

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0410****Syntetická biológia pre produkciu nových biologicky aktívnych látok u streptomycét**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Ján Kormanec, DrSc.**Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**Ústav molekulárnej biológie SAV
Chemický ústav SAV**Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení**

Center for Biotechnology (CeBiTec), Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany

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

Nemáme.

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

- 1, Sun YQ, Busche T, Rückert C, Paulus C, Rebets Y, Novakova R, Kalinowski J, Luzhetskyy A, Kormanec J, Sekurova ON, Zotchev SB: Development of a Biosensor Concept to Detect the Production of Cluster-Specific Secondary Metabolites. ACS Synth Biol. 6 (2017) 1026-1033.
- 2, Novakova R, Núñez LE, Homerova D, Knirschova R, Feckova L, Rezuchova B, Sevcikova B, Menéndez N, Morís F, Cortés J, Kormanec J: Increased Heterologous Production of the Antitumoral Polyketide Mithramycin A by Engineered Streptomyces lividans TK24 Strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102 (2018) 857-869. doi: 10.1007/s00253-017-8642-5.
- 3, Mingyar E, Novakova R, Knirschova R, Feckova L, Bekeova C, Kormanec, J.: Unusual features of the large linear plasmid pSA3239 from Streptomyces aureofaciens CCM 3239. Gene 642 (2018) 313-323. doi: 10.1016/j.gene.2017.11.046.
- 4, Busche T, Novakova R, Al'Dilaimi A, Homerova D, Feckova L, Rezuchova B, Mingyar E, Csolleiova D, Bekeova C, Winkler A, Sevcikova B, Kalinowski J, Kormanec J, Rückert C: Complete genome sequence of Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae CCM 3239 (formerly "Streptomyces aureofaciens CCM 3239"), a producer of the angucycline-type antibiotic auricin. Genome Announc. 6 (2018) e00103-18. doi: 10.1128/genomeA.00103-18.
- 5, Matulova M, Feckova L, Novakova R, Mingyar E, Csolleiova D, Zduriencikova M, Sedlak J, Patoprsty V, Sasinkova V, Uhliarikova I, Sevcikova B, Rezuchova B, Homerova D, Kormanec, J: A structural analysis of the angucycline-like antibiotic auricin from Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae CCM 3239 revealed its high similarity to griseusins. Antibiotics 8 (2019) 102. DOI: 10.3390/antibiotics8030102.

6, Rezuchova B, Homerova D, Sevcikova B, Núñez LE, Novakova R, Feckova L, Skultety L, Cortés J, Kormanec J: An efficient blue-white screening system for markerless deletions and stable integrations in *Streptomyces* chromosomes based on the blue pigment indigoidine biosynthetic gene *bpsA*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 10231-10244. doi: 10.1007/s00253-018-9393-7.

7, Kormanec J, Rezuchova B, Homerova D, Csolleiova D, Sevcikova B, Novakova R, Feckova L: Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 5463-5482. DOI: 10.1007/s00253-019-09901-0.

8, Rebets Y, Kormanec J, Lutzhetsky A, Bernaerts K, Anné J: Cloning and Expression of Metagenomic DNA in *Streptomyces lividans* and Subsequent Fermentation for Optimized Production. *Metagenomics. Methods and Protocols* (Streit W, Daniel R., eds.). *Methods in Molecular Biology* Vol. 1539, Springer New York, 2017, pp. 99-144. ISBN: 978-1-4939-6689-9

Uplatnenie výsledkov projektu

Príprava účinného PCR deličného systému na bezmarkerovú deléciu a inzerciu génov u streptomycét, založený na pozitívnej bielo-modrej selekcii dvojitych "crossover" udalostí. Príprava nových hostiteľských kmeňov *S. lividans* RedStrep s postupne deletovanými génovými klastrami pre dominantné interferujúce sekundárne metabolity a vysoká heterologická produkcia antitumorového aromatického polyketidu mithramycínu A po integrácii mithramycínového génového klastra v týchto kmeňoch.

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

Stanovili sme genomickú sekvenciu kmeňa *S. lavendulae* CCM 3239. Identifikovali sme 32 génových klastrov pre sekundárne metabolity. U piatich sme charakterizovali ich sekundárne metabolity, ostatné sú silentné. Stanovili sme transkriptóm a pozície promótorov v divom type *S. lavendulae* CCM 3239 a v mutante v géne GBL systému *sagR*, čím sme charakterizovali gény sekundárneho metabolizmu pod kontrolou tohto systému. Identifikovali sme unikátny silne exprimovaný promótor pre malú sRNA, ktorého expresia je špecifická pre tento kmeň. Charakterizovali sme regulačné okruhy potrebné pre syntetickú biológiu s využitím promótorov a regulačných génov auricínového génového klastra zo *S. lavendulae* CCM 3239. Dokázali veľmi silnú aktiváciu a inhibíciu promótoru *aur1Ap* regulačnými proteínmi auricínového klastra. Pripravili sme klonovací vektor na báze lineárneho plazmidu *pSA3239* a úspešne sme ho verifikovali pomocou reportérových génov a časti *landomycínového* génového klastra. Týmto sme dokázali výhodnosť plazmidu *pSA3239* pre stabilné vnášanie cudzorodých génov a ich vysokú expresiu. Vyvinuli sme účinný expresný integračný systém so silným promótorom *kasOp** a verifikovali stratégiu syntetickej biológie s využitím génov auricínového a *landomycínového* génového klastra, kde došlo k produkcii antibioticky účinnej látky, ktorú sme štruktúrne charakterizovali ako *rabelomycín*. Týmto sme overili túto stratégiu syntetickej biológie pre produkciu nových biologicky aktívnych sekundárnych metabolitov. Vyvinuli sme účinný systém na bezmarkerovú deléciu génov a pripravili nové hostiteľské kmene *S. lividans* RedStrep, v ktorých sme dosiahli vysokú heterologickú produkciu antitumorového polyketidu *mithramycínu A*.

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

We determined the genomic sequence of *S. lavendulae* strain CCM 3239. We identified 32 gene clusters for secondary metabolites. Five of them were characterized by their secondary metabolites, the others being silent. We determined transcriptome and promoter positions in the wild-type *S. lavendulae* CCM 3239 and a mutant in the *sagR* gene of GBL system, thereby characterizing the secondary metabolite genes under control of this system. We have identified a unique strongly expressed small sRNA promoter whose expression is specific for this strain. We characterized the regulatory circuits required for synthetic biology using the auricin gene cluster promoters and regulatory genes from *S. lavendulae* CCM 3239. They demonstrated very potent activation and inhibition of the *aur1Ap* promoter by auricin regulatory proteins. We prepared a cloning vector based on the linear plasmid

pSA3239 and successfully verified it using reporter genes and part of the landomycin gene cluster. We have thus demonstrated the advantage of plasmid pSA3239 for the stable introduction of foreign genes and their high expression. We developed an efficient expression integration system with a strong kasOp * promoter and verified the strategy of synthetic biology using the genes of the auricin and landomycin gene clusters, producing an antibiotic, which we structurally characterized as rabelomycin. We have therefore verified this synthetic biology strategy for the production of new biologically active secondary metabolites. We have developed an efficient system for the markerless deletion of genes and prepared new host strains *S. lividans* RedStrep, in which we achieved high heterologous production of the antitumor polyketide mithramycin A.