

Rola białek regulatorowych CpkO i CpkN w procesie syntezy coelimycyny oraz w szlakach produkcji innych antybiotyków u *Streptomyces coelicolor* A3(2)

(Bartosz Bednarz)

STRESZCZENIE

Bakterie z rodzaju *Streptomyces* są producentami rozległego szeregu metabolitów wtórnych, z których wiele znalazło zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako antybiotyki, immunosupresanty i leki przeciwnowotworowe. Geny syntezy metabolitów wtórnych są na chromosomie zgrupowane w tzw. klastry genów biosyntetycznych (ang. biosynthetic gene clusters – BGCs), które zawierają w sobie również geny białek regulatorowych, specyficznych dla danego klastra. Wśród nich wyróżniamy rodzinę białek regulatorowych syntezy antybiotyków u *Streptomyces* – SARPów (ang. *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins), których przedstawiciele są bezpośrednimi aktywatorami transkrypcji genów biosyntetycznych.

Coelimycyna (CPK) jest metabolitem wtórnym produkowanym przez organizm modelowy *Streptomyces coelicolor* A3(2) w ściśle określonych warunkach, podczas przejścia hodowli bakteryjnej z fazy wzrostu eksponencjalnego w fazę stacjonarną. Syntaza poliketydowa Cpk tworzy hydroksyaldehyd, który po dodatkowych modyfikacjach enzymatycznych przekształca się w bezbarwny związek o właściwościach antybiotycznych (abCPK). Następnie abCPK ulega spontanicznym reakcjom z wybranymi związkami zawartymi w medium hodowlanym, traci swoje właściwości antybiotyczne i tworzy żółty barwnik, którego zidentyfikowanymi do tej pory składnikami są coelimycyna P1 i P2. Przez ponad 50 lat badań nad *S. coelicolor* A3(2) brak było artykułów naukowych opisujących obserwację tego metabolitu wtórnego, pomimo jego wyraźnego zabarwienia. Wynika to ze ścisłej kontroli produkcji coelimycyny przez skomplikowane mechanizmy regulacyjne, w tym zjawisko quorum sensing i represję kataboliczną oraz działanie regulatorów plejotropowych.

W kaskadzie sygnałów regulujących ekspresję genów klastra *cpk* biorą udział dwa białka z rodziny SARP – CpkO i CpkN. Przewidywaną funkcją tych regulatorów jest

bezpośrednia aktywacja ekspresji genów syntazy Cpk – syntazy poliketydowej typu I. W dotychczasowych badaniach udowodniono, iż białko CpkO jest wymagane w procesie syntezy CPK oraz wykazano, że delecja kodującego je genu skutkuje obniżoną/wyciszoną transkrypcją wybranych genów *cpk*. Brak natomiast informacji na temat białka CpkN, należącego to tej samej rodziny regulatorów. Badania nad innymi białkami z rodziny SARP (ActII-orf4, RedD, RedZ, CdaR) dowiodły, iż te regulatory, uważane dotychczas za specyficzne względem własnych klastrów genów, mogą również działać jako regulatory plejotropowe i kontrolować szlaki produkcji innych metabolitów wtórnych.

Celem niniejszej pracy było dokładniejsze scharakteryzowanie funkcji białka CpkO i zbadanie funkcji białka CpkN w procesie syntezy coelimityny oraz zidentyfikowanie ścieżek produkcji innych antybiotyków, będących pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą tych regulatorów w *Streptomyces coelicolor* A3(2). By osiągnąć te cele stworzono mutantą *S. coelicolor* A3(2) z delecją genu *cpkO* oraz mutantą z przerwana ciągłością genu *cpkN*, po czym zbadano ich profile produkcji antybiotyków. Następnie przeanalizowano proteomy mutantów przy użyciu proteomicznej metody „bottom-up, label-free shotgun” i porównano z profilem białkowym szczepu dzikiego M145. W ostatnim etapie pracy ustalono dokładne profile transkrypcji wybranych genów klastra *cpk* w mutantach oraz szczepie dzikim *in vivo*, przy użyciu systemu reporterowego opartego na lucyferazie.

Osiągnięciem niniejszej pracy jest potwierdzenie, iż białko CpkO jest głównym aktywatorem klastra *cpk*, aktywującym transkrypcję większości genów *cpk*, włącznie z *cpkN*, natomiast białko CpkN jest odpowiedzialne za aktywację genu *scoT*, kodującego tioesterazę typu II, niezbędną do produkcji coelimityny. Te obserwacje oraz analiza danych literaturowych umożliwiły zaproponowanie dokładniejszego mechanizmu regulacji syntezy CPK. Co więcej, dzięki analizie fenotypowej i proteomicznej wykazano, iż białka regulatorowe CpkO i CpkN wywierają również wpływ na inne szlaki biosyntezy – aktynorodyny, undecylprodigiozyny i antybiotyku zależnego od wapnia. W pracy przedyskutowano możliwe wyjaśnienie tych zjawisk na poziomie molekularnym.