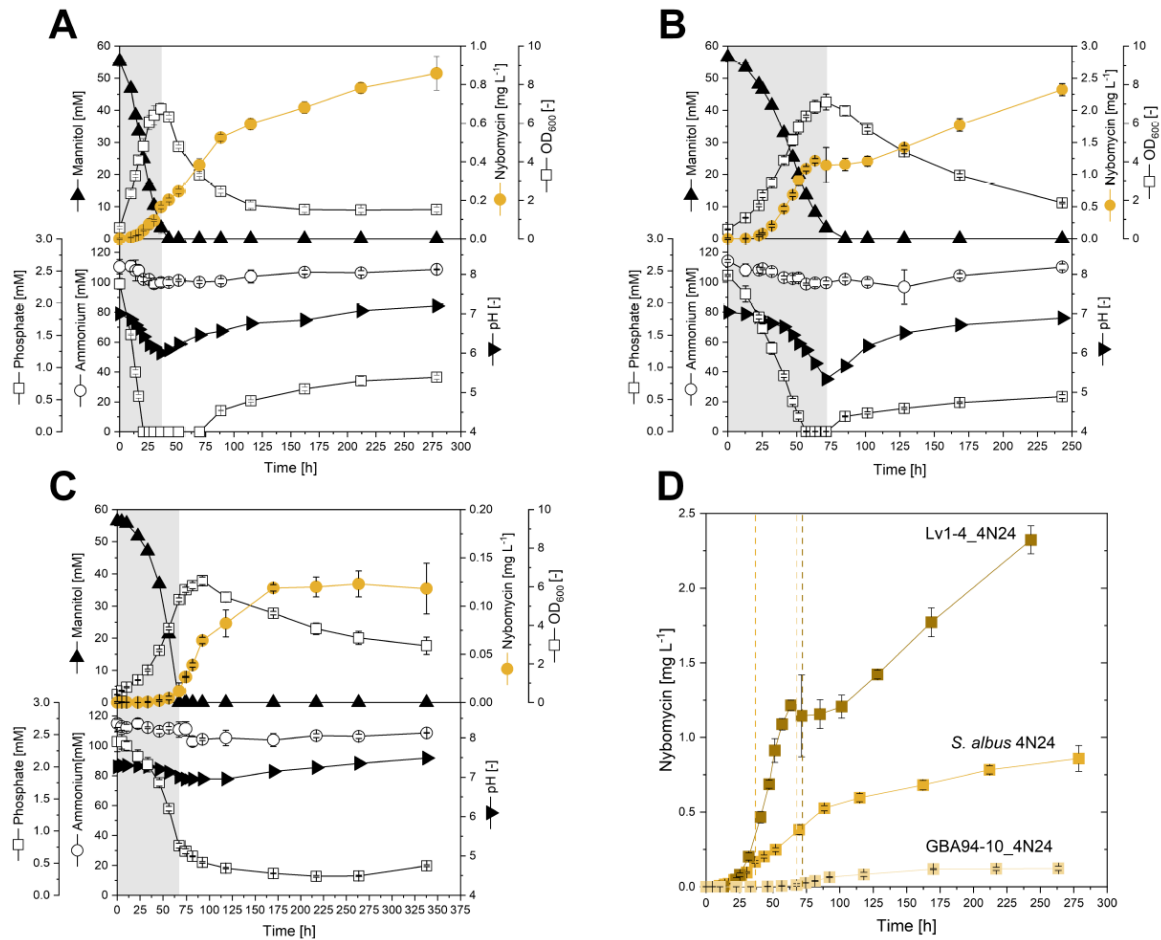
#### 2.1.3.2 Maximierte Produktion von Nybomycin

Zum Projektende wurden die besten Stämme NYB-8, NYB-9, NYB-10 und NYB-11 auf Minimalmedium mit 50 g L<sup>-1</sup> Mannitol getestet (Abb. 10). Alle Mutanten zeigten eine ausgezeichnete Produktionsleistung, wobei der Stamm NYB-11 in beiden Kulturphasen am besten abschnitt und den höchsten endgültigen Nybomycin-Titer von 12 mg L<sup>-1</sup> erreichte. Insgesamt konnte die Produktion von Nybomycin im Vergleich zum Ausgangsstamm bei hohen Ausgangssubstratgehalten fast um das Fünfzehnfache gesteigert werden. Dabei konnte ein schlankes Medium zum Einsatz kommen.

*Es wurden alle vorgesehenen iSBio-Meilensteine in AP5 erreicht: MS 18: Fermentationsprozess Labormaßstab Basis-Produzent. Das Verfahren wurde erfolgreich auf verbesserte Stämme übertragen und ermöglichte die Synthese von 12 mg L<sup>-1</sup> Nybomycin.*

#### 2.1.4 Produktion auf Basis von Algenrohstoffen (AP6)

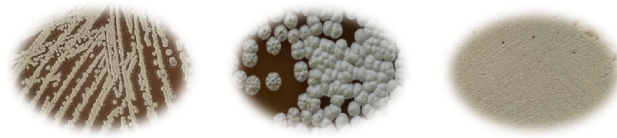
Wie Arbeiten von PharmBio zu Projektbeginn in AP1 und AP2 ergaben, waren neben *S. albidoflavus* auch andere Stämme potenziell zur heterologen Synthese von Nybomycin geeignet. Neben *S. albidoflavus* 4N24 wurden für die Produktion auf den Extrakten daher auch andere heterologe Wirte auf ihre Nybomycin Produktionsleistung bewertet. Diese wurden durch PharmBio erzeugt und am iSBio untersucht. Für die Untersuchungen wurde das zuvor verwendete definierte, auf Mannitol basierende Minimalmedium verwendet. *Streptomyces* sp. Lv1-4 4N24 bildete 2.320 µg L<sup>-1</sup> Nybomycin in 250 Stunden Wachstum (Abb. 11), erheblich mehr als *S. albidoflavus* 4N24.



**Abb. 11: Kultivierungsprofile heterologer Nybomycin-Produzentenstämmen.** Die Daten repräsentieren Stämme *S. albidoflavus* 4N24 (A), Lv1-4 4N24 (B) und GBA94-10 4N24 (C), die in minimalem Mannitol-Medium kultiviert wurden. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen dar.

Das zugesetzte Phosphat war nach etwa 56 Stunden aufgebraucht und leitete den Übergang zur stationären Phase ein, bis Mannitol nach etwa 75 Stunden verbraucht war. Dabei wurde schon während der exponentiellen Wachstumsphase Nybomycin produziert. Interessant ist, dass mehr als die Hälfte (55 %) des gesamten Nybomycins während dieser Phase gebildet wurde, während nur 45 % während der stationären Phase produziert wurde (Abb. 12). Der Stamm 94-10 4N24 produzierte im Vergleich nur 123  $\mu\text{g L}^{-1}$  Nybomycin. Zwischen den drei Produzenten wurden insgesamt große Unterschiede in Bezug auf Wachstum und Produktion beobachtet (Tabelle 2).

**Tabelle 2. Vergleich von *S. albidoflavus* 4N24, Lv1-4 4N24 und GBA94-10 4N24.**



	<b><i>S. albus</i> 4N24</b>	<b>Lv1-4_4N24</b> marine, Ukrainian coast	<b>94-10_4N24</b> marine sponge, Trondheim fjord
Nybomycin [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<b>859</b>	<b>2,322</b>	<b>123</b>
Cultivation time [h]	250	250	225
Production in % growth ph.	20	55	10
Production in % stationary ph.	80	45	90
spec. growth rate $\mu$	0.10	0.04	0.03
Generation time [h]	6.7	15.6	20.1

*S. albidoflavus* 4N24 zeigte das schnellste Wachstum. Darüber hinaus war dieser Stamm leicht zu handhaben und wies nur eine schwache Pellet-Bildung auf, was Kultivierung und Produktgewinnung vereinfachte. Lv1-4 4N24 zeigte langsames Wachstum, aber den höchsten Produkttiter. Dabei erwies sich der Stamm bezüglich Gentechnik als schwieriger in der Handhabung. Die Integration von Fremd-DNA in das Genom mittels eines Rekombinase-Systems erwies sich im Allgemeinen möglich. Weitere Tests ergaben jedoch eine geringere Transformationseffizienz im Vergleich zu *S. albus*. Eine Modifikation durch homologe Rekombination mit dem pKG1132hyg Suizidvektor erwies sich in ersten Versuchen als nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Hier sind zukünftig weitere Optimierungen notwendig.

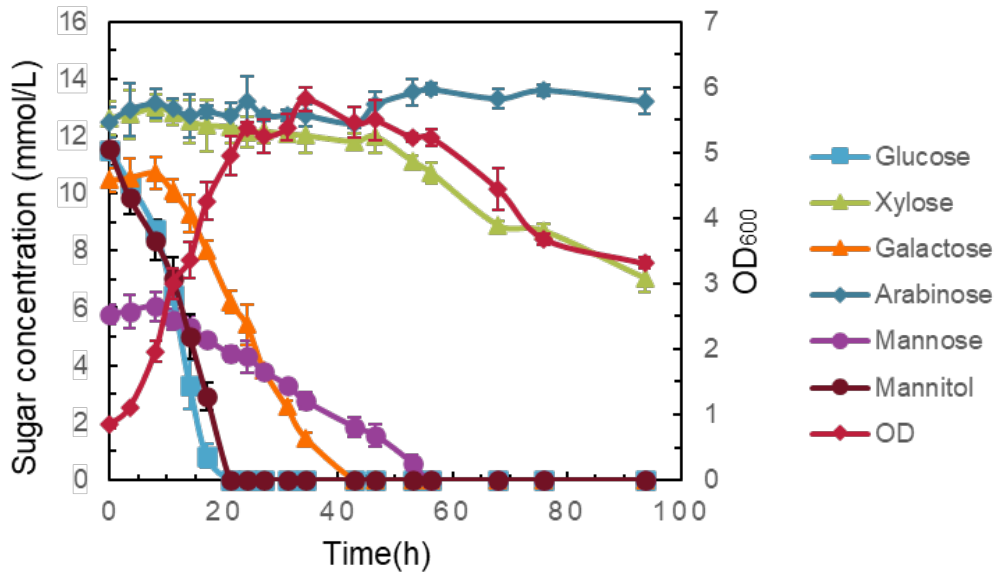
Als Nächstes wurde die Substratverwertung untersucht, da die erwarteten Extrakte diverse Zucker erhalten sollten und es wichtig erschien, das Potenzial der Stämme zur möglichst weitgehenden Nutzung des Kohlenstoffs zu bewerten. LV1-4 und GBA 94-10 konnten ein breites Spektrum an Zuckern verwerten (Tabelle 3). Allerdings war LV-14 nicht in der Lage, effektiv Pentosen zu nutzen. Xylose wurde nur langsam verbraucht, Arabinose konnte durch den Stamm nicht genutzt werden. Auch *S. albidoflavus* war nicht in der Lage, Arabinose zu verwerten. Für die Verwertung /Xylose-/Arabinose-haltiger Extrakte bedeutete dies, dass zusätzliche gentechnische Modifikationen notwendig sein würden.

**Tabelle 3. Substratspektrum von Lv1-4 4N24 und GBA94-10 4N24.**

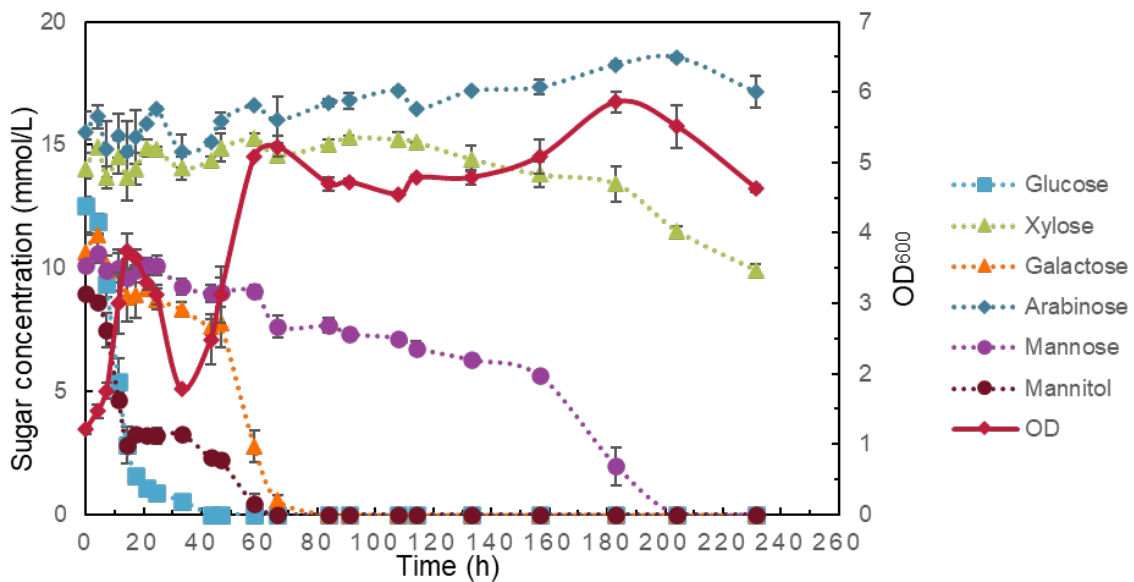
Sugar	LV1-4		GBA 94-10	
	Fresh water	Sea water	Fresh water	Sea water
Glucose	+++	+++	+++	++
Arabinose	-	-	+++	++
Fructose	+++	+++	+	++
Galactose	+++	+++	++	++
Mannitol	+++	+++	+++	+++
Xylose	+	+	++	++
Fucose	-	-	-	-
Mannose	+	++	+++	++
Rhamnose	-	-	-	-

Bei Kultivierung auf einer synthetischen Mischung von Zuckern bestätigte sich das Bild der breiten Nutzung von Substraten. Bis auf Arabinose und Xylose wurden alle anderen Zucker effizient verstoffwechselt (Abb. 12). Im Folgenden wurde das Verhalten des Stammes auf einem Salzwassermedium getestet, dem höhere Anteile an Meerwassersalzen zugesetzt waren (Tabelle 4). Auch hier zeigte sich eine effektive Substratnutzung (Abb. 13).

In weiteren Experimenten mit längerer Laufzeit wurde dann die Nybomycin-Produktion auf artifiziellem Süßwasser- sowie auf Salzwassermedium durch den Stamm LV1-4 untersucht (Abb. 14). Der Stamm wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen inkubiert. Dabei wurden über 5 mg/L Nybomycin in Süßwasser- und 4 mg/L in Salzwassermedium akkumuliert. Bezüglich der Substratnutzung ergab sich das zuvor gesehene Bild.



**Abb. 12:** Kultivierungsprofil des heterologen Nybomycin-Produzenten *S. Lv1-4 4N24* auf einer synthetischen Zuckermischung in Süßwassermedium. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen dar.



**Abb. 13:** Kultivierungsprofil des heterologen Nybomycin-Produzenten *S. Lv1-4 4N24* auf einer synthetischen Zuckermischung in Salzwassermedium. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen dar.

Tabelle 4. Zusatz von Salzen in artifiziellem Meerwassermedium.

Chemikalie	Konzentration (g/L)
NaCl	27.13
MgCl <sub>2</sub>	2.50
MgSO <sub>4</sub>	3.38
CaCl <sub>2</sub>	1.17
KCl	0.74
NaHCO <sub>3</sub>	0.21

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Glukose bevorzugt verstoffwechselt wurde. Mannose und Galaktose wurde erst nach dem Verbrauch der Glukose von den Zellen verwertet. Insgesamt war die Produktionsleistung vielversprechend für die spätere Nutzung von Algen-Hydrolysaten.

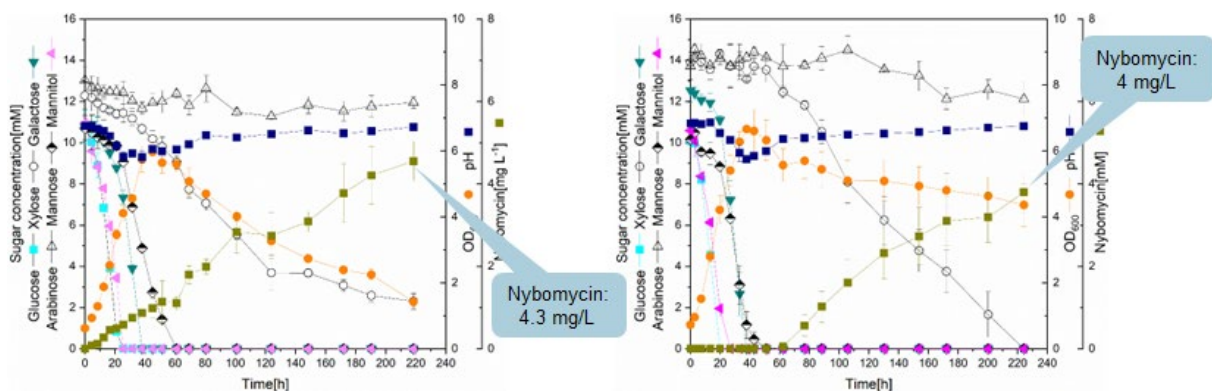
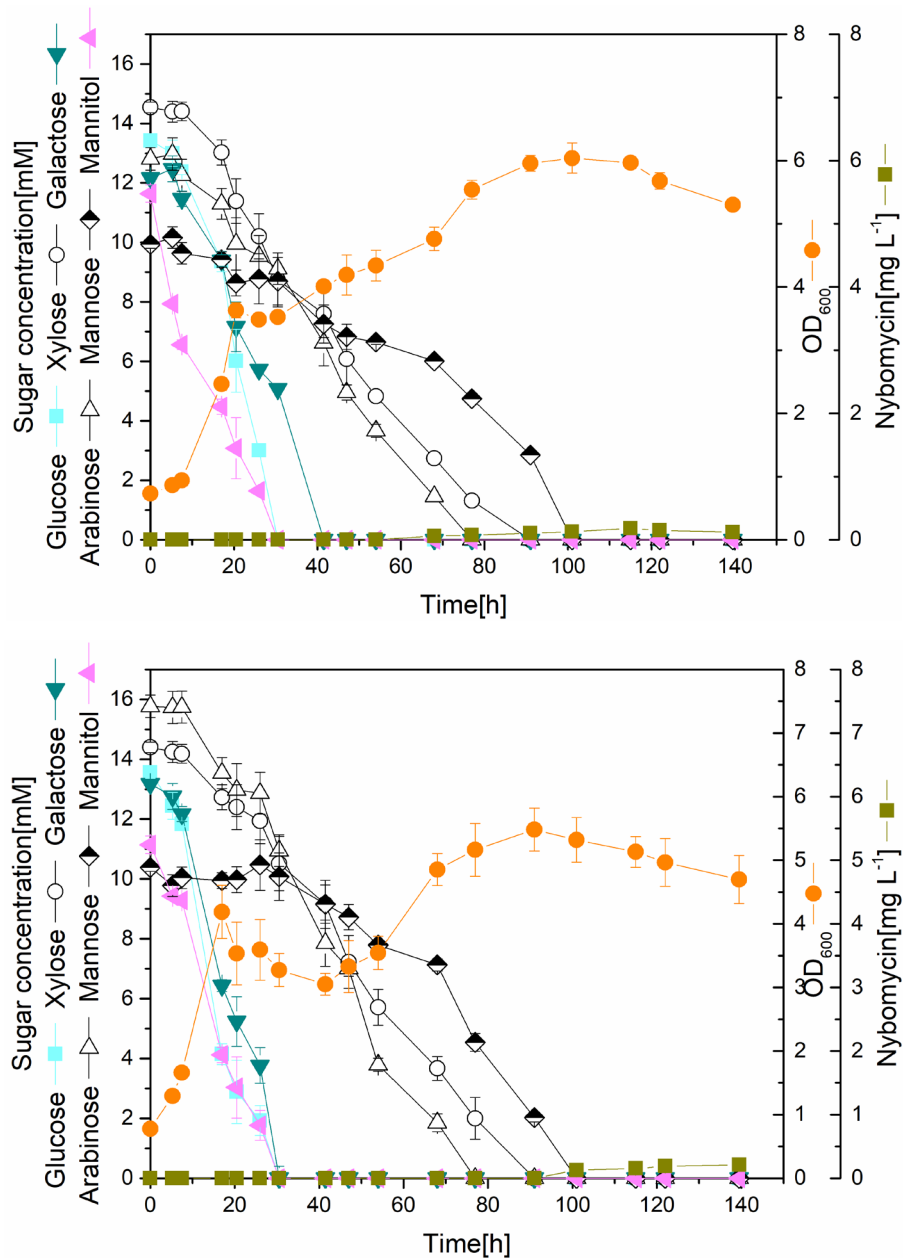


Abb. 14: Kultivierungsprofil des heterologen Nybomycin-Produzenten S. Lv1-4 4N24 auf einer synthetischen Zuckermischung in Salzwassermedium. Die rechte Graphik zeigt den Verlauf über die ersten 60 Stunden der Kultur. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen dar.

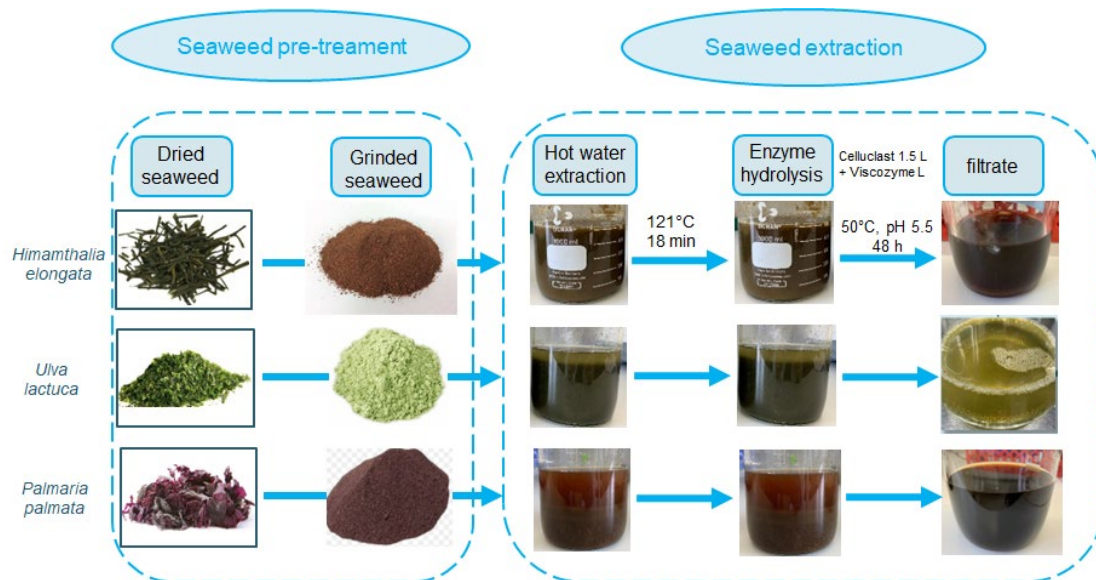
Zum Vergleich wurden Stamm *Streptomyces sp.* 94-10 sowie ein weiteres Isolat (94-07) auf die Produktion von Nybomycin in Salzwassermedium getestet. Es zeigte sich, dass keiner der beiden Stämme auch nur im Ansatz an die Leistungsfähigkeit von LV1-4 herankam (Abb. 15) und unterstrichen dessen Ausnahmestellung.



**Abb. 15:** Kultivierungsprofil der heterologen Nybomycin-Produzenten *Streptomyces sp.* 94-07 4N24 (oben) und 94-10 4N24 (unten) auf einer synthetischen Zuckermischung in Salzwassermedium. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen dar.

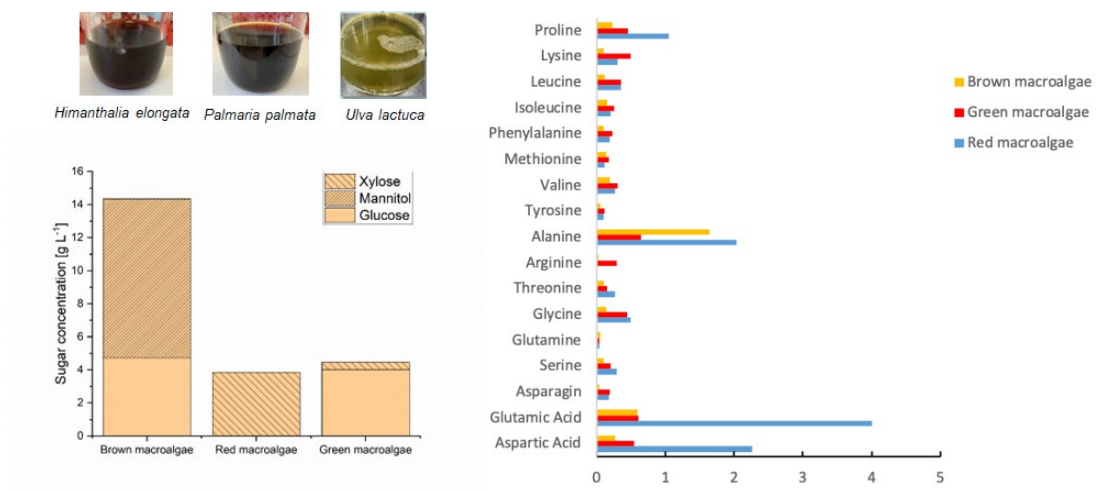
Es wurden nun Prozesse zur Extraktion mariner Makroalgen etabliert, um die realen Rohmaterialien für den Einsatz zur Nybomycin-Produktion testen zu können.

Getrocknete Algen wurden dazu zunächst mechanisch zerkleinert. Das Algenpulver wurde dann einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen (Hoffmann et al. 2021). Es gelang die Erzeugung zuckerreicher Hydrolysate aus der Braunalge *Himanthalia elongata*, der Rotalge *Palmaria palmata* und der Grünalge *Ulva lactuca* (Abb. 16).



**Abb. 16. Extraktion mariner Makroalgen.** Prozessübersicht und Verfahrensschritte.

Braunalgen lieferten die größte Zuckerausbeute und ein Gemisch von Mannitol und Glucose (Abb. 17). Der Aufschluss der Rotalgen ergab einen Xylose-reichen Extrakt, während die Grünalge eine Glucose-Xylose-Mischung ergab. Alle Extrakte enthielten zudem ein breites Spektrum an Aminosäuren, die als zusätzliche Nährstoffe in Betracht kamen.



**Abb. 17. Extraktion mariner Makroalgen.** Übersicht über die dabei gewonnenen Mengen an Zuckern (links) und Aminosäuren (rechts).

Abschließend gelang die Produktion von Nybomycin durch LV1-4 auf allen Algen-Extrakten (Abb. 18). Die Produktion auf dem Braunalgenextrakt war am höchsten (3.5 mg/L nach 70 etwa Stunden). Dabei wurden die Zuckersubstrate effektiv verbraucht. Auf dem Rotalgenextrakt wurde wie erwartet Glucose komplett verbraucht, während Xylose weitgehend ungenutzt blieb.

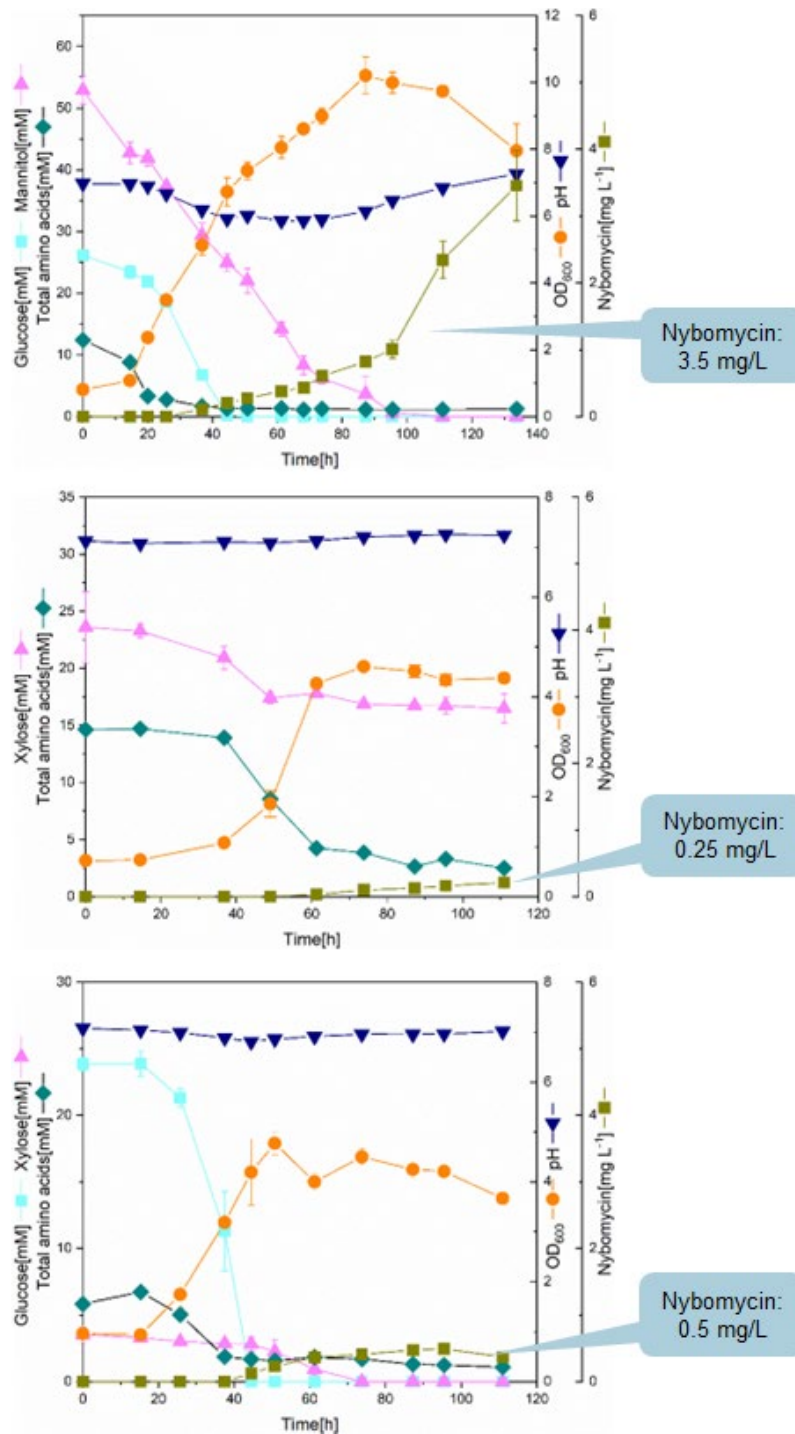


Abb. 18. Demonstration der Produktion von Nybomycin auf Basis von enzymatisch gewonnenen Extrakten mariner Makroalgen. Braunalge (oben), Rotalge (mitte). Grünalge (unten).

*Es wurden alle Meilensteine in AP6 erreicht (MS18, Produktion von Nybomycin auf Basis Algenrohstoffe).*

#### 2.1.5 Replikation (AP7)

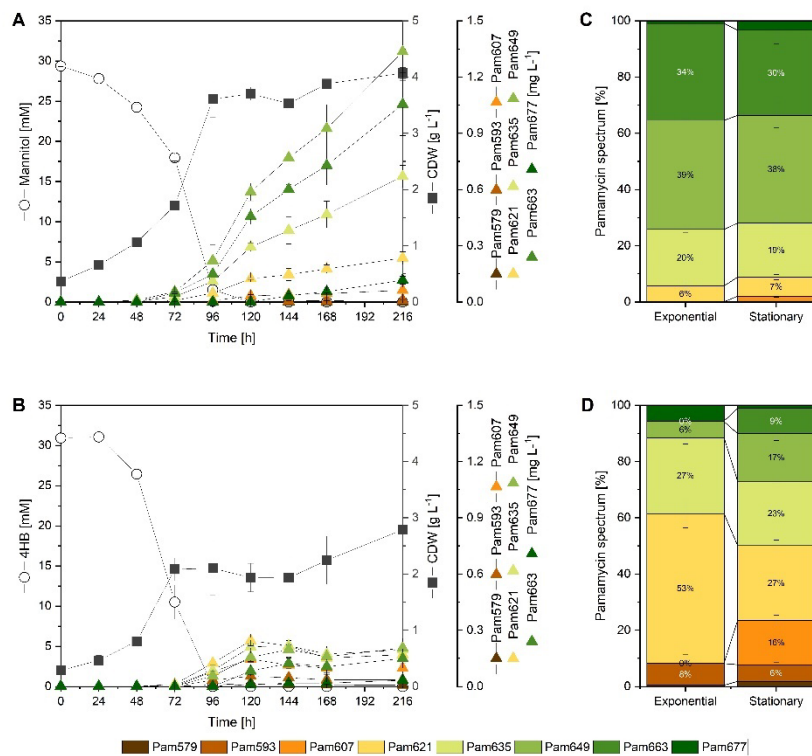
In AP7 sollten die gewonnenen Erkenntnisse und entwickelten Technologien zur Demonstration des Plattformcharakters der Projektarbeiten für weitere Anwendungen repliziert werden. Komplementär zu den Arbeiten bei PharmBio in WP7, die schwerpunktmäßig auf die Synthese eines weiteren Naturstoffes abzielten, wurden am iSBio weitergehende Studien im Bereich der Nutzung nachhaltiger mariner Rohstoffquellen für die Produktion von Wirkstoffen durch andere Bakterienstämme vorgenommen.

##### *2.1.5.1 Heterologe Naturstoffproduktion aus Algenextrakten mittels *S. lividans**

Zunächst wurde die Produktion des Insektizids Pamamycin aus einem Algen-Hydrolysat mit Hilfe des für die Produktion metabolisch veränderten Stammes *S. lividans* ΔYA8-R2 untersucht. Vorversuche hatten ergeben, dass Pamamycin aus dem bei erwarteten Hauptbestandteil Mannitol gut zugänglich war (Abb. 19).

Die Braunalge *Himantalia elongata*, welche signifikantes kommerzielles Potenzial aufweist, wurde im Weiteren als Ausgangsmaterial ausgewählt. Die getrockneten Algen wurden zerkleinert und mittels enzymatischer Behandlung unter leicht sauren Bedingungen (pH 5,5) behandelt. Dabei entstand ein wässriges Hydrolysat, das mit Mannitol (20 mM) und Glukose (14 mM) angereichert war, die beide als Nebenprodukte des Hydrolyse-Prozesses anfielen (Abb. 20).

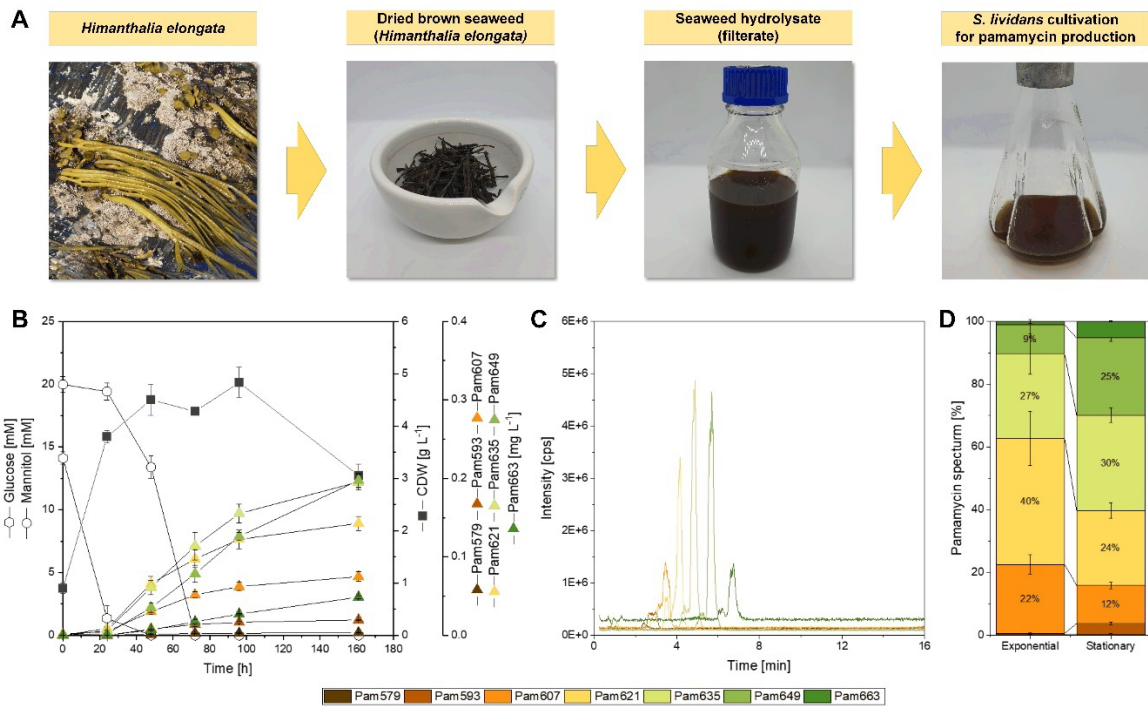
Nach Neutralisierung diente das Hydrolysat als einzige Nährstoff-Quelle für die Produktion von Pamamycin. Nach Beimpfung mit dem Stamm ΔYA8-R2 erfolgte eine sequenzielle Nutzung der beiden Kohlenstoffquellen. Zunächst wurde Glucose verbraucht, was zu einem Anstieg der Biomassekonzentration auf 4 g L<sup>-1</sup> führte, während die gesamte Pamamycin-Produktion 0,02 mg L<sup>-1</sup> erreichte (Abb. 20).



**Abb. 19. Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstum und die Pamamycin-Produktion in *S. lividans* ΔYA8-R2.** Der rekombinante Stamm wurde in Minimalmedium gezüchtet, das entweder 30 mM Mannitol (A) oder 30 mM 4-Hydroxybenzoat (4HB) (B) enthielt. Außerdem ist das Spektrum der gebildeten Pamamycine für die mittlere Exponentialphase (72 h) und die stationäre Phase (216 h) auf Mannitol (C) und 4HB (D) angegeben. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen (n=3) dar.

In der anschließenden Mannitol-Phase setzte sich das Zellwachstum fort, begleitet von einer beschleunigten Pamamycin-Synthese bis zu einem Titer von 0,7 mg L<sup>-1</sup>.

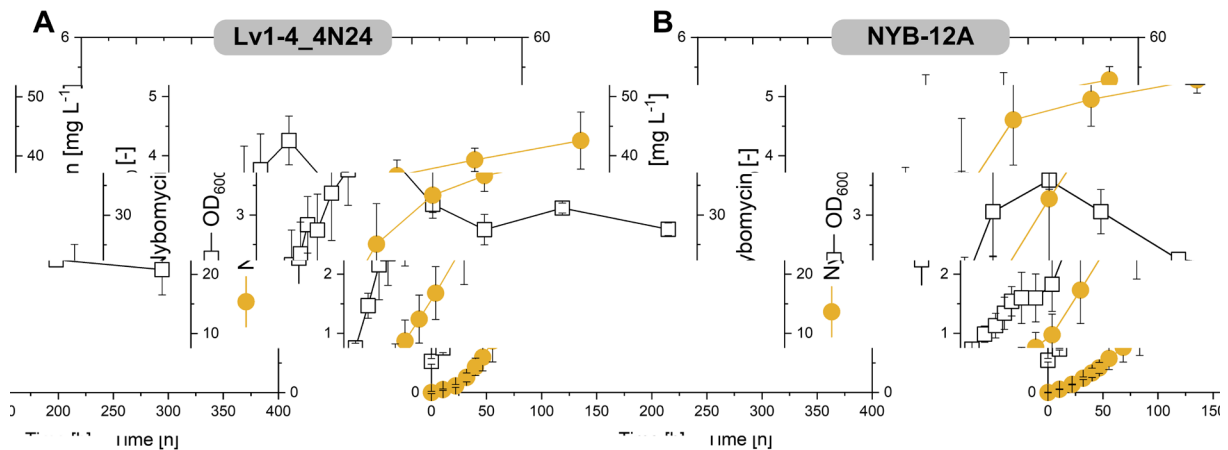
Bemerkenswert ist, dass die beiden unterschiedlichen Kulturphasen zu Variationen im Pamamycin-Spektrum führten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nutzung von Algen-Hydrolysat als brauchbares Rohmaterial für die Pamamycin-Produktion aus *S. lividans* gezeigt werden konnte, was ein breiteres Potenzial dieser marinen nachhaltigen Ressource für die zukünftige Wirkstoff-Produktion in Aussicht stellt.



**Abb. 20. Herstellung von Pamamycin aus einem Algen-Hydrolysat mit *S. lividans*  $\Delta$ YA8-R2.** Das Hydrolysat wurde aus getrockneten *Himanthalia elongata* [112] hergestellt (Foto von *H. elongata*: Willem VK, Saxifraga) (A). Der rekombinante Stamm wurde auf einfachem Seetang-Hydrolysat kultiviert, nachdem der pH-Wert auf 7,0 eingestellt worden war (B). Die Pamamycine in der Kulturbrühe wurden mittels LC-MS/MS analysiert (C). Außerdem sind die Spektren der Pamamycin-Derivate während der mittleren exponentiellen Phase (24 h) und der stationären Phase (96 h) dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen ( $n=3$ ) dar.

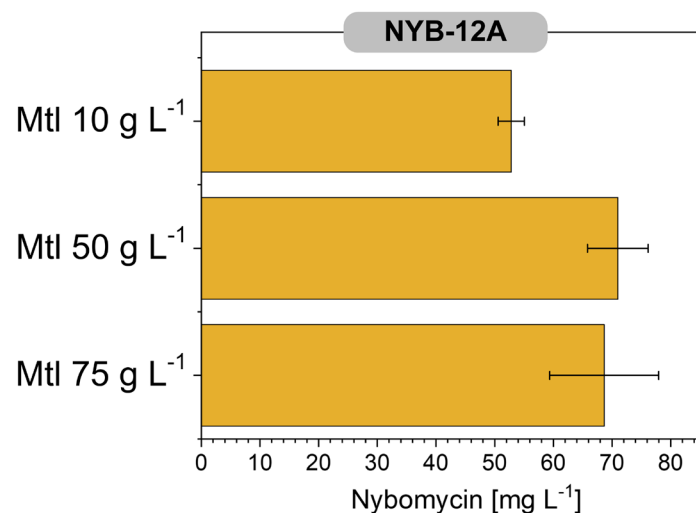
### 2.1.5.2 Etablierung von *Streptomyces* sp. LV1-4 als neue marine Naturstoff-Zellfabrik

Da Lv1-4 4N24 offenbar ein effizienter Produzent von Nybomycin war, wurde die Strategie des Metabolic Engineering, die bei *S. albus* 4N24 erfolgreich angewandt wurde, nun auch für den Stamm Lv1-4 getestet. Zu diesem Zweck wurde das BAC 4N24  $\Delta$ nybW in den Stamm Lv1-4 integriert, was zu Stamm NYB-12A führte. Anschließend wurden beide Lv1-4-basierten Stämme in einem modifizierten Minimalmedium mit  $10 \text{ g L}^{-1}$  Mannitol gezüchtet. Unerwarteterweise zeigten Lv1-4 4N24 und NYB-12A eine massiv verbesserte Nybomycin-Produktion in dem adaptierten Minimalmedium, mit Titern von  $43 \text{ mg L}^{-1}$  bzw.  $53 \text{ mg L}^{-1}$ . Wie bei *S. albidoflavus* führte die Deletion von *nybW* zu einer signifikant verbesserten Produktion (Abb. 21).



**Abb. 21: Zeitprofile für Wachstum und Nybomycin-Produktion von Lv1-4\_4N24 Basisproduzent und gentechnisch verändertem Stamm NYB-12A.** Die Daten sind Mittelwerte Werte und entsprechende Standardabweichungen von drei biologischen Wiederholungen.

Da der Stamm NYB-12A den höchsten Nybomycin-Titer aufwies, wurden die Mannitol- und Phosphatkonzentrationen angepasst, um den Bioprozess weiter zu verbessern. Dafür wurden die besten Bedingungen aus dem *S. albus*-Prozess gewählt: Mannitol 50 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup> und Mannitol 75 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g L<sup>-1</sup>. Nach 400 Stunden Wachstum erreichte der Stamm NYB-12A einen Endtiter von etwa 70 mg L<sup>-1</sup> für beide Bedingungen, 50 g L<sup>-1</sup> und 75 g L<sup>-1</sup> Mannitol. Dieser Wert stellt die weltweit bislang höchste bekannte Produktionsmenge mittels mikrobieller Synthese dar (Abb. 22).



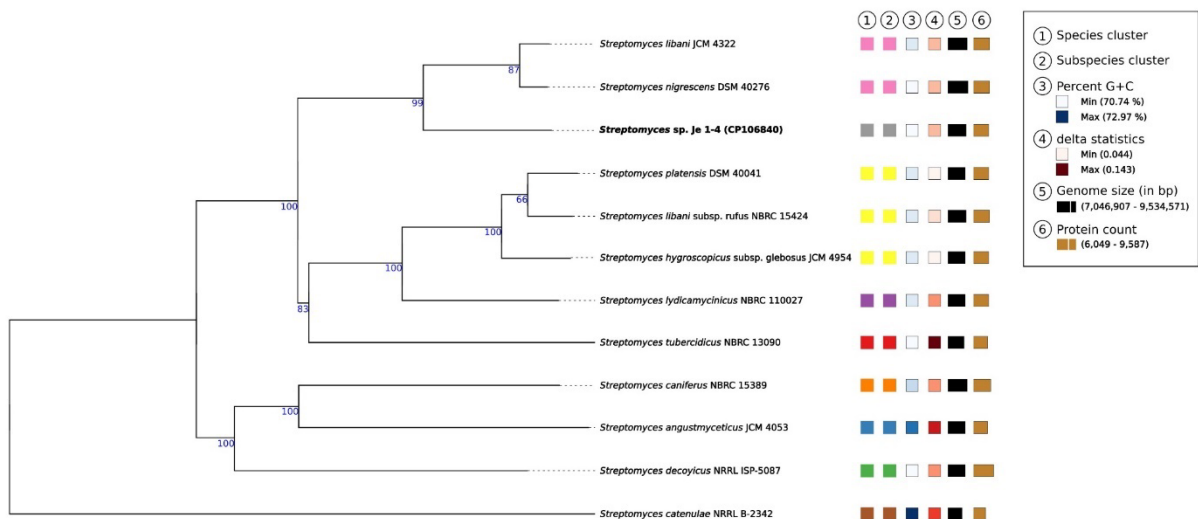
**Abb. 22: Nybomycin-Produktion von Stamm NYB-12A mit verschiedenen Mannitol-Konzentrationen.** Die Daten stellen Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten dar.

### 2.1.5.3 Taxonomische Beschreibung von *Streptomyces* sp. LV1-4 als neue Art

Aufbauend wurden in Zusammenarbeit mit PharmBio, dem CeBiTec und der Universität Lwiw (Ukraine) taxonomische Untersuchungen des dort einstmals isolierten Stammes LV1-4 vorgenommen. Diese ergaben, dass es sich bei dem Isolat um eine neue, bisher nicht beschriebene Art handelt.

Die Sequenz des 16S rDNA-Gens von Stamm Je 1-4T wurde dafür durch die Partner am CeBiTec mit der EzBioCloud 16S-Datenbank abgeglichen. Es zeigte die größte Ähnlichkeit mit dem Gen von *S. nigrescens* NBRC 12894T (99,93 % bis 99,86 %), *S. libani* ssp. *libani* NBRC 13452T (99,93 % bis 99,86 %), *Streptomyces angustmyceticus* NRRL B 2347T (99,93 % bis 99,79 %), *Streptomyces tubercidicus* DSM 40261T (99,86 % bis 99,79 %) und *Streptomyces lydicamycinicus* NBRC 110027T (99,86 % bis 99,72 %). Da sich die 16S-rDNA-Ähnlichkeit allein als unzureichend für eine angemessene Klassifizierung erwies, wurde am CeBiTec zusätzlich eine genombasierte Phylogenie-Analyse mit dem Type Strain Genome Server (TYGS) durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Genomsequenz von *S. nigrescens* NBRC 12894T, die nicht auf dem Server verfügbar war, mit dem oben beschriebenen Arbeitsablauf (CP114203, CP114204) bestimmt. Die digitale DNA-DNA-Hybridisierung (dDDH) der Genomdaten ergab, dass das neue Isolat Je 1-4T zwar mit *S. libani* ssp. *libani* und *S. nigrescens* verwandt ist, sich aber von beiden Stämmen unterscheidet. Die entsprechenden dDDH-Werte von 66,6 % und 66,7 % lagen deutlich unter dem Grenzwert (70 %), der für die Abgrenzung der Arten verwendet wird (Abb. 23). Interessanterweise ergab die Analyse jedoch, dass *S. libani* ssp. *libani* und *S. nigrescens* wahrscheinlich die gleiche Art darstellen (dDDH 92,0 %).

Alle drei Stämme wuchsen gut auf den Medien ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5 und ISP 7. Auf dem Medium ISP 6 zeigte LV1-4 ein schlechtes Wachstum, während die beiden anderen Stämme nicht wuchsen (iSBio). LV1-4 bildete auf allen getesteten Medien Substratmyzel. Aeriales Myzel wurde auf allen Medien beobachtet, außer auf ISP 6. Im Allgemeinen wurden keine diffusionsfähigen Pigmente nachgewiesen. LV1-4 bildete gerade bis gebogene Sporenketten mit glatter Oberfläche, wie Elektronenmikroskopie-Untersuchungen der Universität Lwiw ergaben.



**Abb. 23: Phylogenetischer Baum, abgeleitet mit FastME 2.1.6.1 aus GBDP-Distanzen, berechnet aus Genomsequenzen.** Die Zweiglängen sind in Bezug auf die GBDP-Abstandsformel  $d_5$  skaliert. Die Zahlen über den Zweigen sind GBDP-Pseudo-Bootstrap-Unterstützungswerte  $> 60\%$  aus 100 Replikationen, mit einer durchschnittlichen Zweigunterstützung von  $87,5\%$ .

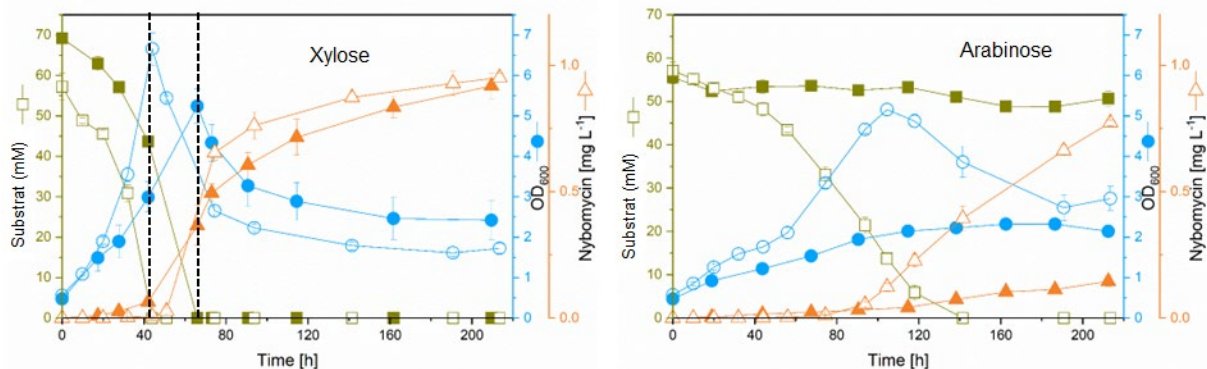
Die am iSBio ermittelten metabolischen Eigenschaften von LV1-4 im Vergleich zu *S. libani* und *S. nigrescens* sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Analyse führte zur Beschreibung von *Streptomyces explomaris* sp. nov. als neue Art: *Streptomyces explomaris* (ex.plo.ma'ris. N.L. gen. n. explomaris, von EXPLOMARE, benannt nach dem öffentlich finanzierten Projekt, das seine taxonomische Einordnung ermöglichte). Grampositiver, aerober Actinomycet, der ein weit verzweigtes Substrat-Myzel bildet, das Lufthyphen trägt, die sich in gerade bis biegsame Sporenketten differenzieren. Er wächst in einem Temperaturbereich von 25 bis 45 °C, optimal bei 25-30 °C. Er wächst bei einem pH-Wert von 6 bis 8, optimal bei pH 7. Außerdem zeigt er sich in Gegenwart von bis zu 2,5 % w/v Natriumchlorid widerstandsfähig. Er produziert alkalische Phosphatase, Esterase (C4), Esterase-Lipase (C8), Leucin-Arylamidase, Valin-Arylamidase, Cystin-Arylamidase, saure Phosphatase und Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase, wie durch den API-ZYM-Test bestimmt. Es verstoffwechselt Glukose, Mannitol, Fruktose, Xylose, Saccharose, Inositol und Raffinose, ist aber nicht in der Lage, Cellulose, Arabinose und Rhamnose zu nutzen. Das Peptidoglykan der Zellwand enthält LL-Diaminopimelinsäure. Hydrolysate ganzer Zellen enthalten hauptsächlich Galaktose und Ribose. Das Genom des Typstamms besteht aus einem linearen Chromosom mit einer Größe von 8.866.687 bp und einem G+C-Gehalt von 70,9 %.

**Tabelle 5: Unterschiedliche Stammmerkmale.** Stämme 1:LV1-4; 2: *S. libani* ssp. *libani* NBRC 13452T; 3: *S. nigrescens* NBRC 12894T. +, positiv; -, negativ. Alle Stämme sind positiv für Glucose, Mannitol, Fructose, Xylose, Saccharose, Inositol und Raffinose und negativ für Cellulose, Arabinose und Rhamnose. DPG: Diphosphatidylglycerin; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerin; PI: Phosphatidylinositol; AGL: Aminoglykolipid; APL: Aminophospholipid; AL: Aminolipid; GL: Glykolipid; PL: Phospholipid.

Characteristic	1	2	3
Cultural			
On ISP 2 agar			
Growth	Good	Good	Good
Color of colony	Cement grey	Cement grey	Silver grey
On ISP 3 agar			
Growth	Good	Good	Good
Color of colony	Moss grey	Silver grey	Silver grey
On ISP 4 agar			
Growth	Good	Good	Good
Color of colony	Black grey	Green grey	Green grey
On ISP 5 agar			
Growth	Good	Good	Good
Color of colony	Cement grey	Telegrey	Traffic grey
On ISP 6 agar			
Growth	Sparse	None	None
Color of colony	Beige		
On ISP 7 agar			
Growth	Good	Good	Good
Color of colony	Beige	Traffic white	Green grey
Carbon utilization			
N-Acetylglucosamine	+	+	-
D-cellobiose	+	-	-
Gentiobiose	+	+	-
L-fucose	+	+	-
Optimum growth temperature (°C)	25-30	25-37	25-37
NaCl for growth (%)	0-2.5	0-5	0-7.5
Major menaquinones (%)			
MK9 H <sub>4</sub>	+	+	+
MK9 H <sub>6</sub>	+	+	+
MK9 H <sub>8</sub>	-	-	-
Fatty acids component (%)			
iso-C <sub>14:0</sub>	2.3	3.3	4.3
iso-C <sub>15:0</sub>	7	7.4	6.5
anteiso-C <sub>15:0</sub>	14.3	13.2	11.6
C <sub>15:0</sub>	1.2	-	-
anteiso-C <sub>15:0</sub> 2OH	1.4	1.1	-
iso-C <sub>16:1</sub> H	2.3	3.1	3.3
iso-C <sub>16:0</sub>	24.1	28.3	35.4
C <sub>16:1</sub> ω/7c	4.0	3.8	3.4
C <sub>16:0</sub>	5.8	5.2	6.0
iso-C <sub>17:1</sub> ω/7c	4.5	4.2	3.1
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω/7c	4.2	3.6	2.8
iso-C <sub>17:0</sub>	5.7	5.3	4.4
anteiso-C <sub>17:0</sub>	15.6	12.5	10.3
C <sub>17:0</sub> cyclo ω/7c	1.3	1.3	1.3
iso-C <sub>18:1</sub> H	1.0	1.1	1.1
Polar lipids	DPG, PE, PG, PI, 2APLs, 2PLs, GL	DPG, PE, PG, PI, 2APLs, PL, GL	DPG, PE, PG, PI, 3APLs, PL, GL

#### 2.1.5.4 Metabolic Engineering von *S. albidoflavus* zur verbesserten Substratnutzung.

Wie gezeigt, konnte *S. albidoflavus* nicht alle Zucker die potenziell in Algenextrakten vorliegen, verwerten. Xylose wurde nur schwach abgebaut, Arabinose gar nicht verwertet. Für den zukünftigen Einsatz ist jedoch eine möglichst vollständige Nutzung der Rohstoffe gewünscht. Vor diesem Hintergrund wurde als Proof-of-Concept zur Verbesserung des Substratspektrums die Xylose und Arabinose-Verwertung in *S. albidoflavus* verbessert. Dazu wurde ein entsprechendes Gen-Cluster erarbeitet, welches die nötigen Stoffwechsel-Enzyme und ein Transportprotein unter Kontrolle des synthetischen KasOP-Promotors enthielt, konstruiert und im Genom des Bakteriums eingebaut. Erfreulicherweise konnte der neue Stamm die beiden Pentosen effektiv nutzen. Xylose wurde deutlich schneller genutzt, Arabinose erstmals als C-Quelle genutzt werden. In beiden Fällen resultierte daraus eine erhebliche bessere Nybomycin-Bildung (Abb. 24).



**Abb. 24: Metabolic Engineering von *S. albidoflavus* 4N24 zur Nutzung von Xylose und Arabinose.**

Die Daten zeigen Wachstum und Nybomycin-Produktion des Ausgangsstammes 4N24 (volle Symbole) und des veränderten Stammes 4N24 *ara xyl*.

*Es wurden alle Meilensteine in AP7 erreicht, sowohl die erfolgreiche Demonstration weiterer Naturstoffe (siehe PharmBio) (MS21) als auch die Etablierung neuer mariner Produktionsstämme sowie die übergreifende Wertschöpfung mariner Algenextrakte*

## 2.1.6 Zusammenfassung

Bemerkenswerterweise zeigen Verbindungen aus der Naturstoffklasse der Nybomycine eine starke Wirksamkeit gegen resistente *Staphylococcus aureus* und Enterokokken in Mausmodellen. Darüber hinaus zeigten Nybomycine eine antibiotische Wirksamkeit gegen *Mycobacterium tuberculosis* sowie eine Vielzahl anderer grampositiver und gramnegativer Bakterien und verschiedene Krebszelllinien, während das Überleben normaler menschlicher Fibroblasten nicht beeinträchtigt wird. Für die weitere Forschung ist eine ausreichende Versorgung mit diesen Wirkstoffen erforderlich. Vor diesem Hintergrund konzentrierten wir uns in diesem Teilprojekt auf die Produktion von Nybomycin, einem neuartigen Antibiotikum marinen Ursprungs mit kommerziellem Potenzial. Für Nybomycin existiert bislang kein wirtschaftliches Herstellungsverfahren. In einem innovativen integrierten Konzept aus Systembiologie, Metabolic Engineering und Bioprozessentwicklung wurde in diesem Teilprojekt daher ein effizientes Verfahren zur Nybomycin-Produktion etabliert. Die während der Entwicklung erhaltenen rekombinanten Stämme wurden sorgfältig charakterisiert, um das optimale genetische Set-Up zu identifizieren. Nach mehreren Runden der Optimierung akkumulierten heterologe Stämme von *S. albidoflavus* das Zielprodukt aus Nybomycin auf einem definierten Mannitol-Medium in größerer Menge. Die Übertragung der besten Synthesemodule auf das neuartige marine Isolat *Streptomyces* sp. LV1-4 ermöglichte dann eine weitere Verbesserung. In Kombination mit der Entwicklung eines geeigneten Herstellungsverfahrens konnte die Produktion auf etwa 70 mg/L gesteigert werden, was den weltweiten Stand der Technik deutlich übertrifft und die Weiterentwicklung des vielversprechenden Wirkstoffs deutlich vereinfacht. Das Isolat *Streptomyces* sp. LV1-4 wurde mit der Universität Lwiw (Ukraine) taxonomisch als neue Art klassifiziert und steht für weitere Anwendungen in der Naturstoffproduktion eine interessante Zellfabrik dar. Zudem gelang die Darstellung von Naturstoffen aus Basis von Algen-Extrakten als nachhaltige Rohstoffe marinen Ursprungs. Zusammenfassend hat das Projekt erfolgreich die umfassende nachhaltige Nutzung mariner Ressourcen gezeigt. So wurde biotechnologische Produktion mariner Naturstoffe unter Verwendung mariner *Streptomyces*-Stämme mit maßgeschneiderten Synthesewegen auf Basis mariner Algenextrakt-Rohstoffe demonstriert. Die erreichte Leistung setzt einen Meilenstein für die zukünftigen industrielle Entwicklung zur Herstellung dieser wichtigen Substanzklassen.

## 2.1.7 Literatur

Die hier genannten Referenzen (23-168) sind neben dem Bericht auch ergänzend der Publikation Stegmüller et al. (2023) sowie der zugehörigen Dissertation zu entnehmen (siehe 2.6). Zu Referenzen 1-22 siehe Abschnitt 1 des Berichts.

- Ahmed, Y., Rebets, Y., Estevez, M. R., Zapp, J., Myronovskyi, M., Luzhetskyy, A., 2020. Engineering of *Streptomyces lividans* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Cell Fact.* 19, 5.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 53, 1565-74.
- Arai, M., Kamiya, K., Pruksakorn, P., Sumii, Y., Kotoku, N., Joubert, J. P., Moodley, P., Han, C., Shin, D., Kobayashi, M., 2015. Anti-dormant mycobacterial activity and target analysis of nybomycin produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorg Med Chem.* 23, 3534-41.
- Bai, C., Zhang, Y., Zhao, X., Hu, Y., Xiang, S., Miao, J., Lou, C., Zhang, L., 2015. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 12181-6.
- Bardell-Cox, O. A., White, A. J. P., Aragon, L., Fuchter, M. J., 2019. Synthetic studies on the reverse antibiotic natural products, the nybomycins. *Medchemcomm.* 10, 1438-1444.
- Barton, N., Horbal, L., Starck, S., Kohlstedt, M., Luzhetskyy, A., Wittmann, C., 2018. Enabling the valorization of guaiacol-based lignin: Integrated chemical and biochemical production of cis,cis-muconic acid using metabolically engineered *Amycolatopsis* sp ATCC 39116. *Metab Eng.* 45, 200-210.
- Becker, J., Klopprogge, C., Herold, A., Zelder, O., Bolten, C. J., Wittmann, C., 2007. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*--over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J Biotechnol.* 132, 99-109.
- Becker, J., Klopprogge, C., Wittmann, C., 2008. Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 7, 8.
- Becker, J., Kuhl, M., Kohlstedt, M., Starck, S., Wittmann, C., 2018. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of cis, cis-muconic acid from lignin. *Microb Cell Fact.* 17, 115.
- Becker, J., Zelder, O., Hafner, S., Schroder, H., Wittmann, C., 2011. From zero to hero-Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab Eng.* 13, 159-168.
- Bednarz, B., Kotowska, M., Pawlik, K. J., 2019. Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Microbiol Biotechnol.* 103, 6423-6434.
- Beganovic, S., Ruckert-Reed, C., Sucipto, H., Shu, W., Glaser, L., Patschkowski, T., Struck, B., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Wittmann, C., 2023. Systems biology of industrial oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*: the secrets of a mutagenized hyperproducer. *Microb Cell Fact.* 22, 222.
- Bibb, M. J., White, J., Ward, J. M., Janssen, G. R., 1994. The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol Microbiol.* 14, 533-45.
- Blower, T. R., Williamson, B. H., Kerns, R. J., Berger, J. M., 2016. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 113, 1706-1713.
- Bobek, J., Mikulová, A., Šetinová, D., Elliot, M., Čihák, M., 2021. 6S-Like scr3559 RNA Affects Development and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *Microorganisms.* 9.
- Chen, D., Zhang, Q., Cen, P., Xu, Z., Liu, W., 2012. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Appl Environ Microbiol.* 78, 5093-103.
- Christmann, J., Cao, P., Becker, J., Desiderato, C. K., Goldbeck, O., Riedel, C. U., Kohlstedt, M., Wittmann, C., 2023. High-efficiency production of the antimicrobial peptide pediocin PA-1 in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* using a microaerobic process at acidic pH and elevated levels of bivalent calcium ions. *Microb Cell Fact.* 22, 41.
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., Palmieri, M., 2020. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 98, 4-14.

Deguchi, T., Fukuoka, A., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., Ban, Y., Kawada, Y., 1997. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 699-701.

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., Zhao, X., 2009. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 9, 981-98.

Egawa, K., Yamori, T., Nosaka, C., Kunimoto, S., Takeuchi, T., Nos, K., 2000. Deoxynybomycin is a selective anti-tumor agent inducing apoptosis and inhibiting topoisomerase I. *Biol Pharm Bull.* 23, 1036-40.

Estevez, M. R., Gummerlich, N., Myronovskiy, M., Zapp, J., Luzhetskyy, A., 2020. Benzanthric Acid, a Novel Metabolite From *Streptomyces albus* Del14 Expressing the Nybomycin Gene Cluster. *Front Chem.* 7.

Eudes, A., Juminaga, D., Baidoo, E. E., Collins, F. W., Keasling, J. D., Loque, D., 2013. Production of hydroxycinnamoyl anthranilates from glucose in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 12, 62.

Euverink, G.-J., 1995. Aromatic amino acid biosynthesis in actinomycetes.

Ferraiuolo, S. B., Cammarota, M., Schiraldi, C., Restaino, O. F., 2021. Streptomyces as platform for biotechnological production processes of drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105, 551-568.

Forbis, R. M., Rinehart, K. L., Jr., 1970. Nybomycin. IV. Total synthesis of deoxynybomycin. *J Am Chem Soc.* 92, 6995-6.

Forbis, R. M., Rinehart, K. L., Jr., 1971. Nybomycin. V. Total synthesis of nybomycin. *J Antibiot (Tokyo).* 24, 326-7.

Forbis, R. M., Rinehart, K. L., Jr., 1973. Nybomycin. VII. Preparative routes to nybomycin and deoxynybomycin. *J Am Chem Soc.* 95, 5003-13.

Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K., 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol.* 66, 829-39.

Garcia-Gutierrez, C., Aparicio, T., Torres-Sanchez, L., Martinez-Garcia, E., de Lorenzo, V., Villar, C. J., Lombo, F., 2020. Multifunctional SEVA shuttle vectors for actinomycetes and Gram-negative bacteria. *Microbiolopen.* 9, 1135-1149.

Giesselmann, G., Dietrich, D., Jungmann, L., Kohlstedt, M., Jeon, E. J., Yim, S. S., Sommer, F., Zimmer, D., Muhlhaus, T., Schroda, M., Jeong, K. J., Becker, J., Wittmann, C., 2019. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: Design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway. *Biotechnol J.* 14, e1800417.

Gläser, L., Kuhl, M., Stegmüller, J., Ruckert, C., Myronovskiy, M., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Wittmann, C., 2021a. Superior production of heavy pamamycin derivatives using a bkdR deletion mutant of *Streptomyces albus* J1074/R2. *Microb Cell Fact.* 20, 111.

Gläser, L., Kuhl, M., Stegmüller, J., Rückert, C., Myronovskiy, M., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Wittmann, C., 2021b. Superior production of heavy pamamycin derivatives using a bkdR deletion mutant of *Streptomyces albus* J1074/R2. *Microb Cell Fact.* 20, 111.

Gramajo, H. C., Takano, E., Bibb, M. J., 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol.* 7, 837-45.

Gregory, M. A., Till, R., Smith, M. C., 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol.* 185, 5320-3.

Hergenrother, P. J., Leys, D., TOPOISOMERASE INHIBITORS WITH ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER ACTIVITY. 2018.

Hilker, R., Stadermann, K. B., Doppmeier, D., Kalinowski, J., Stoye, J., Straube, J., Winnebald, J., Goesmann, A., 2014. ReadXplorer—visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics.* 30, 2247-2254.

Hiramatsu, K., Igarashi, M., Morimoto, Y., Baba, T., Umekita, M., Akamatsu, Y., 2012. Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. *Int J Antimicrob Agents.* 39, 478-85.

Hiramatsu, K., Sasaki, T., Morimoto, Y., 2015. Future Chemotherapy Preventing Emergence of Multi-Antibiotic Resistance. *Juntendo Medical Journal.* 61, 249-256.

Hoffmann, S. L., Jungmann, L., Schiefelbein, S., Peyriga, L., Cahoreau, E., Portais, J. C., Becker, J., Wittmann, C., 2018. Lysine production from the sugar alcohol mannitol: Design of the cell factory *Corynebacterium glutamicum* SEA-3 through integrated analysis and engineering of metabolic pathway fluxes. *Metab Eng.*

Hoffmann, S. L., Kohlstedt, M., Jungmann, L., Hutter, M., Poblete-Castro, I., Becker, J., Wittmann, C., 2021. Cascaded valorization of brown seaweed to produce L-lysine and value-added products using *Corynebacterium glutamicum* streamlined by systems metabolic engineering. *Metab Eng.* 67, 293-307.

Holt, T. G., Chang, C., Laurent-Winter, C., Murakami, T., Garrels, J. I., Davies, J. E., Thompson, C. J., 1992. Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Mol Microbiol.* 6, 969-80.

Huang, D., Li, S., Xia, M., Wen, J., Jia, X., 2013. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement. *Microb Cell Fact.* 12, 52.

Huang, S., Millar, A. H., 2013. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology.* 16, 344-349.

Huo, L., Rachid, S., Stadler, M., Wenzel, S. C., Muller, R., 2012. Synthetic biotechnology to study and engineer ribosomal bottromycin biosynthesis. *Chem Biol.* 19, 1278-87.

Hwang, M.-S., Rohlena, J., Dong, L.-F., Neuzil, J., Grimm, S., 2014. Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain. *Mitochondrion.* 19, 20-28.

Hwang, S., Lee, N., Jeong, Y., Lee, Y., Kim, W., Cho, S., Palsson, B. O., Cho, B. K., 2019. Primary transcriptome and translatoome analysis determines transcriptional and translational regulatory elements encoded in the *Streptomyces clavuligerus* genome. *Nucleic Acids Res.* 47, 6114-6129.

Ikeda, M., 2006. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69, 615-26.

Jin, X. M., Chang, Y. K., Lee, J. H., Hong, S. K., 2017. Effects of Increased NADPH Concentration by Metabolic Engineering of the Pentose Phosphate Pathway on Antibiotic Production and Sporulation in *Streptomyces lividans* TK24. *J Microbiol Biotechnol.* 27, 1867-1876.

Jin, Z., Jin, X., Jin, Q., 2010. Conjugal transferring of resistance gene *ptr* for improvement of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 160, 1853-64.

Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Lachance, D. M., Lebovich, M., Fu, L., Shirke, A. N., Schultz, V. L., Cress, B., Linhardt, R. J., Koffas, M. A., 2015. ePathOptimize: A Combinatorial Approach for Transcriptional Balancing of Metabolic Pathways. *Sci Rep.* 5, 11301.

Jovanovic Gasovic, S., Dietrich, D., Gläser, L., Cao, P., Kohlstedt, M., Wittmann, C., 2023. Multi-omics view of recombinant *Yarrowia lipolytica*: Enhanced ketogenic amino acid catabolism increases polyketide-synthase-driven docosahexaenoic production to high selectivity at the gram scale. *Metab Eng.* online ahead of print.

Kaiser, J. C., Heinrichs, D. E., 2018. Branching Out: Alterations in Bacterial Physiology and Virulence Due to Branched-Chain Amino Acid Deprivation. *mBio.* 9.

Kallifidas, D., Jiang, G., Ding, Y., Luesch, H., 2018. Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Cell Fact.* 17, 25.

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.

Kikuchi, Y., Tsujimoto, K., Kurahashi, O., 1997. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 63, 761-2.

Kind, S., Becker, J., Wittmann, C., 2013. Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway -metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng.* 15, 184-95.

Kind, S., Neubauer, S., Becker, J., Yamamoto, M., Völkert, M., Abendroth, G. V., Zelder, O., Wittmann, C., 2014. From zero to hero - Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng.* 25, 113-23.

Kohlstedt, M., Sappa, P. K., Meyer, H., Maass, S., Zaprasis, A., Hoffmann, T., Becker, J., Steil, L., Hecker, M., van Dijk, J. M., Lalk, M., Mader, U., Stulke, J., Bremer, E., Volker, U., Wittmann, C., 2014. Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi-omics perspective. *Environ Microbiol.* 16, 1898-1917.

Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., Stolzenberger, J., Selzer, M., Mehlmann, K., Schneider, R., Pleissner, D., Rinkel, J., Dickschat, J. S., Venus, J., J. B. J. H. v. D., Wittmann, C., 2018. From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab Eng.* 47, 279-293.

Kohlstedt, M., Weimer, A., Weiland, F., Stolzenberger, J., Selzer, M., Sanz, M., Kramps, L., Wittmann, C., 2022. Biobased PET from lignin using an engineered *cis, cis*-muconate-producing *Pseudomonas putida* strain with superior robustness, energy and redox properties. *Metab Eng.* 72, 337-352.

Komaki, H., Hosoyama, A., Kimura, A., Ichikawa, N., Igarashi, Y., Tamura, T., 2020. Classification of '*Streptomyces hyalinus*' Hamada and Yokoyama as *Embleya hyalina* sp. nov., the second species in the genus *Embleya*, and emendation of the genus *Embleya*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70, 1591-1595.

Kormanec, J., Novakova, R., Mingyar, E., Feckova, L., 2014. Intriguing properties of the angucycline antibiotic auricin and complex regulation of its biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98, 45-60.

Kuhl, M., Glaser, L., Rebets, Y., Ruckert, C., Sarkar, N., Hartsch, T., Kalinowski, J., Luzhetskyy, A., Wittmann, C., 2020. Microparticles globally reprogram *Streptomyces albus* toward accelerated morphogenesis, streamlined carbon core metabolism, and enhanced production of the antituberculosis polyketide pamamycin. *Biotechnol Bioeng.* 117, 3858-3875.

Kuhl, M., Ruckert, C., Glaser, L., Beganovic, S., Luzhetskyy, A., Kalinowski, J., Wittmann, C., 2021. Microparticles enhance the formation of seven major classes of natural products in native and metabolically engineered actinobacteria through accelerated morphological development. *Biotechnol Bioeng.* 118, 3076-3093.

Labes, G., Bibb, M., Wohlleben, W., 1997. Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (*aacC1*) of Tn 1696 as reporter. *Microbiology.* 143 ( Pt 5), 1503-1512.

Langmead, B., Salzberg, S. L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods.* 9, 357.

Lee, Y., Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Cho, S., Palsson, B. O., Cho, B. K., 2022. Genome-scale analysis of genetic regulatory elements in *Streptomyces avermitilis* MA-4680 using transcript boundary information. *BMC Genomics.* 23, 68.

Liao, H. F., Lin, L. L., Chien, H. R., Hsu, W. H., 2001. Serine 187 is a crucial residue for allosteric regulation of *Corynebacterium glutamicum* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *FEMS Microbiol Lett.* 194, 59-64.

Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., Tan, H., 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 77, 112-43.

Love, M. I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.

Lu, C., Zhang, X., Jiang, M., Bai, L., 2016. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*. *Metab Eng.* 35, 129-137.

Ma, Z., Hu, Y., Liao, Z., Xu, J., Xu, X., Bechthold, A., Yu, X., 2020. Cloning and Overexpression of the Toy Cluster for Titer Improvement of Toyocamycin in *Streptomyces diastatochromogenes*. *Frontiers in microbiology.* 11, 2074.

Mao, X. M., Luo, S., Li, Y. Q., 2017. Negative regulation of daptomycin production by DepR2, an ArsR-family transcriptional factor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 44, 1653-1658.

Massey, L. K., Sokatch, J. R., Conrad, R. S., 1976. Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol Rev.* 40, 42-54.

Meza, E., Becker, J., Bolivar, F., Gosset, G., Wittmann, C., 2012. Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 11, 127.

Mo, J., Wang, S., Zhang, W., Li, C., Deng, Z., Zhang, L., Qu, X., 2019. Efficient editing DNA regions with high sequence identity in actinomycetal genomes by a CRISPR-Cas9 system. *Synthetic and systems biotechnology.* 4, 86-91.

Morimoto, Y., Baba, T., Sasaki, T., Hiramatsu, K., 2015. Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *Int J Antimicrob Agents.* 46, 666-73.

Myronovskiy, M., Luzhetskyy, A., 2016. Native and engineered promoters in natural product discovery. *Nat Prod Rep.* 33, 1006-19.

Myronovskiy, M., Rosenkranzer, B., Nadmid, S., Pujic, P., Normand, P., Luzhetskyy, A., 2018. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metab Eng.* 49, 316-324.

Myronovskiy, M., Rosenkranzer, B., Stierhof, M., Petzke, L., Seiser, T., Luzhetskyy, A., 2020. Identification and Heterologous Expression of the Albucidin Gene Cluster from the Marine Strain *Streptomyces Albus* Subsp. *Chlorinus* NRRL B-24108. *Microorganisms.* 8.

Novakova, R., Mingyar, E., Feckova, L., Homerova, D., Csolleiova, D., Rezuchova, B., Sevcikova, B., Javorova, R., Kormanec, J., 2022. A New Family of Transcriptional Regulators Activating Biosynthetic Gene Clusters for Secondary Metabolites. *Int J Mol Sci.* 23.

Nussbaum, F., Ebbinghaus, A., Mayer-Bartschmid, A., Zitzmann, W., Wiese, W. B., Stadler, M., Anlauf, S., 2009. CDC25 inhibitors. 2009.

Park, S. J., Tseng, C. P., Gunsalus, R. P., 1995. Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol Microbiol.* 15, 473-82.

Parkinson, E. I., Bair, J. S., Nakamura, B. A., Lee, H. Y., Kuttub, H. I., Southgate, E. H., Lezmi, S., Lau, G. W., Hergenrother, P. J., 2015a. Deoxybomycins inhibit mutant DNA gyrase and rescue mice infected with fluoroquinolone-resistant bacteria. *Nat Commun.* 6, 6947.

Parkinson, E. I., Bair, J. S., Nakamura, B. A., Lee, H. Y., Kuttab, H. I., Southgate, E. H., Lezmi, S., Lau, G. W., Hergenrother, P. J., 2015b. Deoxynybomycins inhibit mutant DNA gyrase and rescue mice infected with fluoroquinolone-resistant bacteria. *Nat Commun.* 6, 6947.

Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C. J., Adams, L. E., Savka, M. A., Hudson, A. O., 2018. A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Front Mol Biosci.* 5, 29.

Pauli, S., Kohlstedt, M., Lamber, J., Weiland, F., Becker, J., Wittmann, C., 2023. Systems metabolic engineering upgrades *Corynebacterium glutamicum* for selective high-level production of the chiral drug precursor and cell-protective extremolyte L-pipecolic acid. *Metab Eng.* 77, 100-117.

Paulus, C., Myronovskyi, M., Zapp, J., Rodriguez Estevez, M., Lopatniuk, M., Rosenkranzer, B., Paluszczak, A., Luzhetskyy, A., 2022. Miramides A-D: Identification of Detoxin-like Depsipeptides after Heterologous Expression of a Hybrid NRPS-PKS Gene Cluster from *Streptomyces mirabilis* Lu17588. *Microorganisms.* 10.

Pavoncello, V., Barras, F., Bouveret, E., 2022. Degradation of Exogenous Fatty Acids in *Escherichia coli*. *Biomolecules.* 12.

Pereira, T., Nikodinovic, J., Nakazono, C., Dennis, G. R., Barrow, K. D., Chuck, J. A., 2008. Community structure and antibiotic production of *Streptomyces nodosus* bioreactors cultured in liquid environments. *Microb Biotechnol.* 1, 373-81.

Peters-Wendisch, P. G., Eikmanns, B. J., Thierbach, G., Bachmann, B., Sahm, H., 1993. Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol Lett.* 112, 269-274.

Pizer, E. S., Thupari, J., Han, W. F., Pinn, M. L., Chrest, F. J., Frehywot, G. L., Townsend, C. A., Kuhajda, F. P., 2000. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 60, 213-8.

Price, L. B., Vogler, A., Pearson, T., Busch, J. D., Schupp, J. M., Keim, P., 2003. In vitro selection and characterization of *Bacillus anthracis* mutants with high-level resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 2362-5.

Qiu, J., Zhuo, Y., Zhu, D., Zhou, X., Zhang, L., Bai, L., Deng, Z., 2011. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92, 337-45.

Richter, M. F., Drown, B. S., Riley, A. P., Garcia, A., Shirai, T., Svec, R. L., Hergenrother, P. J., 2017. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. *Nature.* 545, 299-304.

Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., Korneli, C., de Souza Lima, A. O., Porto, L. M., Sprenger, G. A., Wittmann, C., 2013. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab Eng.* 20, 29-41.

Rodriguez, A., Martinez, J. A., Flores, N., Escalante, A., Gosset, G., Bolivar, F., 2014. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb Cell Fact.* 13, 126.

Rodriguez Estevez, M., Myronovskyi, M., Gummerlich, N., Nadmid, S., Luzhetskyy, A., 2018. Heterologous Expression of the Nybomycin Gene Cluster from the Marine Strain *Streptomyces albus* subsp. *chlorinus* NRRL B-24108. *Mar Drugs.* 16.

Rohles, C., Pauli, S., Giesselmann, G., Kohlstedt, M., Becker, J., Wittmann, C., 2022. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* eliminates all by-products for selective and high-yield production of the platform chemical 5-aminovalerate. *Metab Eng.* 73, 168-181.

Rohles, C. M., Giesselmann, G., Kohlstedt, M., Wittmann, C., Becker, J., 2016. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of the carbon-5 platform chemicals 5-aminovalerate and glutarate. *Microb Cell Fact.* 15, 154.

Rohles, C. M., Gläser, L., Kohlstedt, M., Gießelmann, G., Pearson, S., del Campo, A., Becker, J., Wittmann, C., 2018. A bio-based route to the carbon-5 chemical glutaric acid and to bionylon-6,5 using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Green Chemistry.* 20, 4662-4674.

Ruiz, B., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Rodriguez-Sanoja, R., Sanchez, S., Langley, E., 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol.* 36, 146-67.

Sambrook, J. F., Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vols 1,2 and 3.

Sander, T., Farke, N., Diehl, C., Kuntz, M., Glatter, T., Link, H., 2019. Allosteric Feedback Inhibition Enables Robust Amino Acid Biosynthesis in *E. coli* by Enforcing Enzyme Overabundance. *Cell Syst.* 8, 66-75 e8.

Schilling, O., Frick, O., Herzberg, C., Ehrenreich, A., Heinzle, E., Wittmann, C., Stulke, J., 2007. Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation. *Appl Environ Microbiol.* 73, 499-507.

Schwechheimer, S. K., Becker, J., Peyriga, L., Portais, J. C., Sauer, D., Muller, R., Hoff, B., Haefner, S., Schroder, H., Zelder, O., Wittmann, C., 2018a. Improved riboflavin production with *Ashbya gossypii* from vegetable oil based on <sup>13</sup>C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. *Metab Eng.* 47, 357-373.

Schwechheimer, S. K., Becker, J., Peyriga, L., Portais, J. C., Wittmann, C., 2018b. Metabolic flux analysis in *Ashbya gossypii* using <sup>13</sup>C-labeled yeast extract: industrial riboflavin production under complex nutrient conditions. *Microb Cell Fact.* 17, 162.

Schwentner, A., Feith, A., Munch, E., Stiefelmaier, J., Lauer, I., Favilli, L., Massner, C., Ohrlein, J., Grund, B., Huser, A., Takors, R., Blombach, B., 2019. Modular systems metabolic engineering enables balancing of relevant pathways for l-histidine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Biofuels.* 12, 65.

Seghezzi, N., Amar, P., Koebmann, B., Jensen, P. R., Virolle, M. J., 2011. The construction of a library of synthetic promoters revealed some specific features of strong *Streptomyces* promoters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90, 615-23.

Seyedsayamdost, M. R., 2019. Toward a global picture of bacterial secondary metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 46, 301-311.

Siegl, T., Tokovenko, B., Myronovskiy, M., Luzhetskyy, A., 2013. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metab Eng.* 19, 98-106.

Strelitz, F., Flon, H., Asheshov, I. N., 1955. Nybomycin, a New Antibiotic with Antiphage and Antibacterial Properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 41, 620-4.

Sun, L., Zeng, J., Cui, P., Wang, W., Yu, D., Zhan, J., 2018. Manipulation of two regulatory genes for efficient production of chromomycins in *Streptomyces roseiscleroticus*. *J Biol Eng.* 12, 9.

Team, R. C., 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Tippmann, S., Ferreira, R., Siewers, V., Nielsen, J., Chen, Y., 2017. Effects of acetoacetyl-CoA synthase expression on production of farnesene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 44, 911-922.

Tsyplik, O., Makitrynskyy, R., Yan, X., Koch, H. G., Paululat, T., Bechthold, A., 2021. Regulatory Control of Rishirilide(s) Biosynthesis in *Streptomyces bottropensis*. *Microorganisms.* 9.

van Wezel, G. P., van der Meulen, J., Kawamoto, S., Luiten, R. G., Koerten, H. K., Kraal, B., 2000. *ssgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation. *J Bacteriol.* 182, 5653-62.

Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., Jimenez de Anta, T., 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39, 1201-3.

Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., Jimenez de Anta, T., 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 38, 2477-9.

Walker, G. E., Dunbar, B., Hunter, I. S., Nimmo, H. G., Coggins, J. R., 1996. Evidence for a novel class of microbial 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces rimosus* and *Neurospora crassa*. *Microbiology.* 142 ( Pt 8), 1973-82.

Wang, X., Elshahawi, S. I., Ponomareva, L. V., Ye, Q., Liu, Y., Copley, G. C., Hower, J. C., Hatcher, B. E., Kharel, M. K., Van Lanen, S. G., She, Q. B., Voss, S. R., Thorson, J. S., Shaaban, K. A., 2019. Structure Determination, Functional Characterization, and Biosynthetic Implications of Nybomycin Metabolites from a Mining Reclamation Site-Associated *Streptomyces*. *J Nat Prod.* 82, 3469-3476.

Warnes, M. G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., 2016. Package 'gplots'. Various R Programming Tools for Plotting Data.

Weiland, F., Barton, N., Kohlstedt, M., Becker, J., Wittmann, C., 2022. Systems metabolic engineering upgrades *Corynebacterium glutamicum* to high-efficiency cis, cis-muconic acid production from lignin-based aromatics. *Metab Eng.* 75, 153-169.

Weiland, F., Barton, N., Kohlstedt, M., Becker, J., Wittmann, C., 2023. Systems metabolic engineering upgrades *Corynebacterium glutamicum* to high-efficiency cis, cis-muconic acid production from lignin-based aromatics. *Metab Eng.* 75, 153-169.

Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Laverde-Gomez, J. A., Klare, I., Witte, W., 2010. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents.* 35, 119-125.

Yao, Y. F., Wang, C. S., Qiao, J., Zhao, G. R., 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvanic acid A via an artificial biosynthetic pathway. *Metab Eng.* 19, 79-87.

Yin, S., Wang, X., Shi, M., Yuan, F., Wang, H., Jia, X., Sun, J., Liu, T., Yang, K., Zhang, Y., Fan, K., Li, Z., 2017. Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus*. *Sci China Life Sci.* 60, 992-999.

Zakalyukina, Y. V., Birykov, M. V., Lukianov, D. A., Shiriaev, D. I., Komarova, E. S., Skvortsov, D. A., Kostyukevich, Y., Tashlitsky, V. N., Polshakov, V. I., Nikolaev, E., Sergiev, P. V., Osterman, I. A., 2019. Nybomycin-producing *Streptomyces* isolated from carpenter ant *Camponotus vagus*. *Biochimie.* 160, 93-99.

Zhang, H., Stephanopoulos, G., 2013. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 3333-41.

Zhu, M., Zhang, F., Gan, T., Lin, J., Duan, Y., Zhu, X., 2022. Deciphering the pathway-specific regulatory network for production of ten-membered enediyne Tiancimycins in *Streptomyces* sp. CB03234-S. *Microb Cell Fact.* 21, 188.

Zhu, Z., Li, H., Yu, P., Guo, Y., Luo, S., Chen, Z., Mao, X., Guan, W., Li, Y., 2017. SlnR is a positive pathway-specific regulator for salinomycin biosynthesis in *Streptomyces albus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101, 1547-1557.

## **2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Die wesentlichen Positionen der Projektfinanzierung waren die Finanzierung von Personal-, Reise- und Verbrauchsmitteln. Die Arbeiten waren zwischenzeitlich verzögert, konnten aber mit einer angepassten Arbeitsplanung und einer ermöglichten kostenneutralen Verlängerung der Laufzeit um 6 Monate wie vorgesehen durchgeführt werden. Alle Meilensteine wurden dabei erreicht.

Alle Projektmittel wurden sachgerecht und zweckgebunden verbraucht. Die Abrechnungen im Detail sind dem Verwendungsnachweis zu entnehmen.

## **2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die geleistete Arbeit war zur Erreichung der Projektziele notwendig und angemessen.

## **2.4 Voraussichtlicher Nutzen**

Das Projekt zielte auf die nachhaltige, biotechnologische Produktion des Antibiotikums Nybomycin ab, das kommerzielles Potenzial für pharmazeutische und medizinische Anwendungen besitzt. Dazu wurden neuartige, innovative Verfahren auf Basis rekombinanter *Streptomyces*-Stämme entwickelt. Die geleistete erfolgreiche Arbeit - Technologien, Stämme, Verfahren stellt eine exzellente Situation dar, um diesen vielversprechenden Wirkstoff weiterzuentwickeln. Durch die erfolgreiche Demonstration der Nutzung von Algenextrakten als Rohstoff wurde darüber die Brücke zur aufstrebenden Entwicklung im Bereich Ocean Farming in Deutschland und Europa geschlagen, was einen wichtigen Beitrag für die Etablierung einer nachhaltigen Wirkstoffproduktion darstellt. Gleichzeitig konnte mit *S. albus* LV1-4 ein neuer vielversprechender mariner Stamm für die Naturstoffproduktion eingehend charakterisiert und nutzbar gemacht werden. Dies verspricht, die zukünftige Erschließung mariner Substanzklassen voranzutreiben.

Mit den erzielten Erkenntnissen wurde die Expertise am iSBio im Bereich Wirkstoffforschung gezielt weiterentwickelt. Die verschiedenen Forschungslinien sollen zukünftig am iSBio weiterverfolgt werden. Wir gehen davon aus, dass wir im Anschluss an das Projekt weitere Arbeiten hochrangigen Journalen publizieren

können. Gleichzeitig war das Projekt durch seine hohe Interdisziplinarität von großem Nutzen für die Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Damit ist der Nutzen aus diesem Projekt insgesamt als sehr hoch einzuschätzen.

## 2.5 Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Während der Durchführung sind dem Zuwendungsempfänger keine relevanten Ergebnisse bei anderen Stellen bekannt geworden.

## 2.6 Veröffentlichungen

### 2.6.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Julian Stegmüller, Marta Rodríguez Estévez, Wei Shu, Lars Gläser, Maksym Myronovskyi, Christian Rückert, Jörn Kalinowski, Andriy Luzhetskyy und Christoph Wittmann (2023) Systems metabolic engineering of *Streptomyces albidoflavus* at the level of primary and secondary metabolism enhances the production of the reverse antibiotic nybomycin. *Metab. Eng.* 81: 123. **Open Access:** <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.12.004>.

Kyoyoung Seo, Wei Shu, Christian Rückert-Reed, Patrick Gerlinger, Tobias J. Erb, Jörn Kalinowski und Christoph Wittmann (2023) From waste to health-supporting molecules: Biosynthesis of natural products from lignin-, plastic- and seaweed-based monomers using metabolically engineered *Streptomyces lividans*. *Microb. Cell Fact.* 22: 262. **Open Access:** <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02266-0>.

### 2.6.2 Geplante Veröffentlichungen

Wei Shu, Christian Rückert-Reed, Oleksandr Gromyko, Stepan Tistechok, Jörn Kalinowski, Andriy Luzhetskyy, and Christoph Wittmann. Description of *Streptomyces explomaris* sp. nov., isolated from the coastal soil rhizosphere of the Crimean Peninsula, and reclassification of *Streptomyces libani* Baldacci and Grein 1966 (Approved Lists 1980) as later heterotypic synonym of *Streptomyces nigrescens* (Sveshnikova 1957) Pridham et al. 1958 (Approved Lists 1980). In Vorbereitung.

Weiterhin sind im Anschluss Manuskripte zur verbesserten Produktion von Nybomycin in *S. albus* LV-1-4 sowie zur nachhaltigen Nybomycin-Produktion auf Basis von Algenrohstoffen geplant. Diese Arbeiten sollen bis Ende 2024 bzw. Anfang 2025 fertiggestellt und eingereicht werden.

### 2.6.3 Dissertationen

Stegmüller J. (2024) Metabolic engineering of *Streptomyces albus* for enhanced production of the reverse antibiotic nybomycin. Dissertationsschrift. Universität des Saarlandes.

### 2.6.4 Geplante Dissertationen

Shu W (2024) Sustainable production of the reverse antibiotic nybomycin. Dissertationsschrift. Universität des Saarlandes. In Vorbereitung.

Seo K (2024) Natural products from renewable resources: a systems approach to harness *Actinobacteria*. Dissertationsschrift. Universität des Saarlandes. In Vorbereitung.