

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0017-07**

Molekulárna charakterizácia regulácie a biosyntézy polyketidového antibiotika auricínu v *Streptomyces aureofaciens* CCM3239

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Ján Kormanec, DrSc.**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej biológie SAV
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, University of Freiburg, Nemecko
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Sekvencia auricínového klastra, 29 395 bp, poslaná do databáza GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) pod názvom: Kormanec, J., Nováková, R., Fecková, Ľ., Kutaš, P., Ševčíková, B., Homerová, D., Řežuchová, B.: *Streptomyces aureofaciens* CCM3239 auricin deoxysugar tailoring biosynthetic genes. GenBank Acc. No. FJ479754.
2. Sekvencia auricínového klastra a jeho okolia, 47 893 bp, poslaná do databázy GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) pod názvom: Kormanec, J., Fecková, Ľ., Nováková, R., Kutaš, P., Reháková, A., Ševčíková, B., Homerová, D., Řežuchová, B., Knirschová, R.: *Streptomyces aureofaciens* strain CCM3239 auricin biosynthetic and regulatory gene cluster, complete sequence. GenBank Acc. No. HQ003813.

3. Novakova, R., Odnogova, Z., Kutas, P., Feckova, L., Kormanec, J.: Identification and characterization of an indigoidine-like gene for a blue pigment biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Folia Microbiol.* 55 (2010) 119-125.
4. Novakova, R., Kutas, P., Feckova, L., Kormanec, J.: The role of the TetR-family transcriptional regulator Aur1R in negative regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology-SGM* 156 (2010) 2374-2383.
5. Novakova, R., Rehakova, A., Kutas, P., Feckova, L., Kormanec, J.: The role of two SARP-family transcriptional regulators in positive regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology-SGM* (2010) in press.

Uplatnenie výsledkov projektu

Odhalený komplexný mechanizmus regulácie auricínu môže napomôcť k aktivácii iných angucyklínových antibiotík, ktoré sú podobne produkované iba vo veľmi nízkych hladinách. Štruktúrna analýza auricínu odhalila unikátnu štruktúru nového angucyklínového antibiotika účinného proti Gram-pozitívnym baktériám s čiastočnou špecifickou cytotoxickou aktivitou. Po jeho modifikácii stabilizujúcej jeho aktivitu pri fyziologických podmienkach by mohlo byť v budúcnosti možné jeho potenciálne terapeutické využitie.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Dokončili sme sekvenčnú analýzu celého auricinového klastra *aur1* v *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 a charakterizovali jeho biosyntetické a regulačné gény. Charakterizovali sme unikátnu a komplexnú kaskádovú reguláciu biosyntézy auricínu, ktorá je zodpovedná za veľmi striktnú a nízku produkciu tohto antibiotika v úzkom intervale rastu. Dokázali sme kritickú úlohu regulačných génov *aur1B*, *aur1P*, *aur1R*, *aur1PR3* a *aur1PR4* v regulácii biosyntézy auricínu. Aktivátory *Aur1P*, *Aur1PR3* a *Aur1PR4* priamo aktivujú expresiu biosyntetických génov väzbou na ich promótor, pričom expresia génu *aur1PR4* je pod kontrolou *Aur1P*. Dokázali sme unikátny „feed-back“ mechanizmus regulácie, kde väzbou auricínu alebo jeho medziproduktu dochádza k znemožneniu väzby *Aur1P* na biosyntetický promótor a k zastaveniu aktivácie transkripcie. Negatívny regulátor *Aur1R* sa viaže na promótor génu aktivátorov *aur1P* a *aur1PR3*, čím ich špecificky blokuje v určitom štádiu rastu a táto inhibícia je odblokovaná väzbou auricínu alebo jeho medziproduktu na *Aur1R*. Gény pre regulátory *aur1P* a *aur1R* sú negatívne regulované aj globálnym regulátorom gama-butyrolaktónového systému *SagR* v neprodukčnom štádiu rastu. Z geneticky-manipulovaného kmeňa sme izolovali auricín a stanovili jeho chemickú štruktúru, ktorá obsahuje angucyklínový aglykón modifikovaný cukrom N,N-dimetylforosamínom. Charakterizovali sme biologické vlastnosti auricínu. Auricín je špecificky účinný voči Gram-pozitívnym baktériám a čiastočne špecificky cytotoxický na niektoré ľudských nádorové bunkových línie.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The whole auricin cluster *aur1* has been sequenced and its biosynthetic and regulatory genes characterised in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. Unique and complex cascade regulation of auricin biosynthesis has been revealed that is responsible for a strict and low auricin production in a narrow growth interval. A critical role of five regulatory genes, *aur1B*, *aur1P*, *aur1R*, *aur1PR3* and *aur1PR4*, has been confirmed in the regulation of auricin biosynthesis. Activators *Aur1P*, *Aur1PR3*, and *Aur1PR4* directly activate expression of biosynthetic genes by means of binding to corresponding promoters. Moreover, expression of *aur1PR4* is under positive control of the activator *Aur1P*. A unique feed-back mechanism has been discovered in regulation of auricin biosynthetic genes, where binding of *Aur1P* is blocked by auricin and/or its intermediates, which results in the arrest of transcription initiation. Negative regulator *Aur1R* directly binds to promoters for two activator genes, *aur1P*

and aur1PR3, and inhibits their expression in a specific growth stage. This inhibition is relieved by binding of auricin and/or its intermediates to Aur1R. The genes aur1P and aur1R are under negative control of global repressor of gamma-butyrolactone system SagR in non-producing stage of growth. Pure auricin has been isolated from the genetically-manipulated *S. aureofaciens* strain. Its chemical structure has been determined, which contains angucycline core modified by deoxyhexose N,N-dimethyl forosamine. Biological properties of auricin has been characterized. Auricin is specifically active against Gram-positive bacteria, and it is partially specifically cytotoxic against several human tumor cell lines.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

RNDr. Ján Kormanec, DrSc.

V Bratislave 20. 1. 2011

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Imrich Barák, DrSc.

V Bratislave 20. 1. 2011

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu