



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0009

Príprava nových antibiotík a protinádorových látok manipuláciami génov sekundárnych metabolitov a metódami syntetickej biológie

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

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i.**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav molekulárnej biológie SAV

Chemický ústav SAV

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

EntreChem SL, Vivero Ciencias de la Salud, c/Colegio Santo Domingo de Guzmán, 33011 Oviedo, Spain

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

1, Cavaletti, L, Carenzi, G.E., Kormanec, J., Homerova, D.: New systems for producing recombinant proteins. International patent. Applicant: Nemysis Ltd, Ireland, WIPO Patent application WO/2023/285135, Publication date: 2023-01-17, Patent application No. PCT/EP2022/067738. European Patent Register No. EP4370687.

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

1, Kormanec J, Novakova R, Csolleiova D, Feckova L, Rezuchova B, Sevcikova B, Homerova D (2020) The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production. Applied Microbiology and Biotechnology 104, 7701-7721. DOI: 10.1007/s00253-020-10782-x.

2, Csolleiova D, Knirschova R, Rezuchova D, Homerova D, Sevcikova B, Matulova M, Núñez LE, Novakova R, Feckova L, Javorova R, Cortés J, Kormanec J (2021) An efficient system for stable markerless integration of large biosynthetic gene clusters into Streptomyces chromosomes. Applied Microbiology and Biotechnology 105, 2123-2137. DOI: 10.1007/s00253-021-11161-w.

3, Novakova R, Rückert C, Knirschova R, Feckova L, Busche T, Csolleiova D, Homerova D, Rezuchova B, Javorova R, Sevcikova B, Kalinowski J, Kormanec J (2021) The linear plasmid pSA3239 is essential for the replication of the Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae CCM 3239 chromosome. Research in Microbiology 172, 103870. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103870.

4, Kormanec J, Rezuchova B, Novakova R: Screening systems for stable markerless genomic deletions/integrations in Streptomyces species. Antimicrobial Therapies (Barreiro C, Barredo JL, eds.). Methods in Molecular Biology Vol. 2296, Humana, New York, NY, 2021, pp. 91-141. DOI: 10.1007/978-1-0716-1358-0_6.

- 5, Novakova R, Mingyar E, Feckova L, Homerova D, Csolleiova D, Rezuchova B, Sevcikova B, Javorova R, Kormanec J: A new family of transcriptional regulators activating biosynthetic gene clusters for secondary metabolites. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 2455. DOI:10.3390/ijms23052455.
- 6, Novakova R, Homerova D, Csolleiova D, Rezuchova D, Sevcikova B, Javorova R, Feckova L, Kormanec J: A stable vector for efficient production of heterologous proteins and secondary metabolites in streptomyces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106 (2022) 7285-7299. DOI: 10.1007/s00253-022-12187-4.
- 7, Csolleiova D, Javorova R, Novakova R, Feckova L, Matulova M, Opaterny F, Rezuchova D, Sevcikova B, Kormanec J: Investigating the initial steps of auricin biosynthesis using synthetic biology. *AMB Express* 13 (2023) 83. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01591-2>
- 8, Rebets Y, Kormanec J, Lutzhetskyy A, Bernaerts K, Anne J. Cloning and Expression of Metagenomic DNA in *Streptomyces lividans* and Its Subsequent Fermentation for Optimized Production. *Methods in Molecular Biology* 2555 (2023) 213-260. DOI: 10.1007/978-1-0716-2795-2_16.
- 9, Javorova R, Rezuchova B, Feckova L, Novakova R, Csolleiova D, Kopacova M, Patoprsty V, Opaterny F, Sevcikova B, Kormanec J: A new synthetic biology system for investigating the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites in streptomyces. *Journal of Biotechnology* 392 (2024) 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.07.007>

Uplatnenie výsledkov projektu

Príprava účinného systému inzercie silného promótoru kasOp* do chromozómu streptomycét pred biosyntetické gény sekundárnych metabolitov umožní aktiváciu biosyntetických klastrov pre nové biologicky aktívne látky a ich následné využitie v klinickej praxi. Charakterizácia auricínového medziproduktu SA48B preukázala jeho vysokú cytotoxicitu oproti viacerým ľudským nádorovým bunkovým líniam, a najmä voči mnohým ľudským leukemickým bunkovým líniam, čo je sľubným predpokladom pre jeho možné využitie pri liečbe leukémie. Príprava a optimalizácia nového systému syntetickej biológie založeného na monocistronických jednotkách (kasOp*-RBS-gén-terminátor) umožní jeho použitie pri biosyntéze nových a modifikovaných sekundárnych metabolitov s potenciálne novými biologickými vlastnosťami.

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

Prípravili sme nový systém inzercie silného promótoru kasOp* do chromozómu streptomycét. Tento sme úspešne verifikovali v kmeni *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* CCM 3239 inzerciou kasOp* pred viaceré biosyntetické génové klastre (BGC). V prípade BGC2 sme dokázali indukciu nových sekundárnych metabolitov aktívnych voči kvasinkám, streverténu A2 a X, ktoré sme izolovali a štruktúrne charakterizovali. V prípade BGC11 sme dokázali indukciu predpokladaného cyklického peptidu aktívneho voči Gram-pozitívnym baktériám. V prípade BGC21 sme dokázali indukciu predpokladaného cyklického tiopeptidu podobného k laktazolu. Optimalizovali sme TAR klonovanie auricínového a jadomycínového BGC pre ich heterologickú expresiu a pomocou tohto systému sme klonovali BGC26 zo *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* CCM 3239 pod kontrolou kasOp* a dokázali produkciu pyrolidínového sekundárneho metabolitu anizomycínu v heterologickom kmeni *S. coelicolor* M1146. Charakterizovali sme produkciu sekundárnych metabolitov u viacerých mutantov v auricínovom BGC. V prípade mutantu v gene *sa48* sme charakterizovali auricínový medziprodukt SA48B. Jeho štruktúrna analýza preukázala, že sa jedná o aglykón auricínu. SA48B bol však oveľa stabilnejší ako auricín a rovnako aj antibioticky účinnejší. Navyše vykazoval vysokú cytotoxicitu oproti viacerým ľudským nádorovým bunkovým líniam, a najmä voči mnohým ľudským leukemickým bunkovým líniam, čo je sľubným predpokladom pre jeho možné využitie pri liečbe leukémie. Charakterizovali sme mechanizmus jeho účinku pri indukcií apoptózy sprevádzanej blokom v G2/M fáze bunkového cyklu. Charakterizovali sme mechanizmus laktonizácie SA48A na SA48B pomocou purifikovanej cyklázy Sa48. Prípravili sme nový systém syntetickej biológie založený na monocistronických jednotkách (kasOp*-RBS-gén-terminátor), umožňujúci ich postupné pripájanie do syntetických BGC, ktorý sme úspešne verifikovali biosyntetickými génmi pre angucyklínové antibiotikum

landomycín a aromatickú polyketidovú protinádorovú látku mitramycín. Potvrdili sme biosyntetickú dráhu tvorby aglykónu mitramycínu s kritickou úlohou acyl-CoA syntetázy MtmL. Týmto sme overili a optimalizovali tento nový systém, čo umožňuje jeho použitie pri biosyntéze nových a modifikovaných sekundárnych metabolitov s potenciálne novými biologickými vlastnosťami.

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

We prepared a new system for insertion of the strong kasOp* promoter into the chromosome of streptomycetes. We successfully verified this in the strain *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* CCM 3239 by inserting kasOp* in front of several biosynthetic gene clusters (BGC). In the case of BGC2, we proved the induction of new yeast-active secondary metabolites, strevertene A2 and X, which we isolated and structurally characterized. In the case of BGC11, we proved the induction of a putative cyclic peptide active against Gram-positive bacteria. In the case of BGC21, we proved the induction of a putative cyclic thiopeptide similar to lactazole. We optimized TAR cloning of the auricin and jadomycin BGCs for their heterologous expression and used this system to clone BGC26 from *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* CCM 3239 under the control of kasOp* and proved the production of the pyrrolidine secondary metabolite anisomycin in the heterologous strain *S. coelicolor* M1146. We characterized the production of secondary metabolites in several mutants in the auricin BGC. In the case of mutants in the sa48 gene, we characterized the auricin intermediate SA48B. Its structural analysis showed that it is an auricin aglycone. However, SA48B was much more stable than auricin and also more antibiotically effective. In addition, it showed high cytotoxicity against several human tumor cell lines, and especially against many human leukemia cell lines, which is a promising premise for its possible use in the treatment of leukemia. We characterized the mechanism of its action in the induction of apoptosis accompanied by a block in the G2/M phase of the cell cycle. We characterized the mechanism of lactonization of SA48A to SA48B using purified Sa48 cyclase. We have prepared a new system of synthetic biology based on monocistronic units (kasOp*-RBS-gene-terminator), enabling their gradual attachment to synthetic BGCs, which we successfully verified with biosynthetic genes for the angucycline antibiotic landomycin and the aromatic polyketide antitumor substance mithramycin. We confirmed the biosynthetic pathway of mithramycin aglycon formation with the critical role of acyl-CoA synthetase MtmL. We have thereby validated and optimized this new system, enabling its use in the biosynthesis of new and modified secondary metabolites with potentially new biological properties.