



**Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

**Medizinische Fakultät Mannheim**

**Dissertations-Kurzfassung**

## **Regulation and genetic engineering of salinosporamide A biosynthesis**

Autor: Anna Lechner  
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Mathias Hafner

The marine bacterium *Salinispora tropica* produces a series of potent proteasome inhibitors, the salinosporamides, which differ only at the C-2 side chain. The chlorinated salinosporamide A is not only the major family member, it is also its most potent. Hence, salinosporamide A was selected and advanced to clinical trials as an anticancer agent where it was produced for Phase I studies by large-scale microbial fermentation.

Gene regulation plays an important role in the fermentation of secondary metabolites. Therefore we investigated the pathway-specific regulation of salinosporamide A biosynthesis, which led to the identification and characterization of the transcription factor SalR2. This transcription factor specifically activates genes involved in the biosynthesis of the halogenated metabolite chloroethylmalonyl-CoA, which is a dedicated precursor of salinosporamide A. By applying this knowledge towards rational engineering, we were able to selectively double salinosporamide A production levels. This study exemplifies the specialized regulation of a polyketide precursor pathway and its application to the selective overproduction of a specific natural product congener.

Furthermore the identification, cloning and initial sequencing of the cinnabaramide biosynthetic gene cluster is described. The cinnabaramides A-G, naturally produced by the terrestrial *Streptomyces* species JS360, are structural analogs of the salinosporamides. Cloning of the cinnabaramide gene cluster revealed important insights on salinosporamide biosynthesis. Finally the discovery of the cinnabaramide gene cluster identified a suitable expression host for heterologous salinosporamide A production.

Marine Actinomyceten sind wichtige Produzenten bioaktiver Naturstoffe. Ein aussichtsreicher Wirkstoffkandidat ist das Salinosporamid A aus dem marinen Bakterium *Salinispora tropica*. Dieser Naturstoff ist ein starker Inhibitor des 20S-Proteasoms und wird zur Zeit auf seine Wirkung als potentiell Krebs-Chemotherapeutikum in klinischen Studien untersucht. Die Herstellung des wirksamsten Mitgliedes der strukturdiversen  $\gamma$ -Lactam- $\beta$ -lacton-Naturstoffe erfolgt via Fermentation des Actinobakteriums *S. tropica*.

Bei Fermentationsprozessen spielt vor allem die Genregulation der Naturstoffbiosynthese eine wichtige Rolle, welche in der vorliegenden Arbeit erforscht werden sollte. Durch einen multidisziplinären Ansatz wurde ein beispielloser Regulationsprozess identifiziert und im Detail untersucht. Die hier vorliegenden Resultate beschreiben die Auswirkungen des Transkriptionsfaktors SalR2 auf die Biosynthese des spezifischen Polyketid-Bausteins Chlorethylmalonyl-CoA. Diese Art von Genregulation führt zu einer selektiven Produktion des wirksamen Proteasominhibitors gegenüber den restlichen Mitgliedern der Salinosporamidfamilie. Die hier gewonnenen Kenntnisse wurden ferner angewandt um mittels genetischer Manipulation eine Optimierung der Salinosporamid A Ausbeute zu erzielen.

Zudem konnte im Verlauf dieser Studie das Gencluster für einen weiteren Proteasominhibitor der Salinosporamidfamilie identifiziert und sequenziert werden. Die Cinnabaramide A–G wurden als nahe verwandte  $\gamma$ -Lactam- $\beta$ -lacton-Naturstoffe in dem terrestrischen Stamm *Streptomyces* sp. JS360 identifiziert. Die Identifizierung und Klonierung des Cinnabaramid Genclusters führt zu wichtigen Erkenntnissen bezüglich der Salinosporamid Biosynthese. Zusätzlich wurde *S. sp* JS360 als heterologer Expressionsstamm für eine salz-freie Fermentation von Salinosporamid A zugänglich gemacht.