

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE



Príprava biologicky aktívnych látok na báze rekombinantných proteínov

ITMS: 26240220048

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





- **Druh projektu:**
žiadateľský projekt v rámci „Prenos poznatkov a technológií získaných výskumom a vývojom do praxe v Bratislavskom kraji“
- **Žiadateľ projektu:**
PriFUK, Katedra molekulárnej biológie
- **Zodpovedný riešiteľ projektu za partnera a názov príslušnej fakulty:**
Prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.
Prírodovedecká fakulta UK

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Stručná anotácia projektu:

Základom realizácie projektu je dobudovaniu výskumnej infraštruktúry žiadateľa prostredníctvom vybudovania špičkového pracoviska:

- zvýšeniu potenciálu žiadateľa využiť výskum v oblasti biomedicíny s dopadom aj na ďalšie strategické oblasti a prioritné smeru výskumu a vývoja (biotechnológie, ochrana zdravia, nové materiály a technológie), výrazným spôsobom zlepši podmienky vzdelávacieho procesu a prípravy novej generácie vedeckých pracovníkov, ako aj vysokokvalifikovaných pracovníkov pre súvisiace high-tech priemyselné odvetvia,
- zvýšenie kvality ľudského potenciálu regiónu, projekt vytvorí priaznivé podmienky na bezprostrednú spoluprácu priemyslu s akademickou výskumno-vývojovou základňou, čo umožní súčasne zvýšiť potenciál efektívneho prenosu vedeckých poznatkov do praxe, výrazným spôsobom skvalitní a uľahčí už prebiehajúci výskum tak pre potreby praxe, ako aj už prebiehajúcich domácich a medzinárodných projektov, umožní vstup vedeckých tímov podieľajúcich sa na projekte do medzinárodných sietí a zvýši ich konkurencieschopnosť pri súťaži o zdroje 7. RP EÚ pre výskum a vývoj ako aj ďalších medzinárodných zdrojov, realizácia projektu umožní zlepšenie situácie v oblasti komercializácie poznatkov.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Hlavný zámer/ciele projektu:

- *Realizácia špičkového biomedicínskeho výskumu a zvýšenie potenciálu spolupráce Prírodovedeckej fakulty UK s priemyselnou praxou*
- Špecifický cieľ 1: Skvalitnenie výskumnej infraštruktúry a zefektívnenie vedecko – vzdelávacích činností
- Špecifický cieľ 2: Aplikovaný výskum v oblasti expresie a purifikácie rekombinantných proteínov a diseminácia výsledkov výskumu

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Aplikovaný výskum v oblasti rekombinantných proteínov

- Cieľom aktivity je vývoj nových produkčných kmeňov a zavedenie nových postupov pri expresii a purifikácii rekombinantných proteínov, výskum ich funkcie a biologických vlastností
- Aplikovaný výskum smeruje k využitiu získaných poznatkov v humánnej medicíne

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Spôsob riešenia projektu:

- Vybudovanie špičkového pracoviska pre výskum a vývoj rekombinantných proteínov
- Výskum biologických vlastností rekombinantného proteínu a definovanie podmienok jeho dlhodobého uchovávanania
- Sledovanie analytických parametrov pripravených rekombinantných proteínov
- Návrh postupov pre kultiváciu produkčného kmeňa a produkciu rekombinantných proteínov

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Dosiahnuté výsledky v projekte:

- Riadne ukončenie verejnej súťaže na predmet zákazky: Prístrojové vybavenie pre výskum rekombinantných nukleových kyselín a proteínových biomakromolekúl rekombinantného pôvodu
- Riadne ukončenie verejnej súťaže na predmet zákazky: Chemikálie a spotrebný materiál pre biomedicínsky výskum

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava rekombinantného ľudského rastového hormónu - hGH

rekombinantný hGH (rHGH) –

proteín zložený zo 191 aminokyselín – stabilizovaný 2 disulfidovými väzbami, bez posttranslačných modifikácií

Produkt s vysokou hodnotou

Požiadavka pre zlepšenú, účinnú a nízkonákladovú produkciu rhGH

Aplikácia racionálneho designu – dve stratégie:

- Produkcia inklúzných teliesok
- Produkcia rozpustného produktu

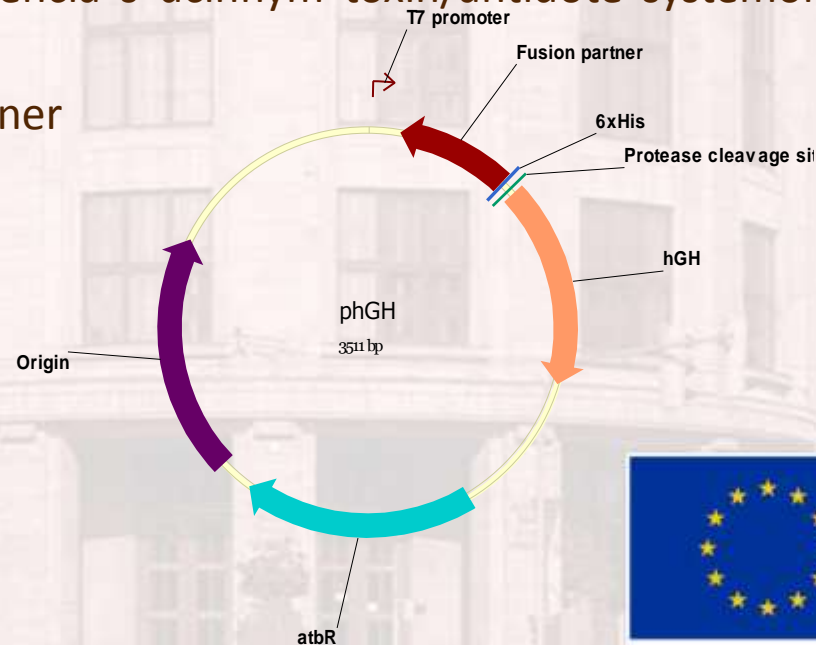
Dosiahnuté výsledky v projekte: Príprava rekombinantného ľudského rastového hormónu - hGH

Design expresného vektora

malá veľkosť (~3,5 kbp), vysokokópiový plazmid

antibiotiková rezistencia s účinným toxin/antidote systémom
zaisťuje stabilitu

výhodný fúzny partner



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte: Príprava rekombinantného ľudského rastového hormónu - hGH

Expresia indukovaná arabinózou v *E.coli*:

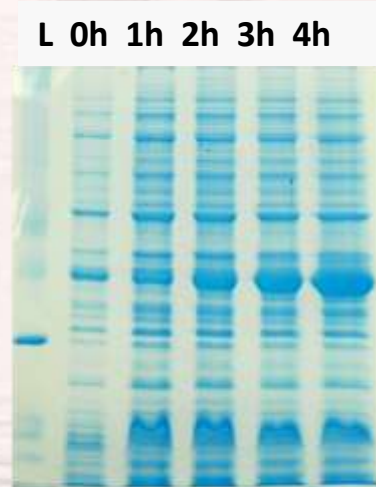
Tvorba inklúzných teliesok počas kultivácie pri 37°C

Rozpustný produkt počas kultivácie pri 29°C

V oboch prípadoch úroveň expresie dosahuje
asi 35% celkových bunkových proteínov

Laboratórna „batch“ fermentácia

výťažok ~150mg/l rekombinantného
produktu pri $OD_{600}=40-50$



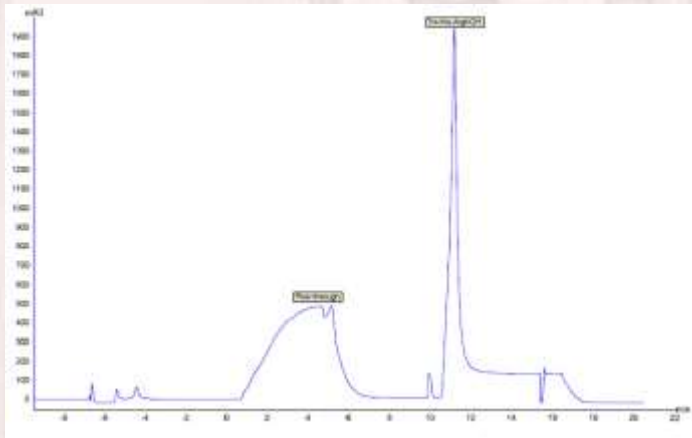
FP-rHGH

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava rekombinantného ľudského rastového hormónu - hGH

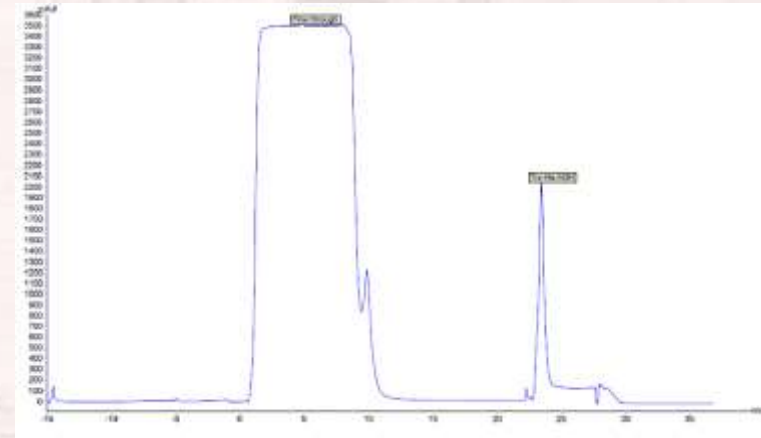
Purifikácia fúzneho proteínu pomocou FPLC-IMAC

Inklúzne telieska + 2-8M močovina



Následná dialýza – reagregácia ~30-40% produktu

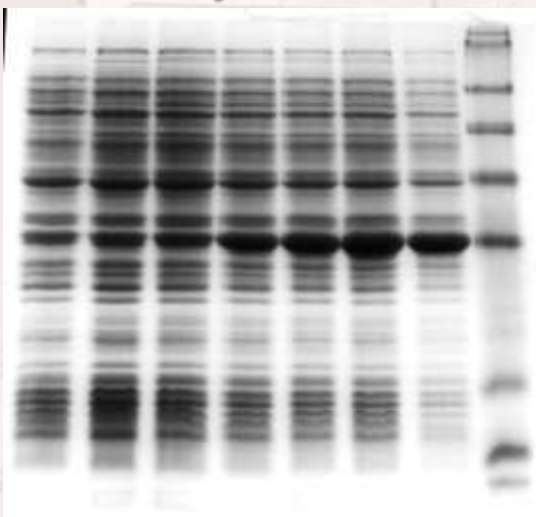
Rozpustný proteín



Produkt ostáva plne rozpustný po dialýze proti vode

Výsledky heterologickej expresie Trx-rhGH

banky



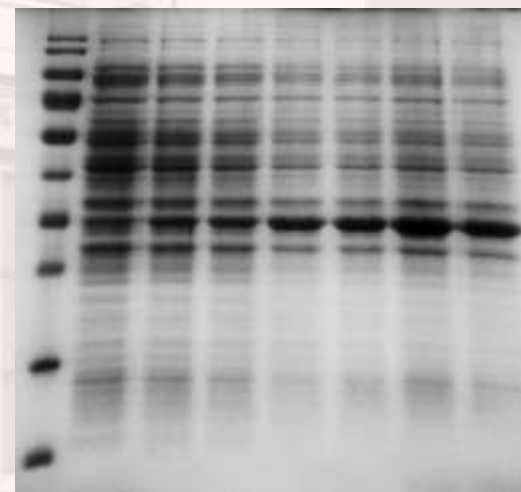
Expresia Trx-hGH v bankách, cca 25 % všetkých bunkových proteínov po 6h indukcie (LB médium)

batch



Expresia Trx-hGH počas batch fermentácie, cca 9% všetkých bunkových proteínov po 5h indukcie (TB médium)

fed-batch



Expresia Trx-hGH počas fed-batch fermentácie, cca 22% všetkých bunkových proteínov po 21h indukcie (chemicky definované médium)



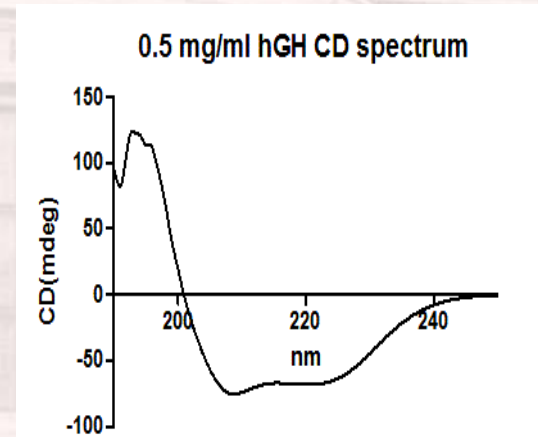
Štiepenie Trx-hGH enterokinázou (24h)

Podpora výskumných aktivít na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Meranie CD spektra a stanovenie aktivity rhGH

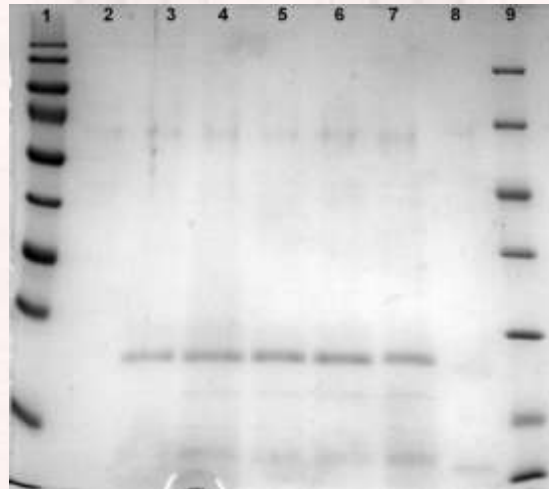
Zmerané spektrum (190-250nm) tvorí krivku príznačnú pre proteíny bohaté na α -helixy a tvarom sa nelíši od krivky natívnej molekuly hGH.



Predbežné výsledky merania aktivity rhGH na Nb2 bunkovej línii naznačujú schopnosť produkovanej molekuly navodiť proliferáciu buniek na úrovni pozitívnej kontroly (komerčne dostupný hGH) a na približne 10-krát vyššej oproti negatívnej kontrole (BSA)

Dosiahnuté výsledky v projekte: Produkcia rekombinantného ľudského rastového hormónu – hGH v *Pichia pastoris*

Pilotná fermentácia hGH pod inducibilným promótorom AOX – *Pichia pastoris*



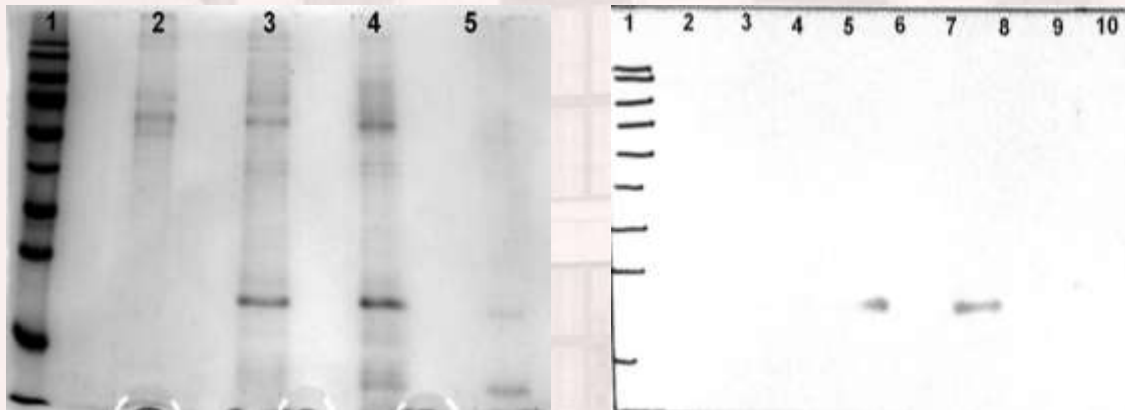
12% (V/V) SDS-PAGE gél na zistenie priebehu fermentácie pPh K19.

1 – lad PageRuler Prestained Protein Ladder; 2 – 0h od indukcie; 3 – 24h;
4 – 48h; 5 – 72h; 6 – 96h; 7 – 108h; 8 – r- hGH E.coli (10 μ l); 9 – lad
PageRuler Prestained Protein Ladder

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte: Produkcia rekombinantného ľudského rastového hormónu – hGH v *Pichia pastoris*

Western blot analýza vybraných vzoriek z fermentácie



1 - lad PageRuler Prestained Protein Ladder; 2 – vzorka pred indukciou: 0h (2,5 μ l); 3 – 48 hod od indukcie (100h celkovo)(3 μ l); 4 – ukončenie fermentácie: 108h od indukcie (160h celkovo)(5 μ l); 5– pozit. kontrola (E.coli rhGH) (10 μ l).

12% (V/V) SDS-PAGE priebehu fermentácie ako podklad pre **Western blot** analýzu. 1 - lad PageRuler Prestained Protein Ladder; 2 – vzorka pred indukciou: 0h (2,5 μ l); 3 – 48 hod od indukcie (100h celkovo)(3 μ l); 4 – ukončenie fermentácie: 108h od indukcie (160h celkovo)(5 μ l); 5– pozit. kontrola (E.coli rhGH) (10 μ l).

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

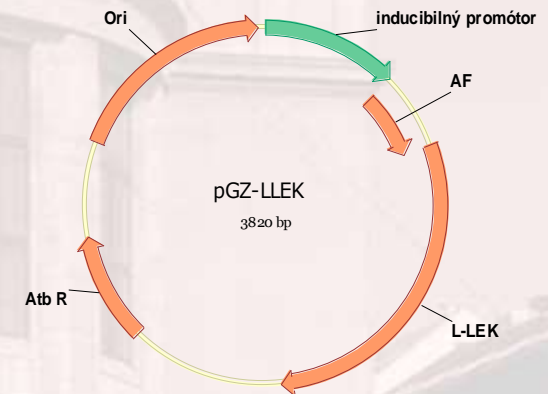
Dosiahnuté výsledky v projekte: Produkcia ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy (L-LEK) v bunkách *Pichia pastoris*

Enterokináza (EC 3.4.21.9) - je serín proteáza produkovaná enterocytmami v tenkom čreve u stavovcov, ktorá **aktivuje natívny substrát trypsinogén na trypsin** odštiepením N-koncovej časti peptidu.

Enterokináza má **vysoko špecifickú rozoznávaciu schopnosť** a odštiepuje N-koncový proteín od C-koncového tesne za týmito aminokyselinami, bez zostatku nežiadúcich aminokyselinových zvyškov na N-terminálnom konci, preto je enterokináza **ideálna proteáza pre štiepenie fúzných proteínov**.

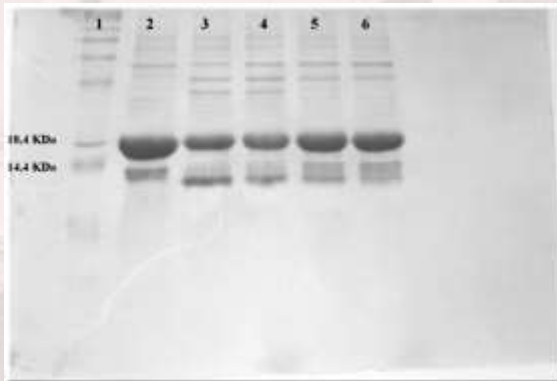
Prekurzorom je jednovláknový polypeptid zložený z ťažkého (82-140 kDa) a ľahkého (35-62 kDa) reťazca.

Ľahký reťazec je katalytická podjednotka enteropeptidázy a obsahuje doménu podobnú serínovej proteáze chymotrypsínu.



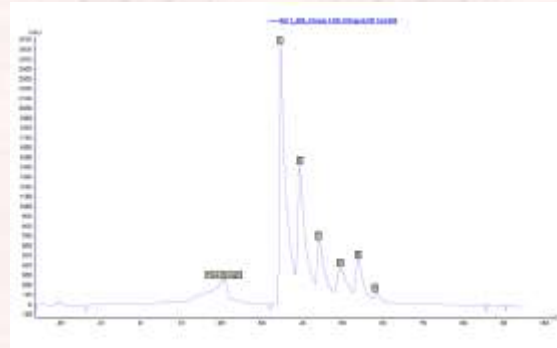
Dosiahnuté výsledky v projekte: Produkcia ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy (L-LEK) v bunkách *Pichia pastoris*

Stanovenie aktivity L-LEK

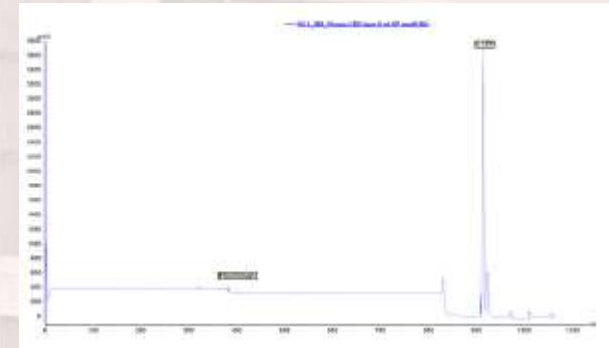


Stanovenie aktivity ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy L-LEK (1 μ l enterokinázy a 5 μ l substrátu) 1. dráha štandard molekulových hmotností 2. dráha: Trx-DCD1 (substrát; 2,4 mg/ml); 3. dráha: substrát štiepený L-LEK riedenou 1/3; 4. dráha: substrát štiepený L-LEK riedenou 1/10; 5. dráha: substrát štiepený L-LEK riedenou 1/30; 6. dráha: substrát štiepený L-LEK riedenou 1/100

Purifikácia L-LEK

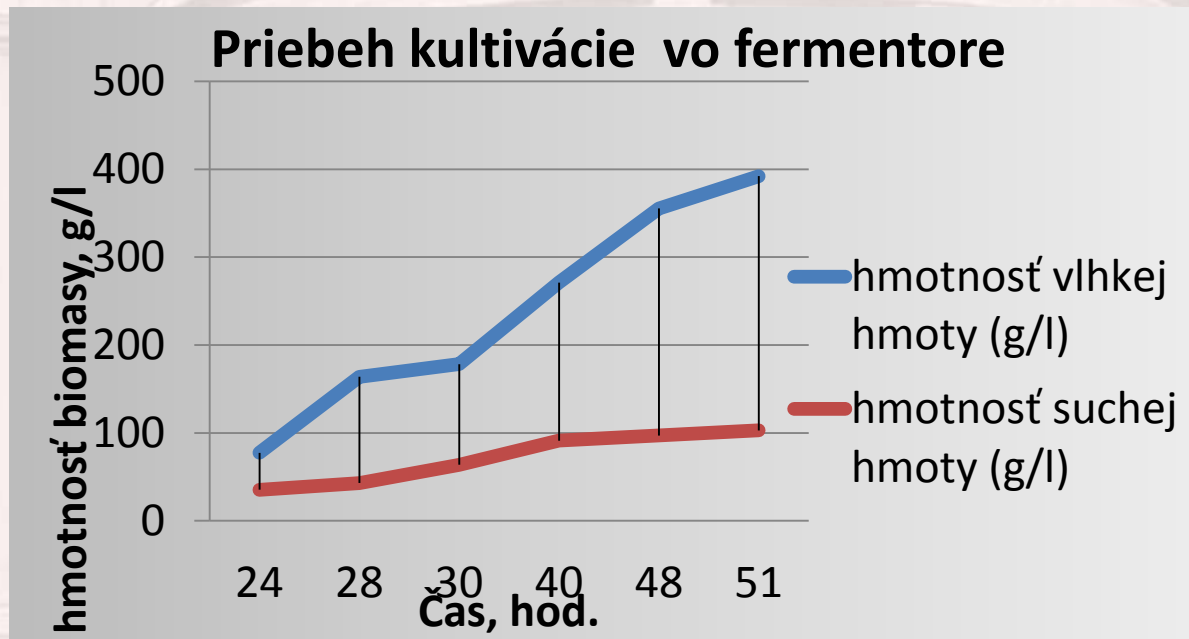


Chromatogram z purifikácie L-LEK pomocou anexovej chromatografie na HiTrap HP kolóne s objemom 1 ml. 1. až 3. frakcia obsahovala L-LEK



Chromatogram z purifikácie L-LEK pomocou IMAC, kedy boli použité HiTrap kolóna s objemom 5 ml.

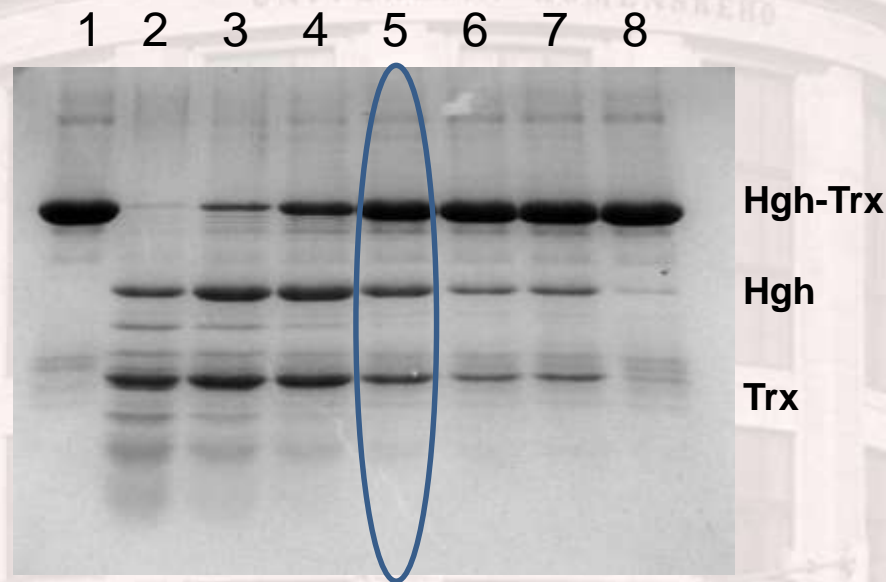
Dosiahnuté výsledky v projekte: Produkcia ľahkého reťazca ľudskej enterokinázy (L-LEK) v bunkách *Pichia pastoris*



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Štiepenie Trx-Hgh s rEK_L



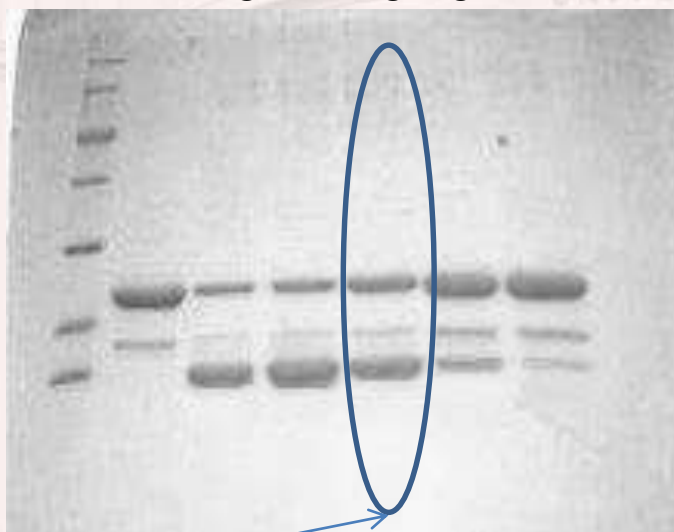
SDS-PAGE štiepenia Trx-Hgh s rEK_L 1h, 37°C

1: Hgh-Trx substrát (20 µg), 2: Hgh štiepený s rEK_L (640 ng),
3: Hgh štiepený s rEK_L (213 ng), 4: Hgh štiepený s rEK_L (64 ng),
5: Hgh štiepený s rEK_L with rEK_L (21,3 ng), 6: Hgh štiepený s rEK_L (6,4 ng),
7: Hgh štiepený s rEK_L rEK_L (2,13 ng), 8: Hgh štiepený s rEK_L with rEK_L (0,64 ng),

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Štiepenie Trx-DCD1 pomocou rekombinantnej hEKL

1 2 3 4 5 6 7



18,4 kDa

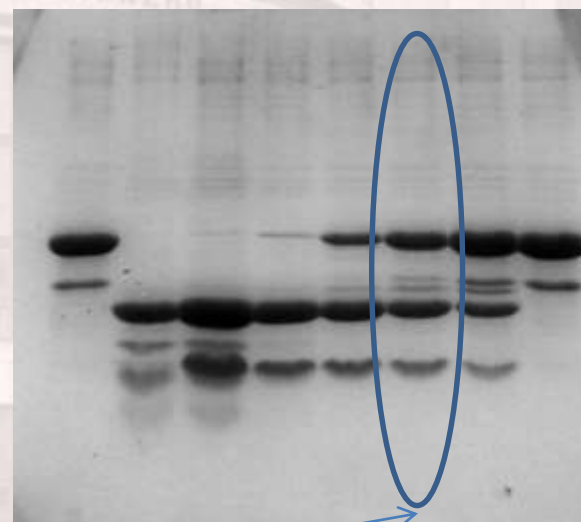
14,4 kDa

Trx-DCD1

Trx

Štiepenie Trx-DCD1 pomocou rekombinantnej hEKL

1 2 3 4 5 6 7 8



Trx-DCD1

Trx

DCD1

50 % poštiepený substrát Trx-DCD

0,16 μg (1 μl) rEK_L = 0,5 μg EK Max (1 μl)



50 % poštiepený substrát Trx-DCD

1 μl rEK_L = 3U EkMax

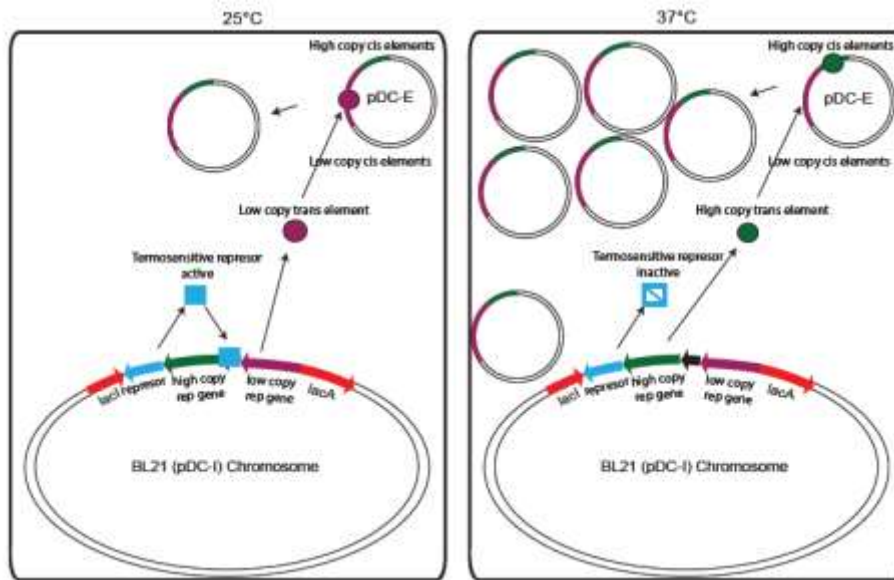
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava hostiteľského kmeňa *E. coli* s dvojitou reguláciou expresie rekombinantných proteínov

Bazálna expresia toxických proteínov
potlačený rast a expresia (čo sú nežiaduce javy)



Kontrola počtu kópií plazmidového vektora:

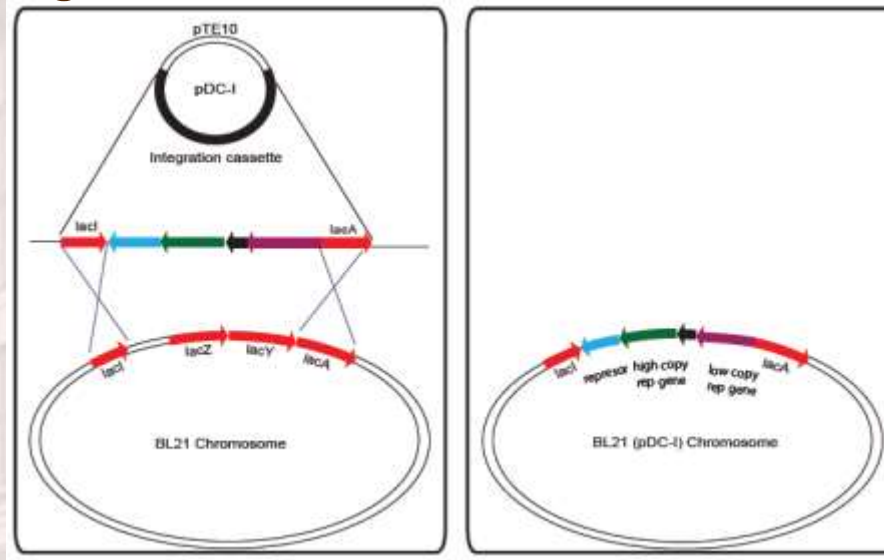
Nízky počet kópií – inhibícia bazálnej expresie

Vysoký počet kópií – indukcia expresie s vysokou úrovňou

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava hostiteľského kmeňa *E. coli* s dvojitou reguláciou expresie rekombinantných proteínov

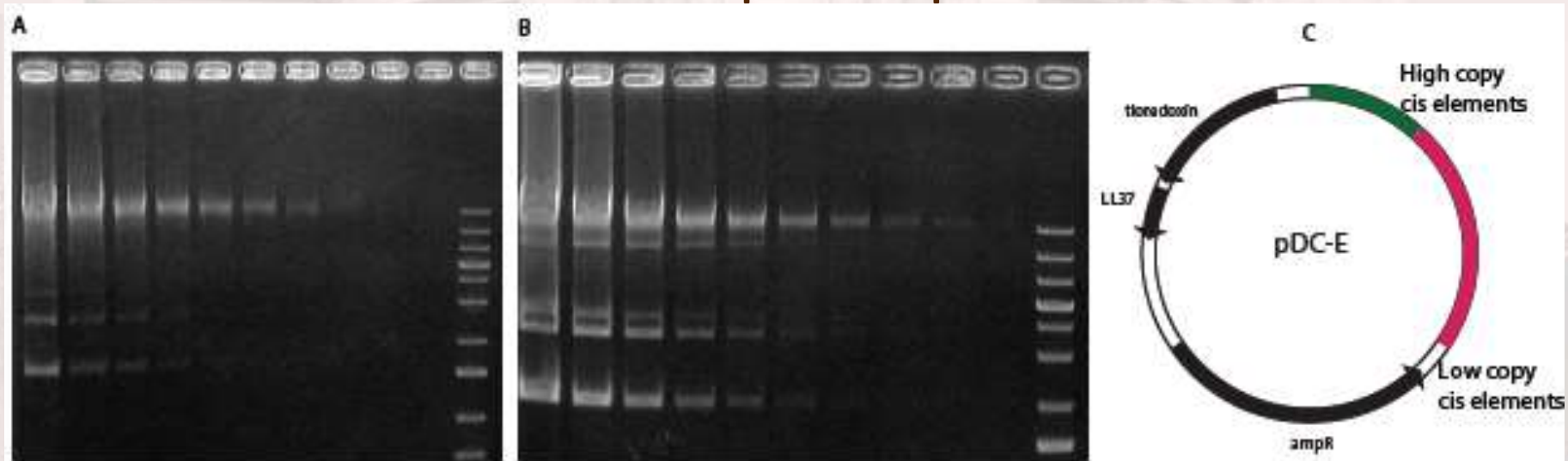
Integrácia trans-elementov do chromozómu



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Príprava hostiteľského kmeňa *E. coli* s duálnou reguláciou expresie rekombinantných proteínov

Konštrukcia expresného plazmidu



A – Agarózová gél. elektroforéza s 2-nás. riedením celkovej DNA extrahovanej z buniek kultivovaných pri 27°C

B - Agarózová gél. elektroforéza s 2-nás. riedením celkovej DNA extrahovanej z buniek kultivovaných pri 37°C

C – Fyzikálna mapa expresného plazmidu

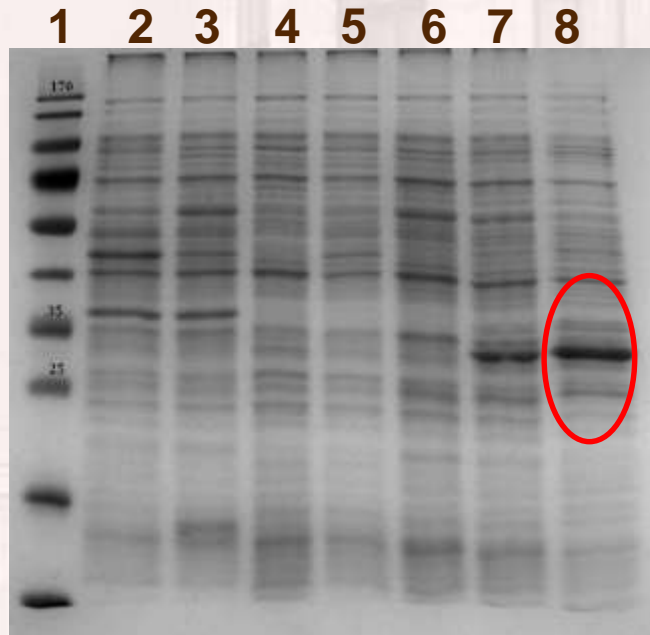
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Overenie Duálneho systému – expresná kazeta obsahuje r-hGH v bunkách BL21ai so zaintegrovanou DCI kazetou.

**Indukcia teplotou 42°C/30min – na zvýšenie replikácie
Indukcia arabinózou 0,1%**



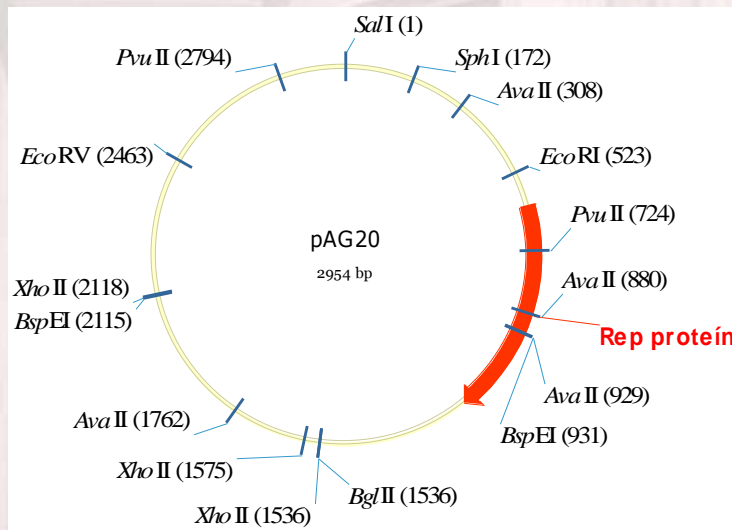
12% SDS-PAGE:

1. Ladder,
2. BL21ai(DCI)H2/28°C,
3. BL21ai(DCI)H2/42°C,
4. BL21ai(DCI)N4-pDCE/hGH-5d neinduk.,
5. BL21ai(DCI)N4-pDCE/hGH-5d 28°C,
6. BL21ai(DCI)N4-pDCE/hGH-5d 42°C/30min,
7. BL21ai(DCI)N4-pDCE/hGH-5d 42°C/30min/arabinóza 2hod,
8. BL21ai(DCI)-pDCE/hGH-5d 42°C/30min/arabinóza 4hod

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

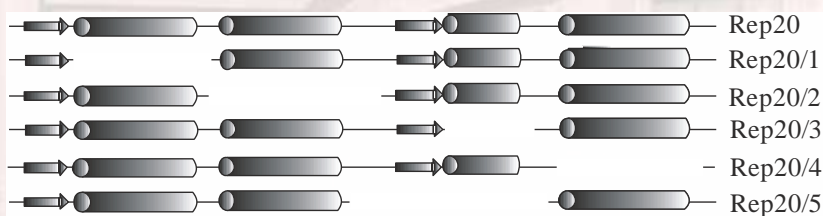
Identifikácia miesta interakcie medzi Rep20 proteínom a oblasťou replikácie plazmidu pAG20



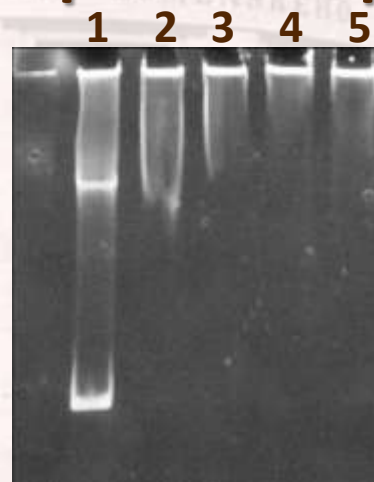
Rep proteíny interagujú s regulačnou oblasťou DNA molekuly pomocou sekundárnej štruktúry zloženej z intermitentných alfa-helixov (HTH motív). Rep proteíny niektorých replikónov majú dôležitú druhú funkciu - rozpoznávajú opačne opakované sekvencie (operátory) ktoré prekrývajú promótor ich vlastných kódujúcich génov, a pôsobia ako vlastné represory.

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Identifikácia miesta interakcie medzi Rep20 proteínom a oblasťou replikácie plazmidu pAG20



Pripravili sme niekoľko mutantov HTH oblasti a identifikovali DNA-väzbové miesto a jeho polohu v treťom α -helixe



Electromobility shift assay: mutantný Rep20/1; Vzorky sme delili v 4% w/v polyakrylamidovom géli pri laboratórnej teplote $20 \pm 2^\circ\text{C}$) v tlmivom roztoku 45 mM Tris-borát , 2,5 mM EDTA, pH 7.8

1. dráha – 421 nt/ 0,1 μl substr. DNA
2. dráha - DNA + 1 ng Rep20 proteín
3. dráha – DNA + 2 ng Rep20 proteín
4. dráha –DNA + 5 ng Rep20 proteín
5. dráha – DNA + 10 ng Rep20 proteín

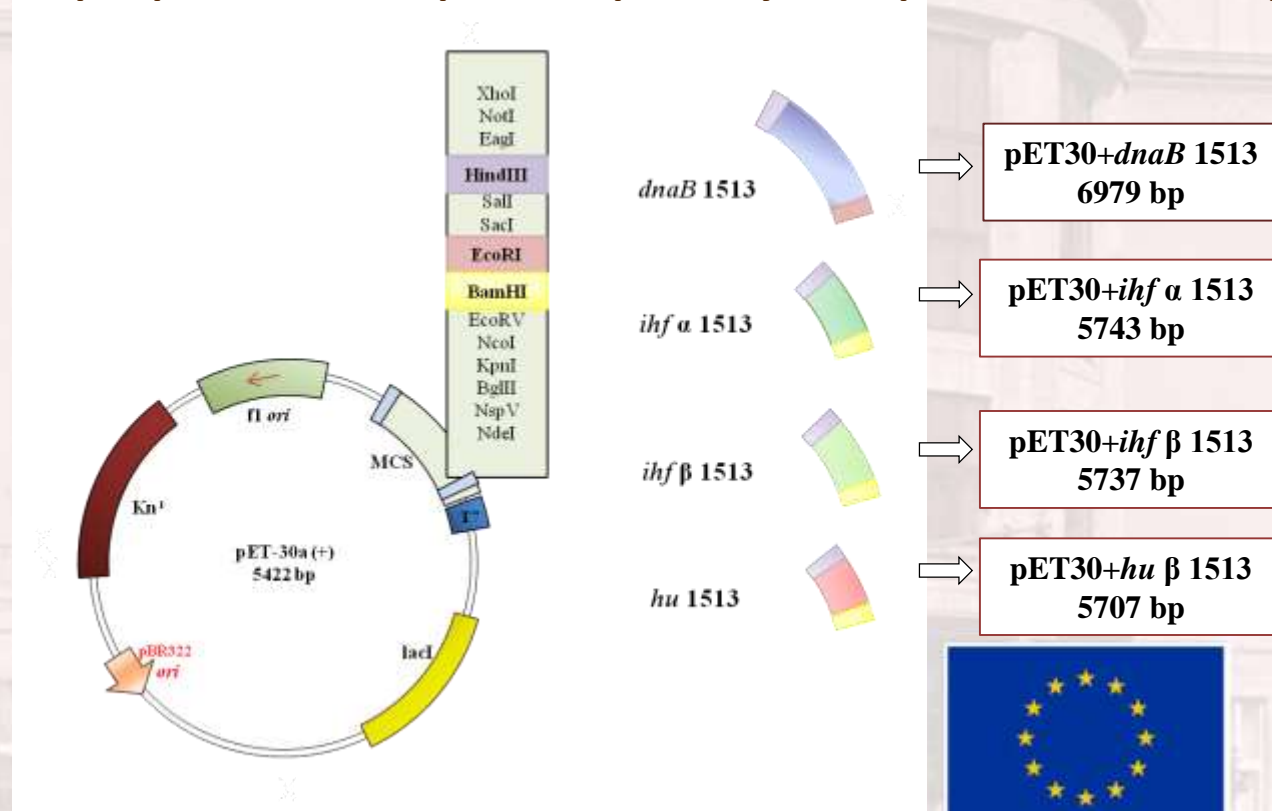
1. Pripravili sme súbor delečných derivátov replikačného proteínu Rep20 v Helix-turn-Helix motíve.
2. Všetky proteíny sme purifikovali s využitím IMAC FPLC.
3. Identifikovali sme tretí α -helix ako väzbové miesto proteínu k DNA molekule.
4. Identifikovali sme pravdepodobné väzbové miestov *rep* géne, ktoré pravdepodobne hrá úlohu v regulačnom mechanizme replikácie plazmidu

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

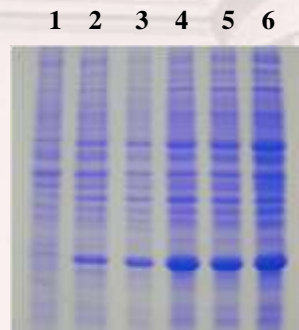
Charakterizácia proteínov vytvárajúcich replizóm v bunkách octových baktérií

Klonovanie génov pre potenciálne replikačné proteíny do expresného vektora pET-30a(+)

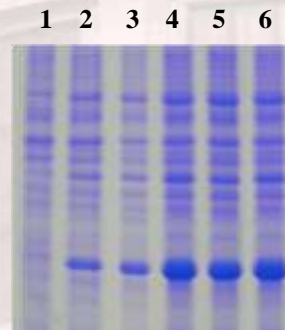


Dosiahnuté výsledky v projekte:

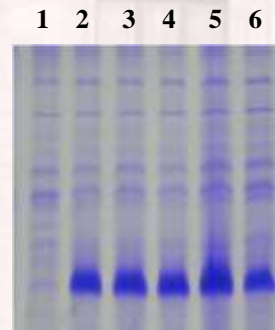
Charakterizácia proteínov vytvárajúcich replizóm v bunkách octových baktérií - nadprodukcia proteínov T7 expresným systémom



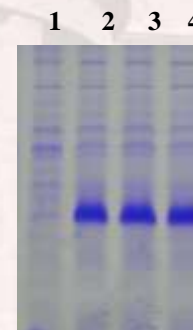
Ihf α 1513



Ihf β 1513



HU 1513



DnaB 1513

Nadexpresia replikačných génov fúzovaných s hexahistidínovou sekvenciou v bunkách *E. coli* BL21 (DE3) v časovej závislosti pôsobenia induktora IPTG s výslednou koncentráciou 1 mmol.l⁻¹ v 12% SDS-PAGE.

1.dráha – bez IPTG
2.-8.dráha – s IPTG

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

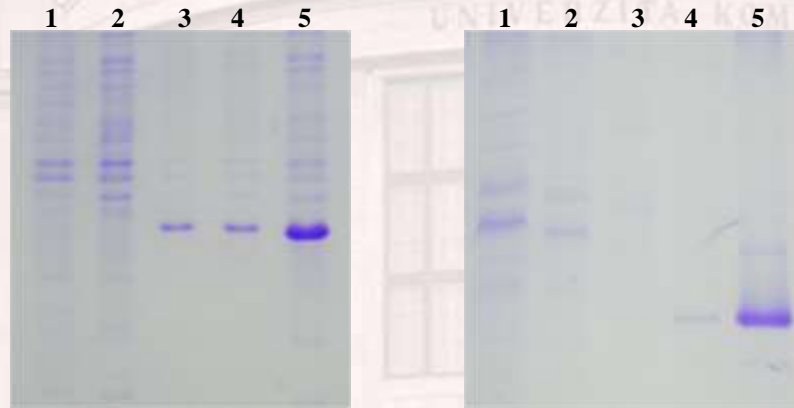


Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Dosiahnuté výsledky v projekte:

FPLC purifikácia nadprodukovaných proteínov



DnaB 1513

Ihf α 1513

1.-2. dráha – frakcia po nanesení
3.-4.dráha – frakcia po premytí
5. dráha – frakcia po elúcii

Produkty nadexpresie génov	Veľkosť produktov (aa)	Veľkosť produktov (kDa)
DnaB 1513	519 + 6 His	58,44
IHF α 1513	107 + 6 His	12,67
IHF β 1513	105 + 6 His	12,44
Hu 1513	95 + 6 His	11,33

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja

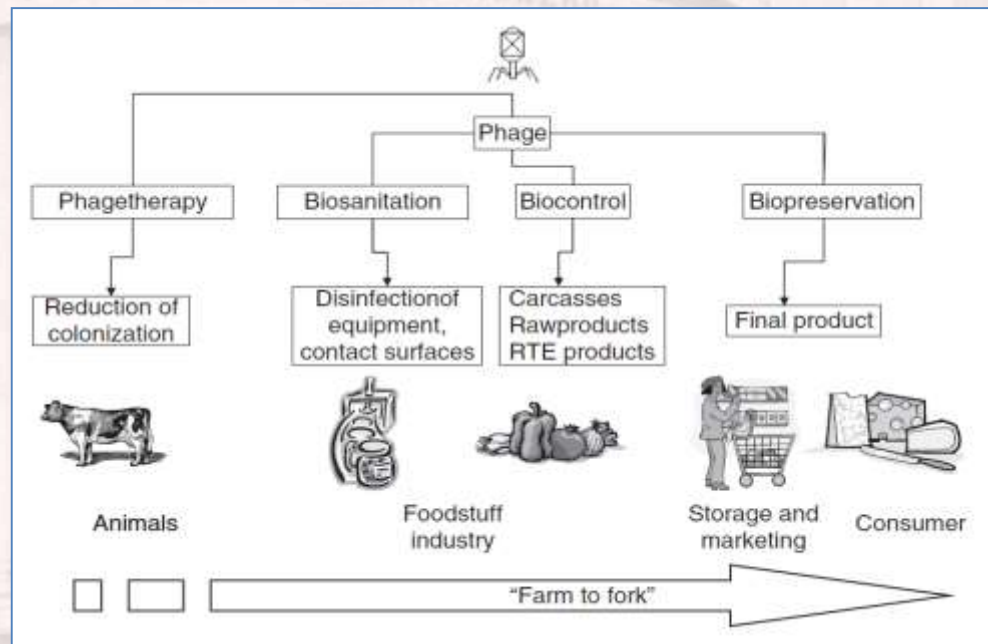


Dosiahnuté výsledky v projekte:

Aplikácia fágov a fágových proteínov pri bezpečnosti potravín

Fágy:

- infikujú všetky baktérie
- ľahko sa izolujú a množia
- self-replicating
- sú špecifické pre bakteriálne ciele
- netoxické pre ľudí a zvieratá
- nízka cena



Dosiahnuté výsledky v projekte:

Aplikácia fágov a fágových proteínov pri bezpečnosti potravín

Baktériofág Dev2 sme izolovali z čističky odpadových vôd v Bratislave jeho namnožením na indikátorovom kmeni *C. turicensis* 290708/7

Je schopný infikovať kmene *Cronobacter turicensis*, *Salmonella enterica* (serotypy Enteritidis, Typhimurium a Dublin) a *E. coli*

Kmene *C. sakazakii*, *C. malonaticus* a *C. muytjensii* boli citlivé na Dev2

Druh	Kmeň	EOP [%]	Morfológia plaku
<i>Cronobacter turicensis</i>	290708/7	100	veľký, číry, s „halo“
<i>Cronobacter turicensis</i>	LMG 23827	2	malý, turbídny
<i>Cronobacter turicensis</i>	NTU 9	0.01	malý, číry
<i>Salmonella</i> Enteritidis	5028	0.7	veľký, číry
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LT2	13	veľký, číry
<i>Salmonella</i> Dublin	4515	33	malý, číry
<i>E. coli</i>	BL21 DE3	0.0003	malý, turbídny



Elektrónový mikrogram fága Dev2



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja

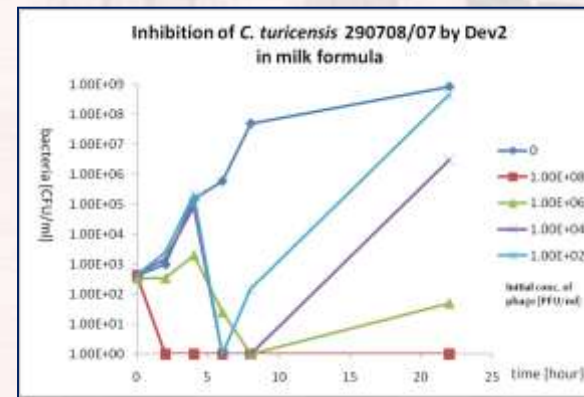
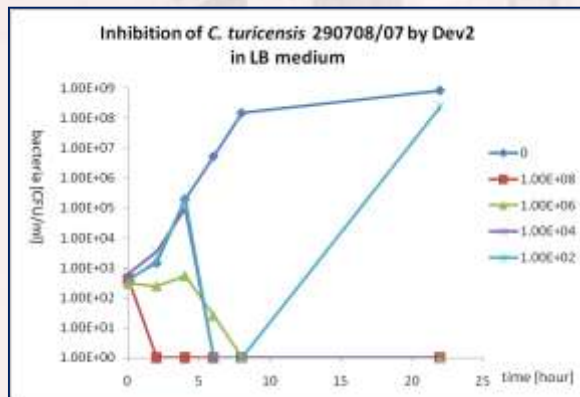


Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Aplikácia fágov a fágových proteínov pri bezpečnosti potravín

Inhibícia rastu *C. turicensis* fágom Dev2



- vysoká počiatková MOI (100 CFU/ml baktérií a 10^8 PFU/ml fágov) spôsobila úplné zabitie baktérií
- pri nízkej MOI boli baktérie zredukované pod hranicu detekčného limitu po 2-8 hodinách kultivácie
- prerastenie baktérií sme pozorovali po dlhšej perióde s použitím nízkej počiatkovej MOI
- zabitie baktérií bolo efektívnejšie v LB pôde ako v sušenom mlieku

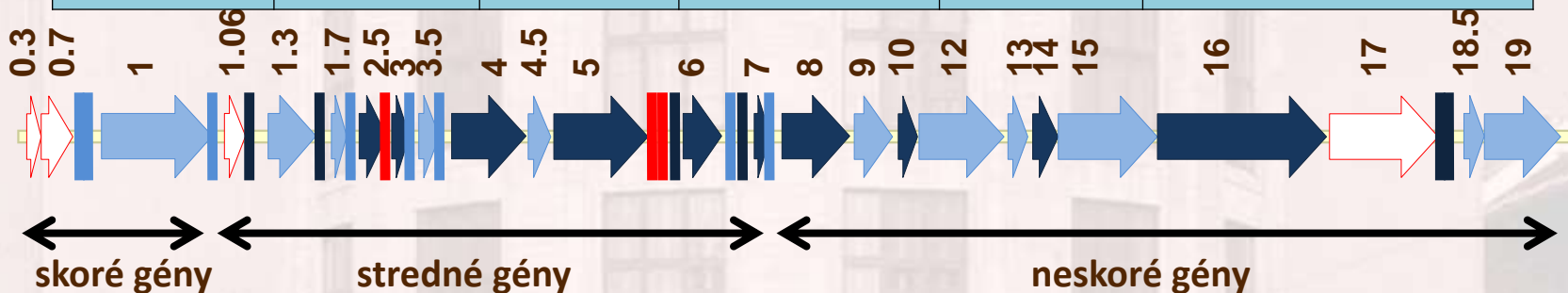
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Aplikácia fágov a fágových proteínov

Dev2 genóm pri bezpečnosti potravín

Veľkosť	GC pomer	Počet génov	Čeľaď	Skupina	Príbuzné fágy
39 kp	52,6 %	42	<i>Podoviridae</i>	T7-like	K1F, EcoDS1



- klonovanie a expresia Dev2 gp17 (tail fiber proteín) vo vektore pET28b
- využitie biologicky aktívneho proteínu s polysacharid hydrolázovou aktivitou (degraduje LPS)

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Dosiahnuté výsledky v projekte: Izolácia a charakterizácia bakteriofágov infikujúcich *Cronobacter spp.*

Fágy boli izolované z čističky odpadových vôd kultiváciou na indikátorových kmeňoch

Morfológia fágov bola sledovaná elektrónovou mikroskopiou

Sekvencia genómov bola stanovená Nextgen sekvenačnými metódami

Hostiteľská špecificita bola stanovená na paneli 50 kmeňov zaradených k rôznym druhom rodu *Cronobacter*

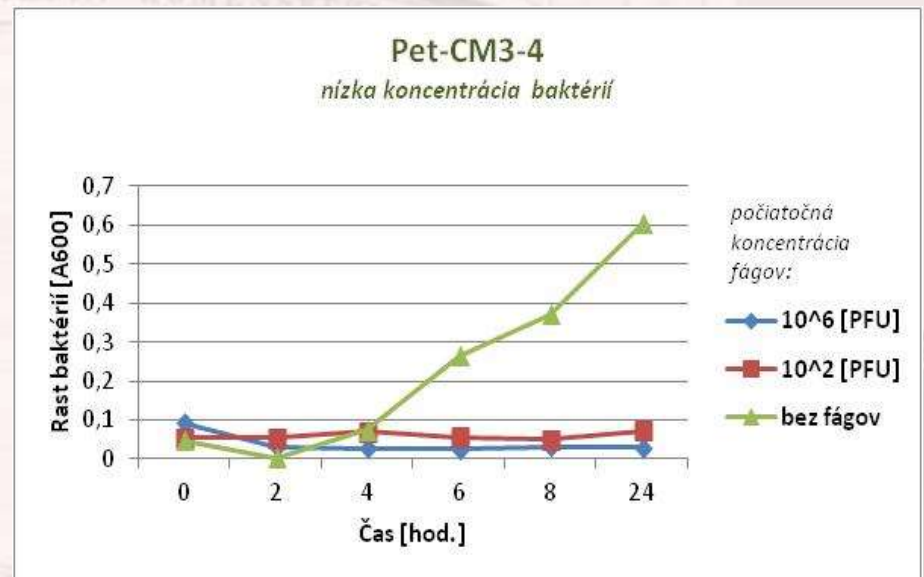
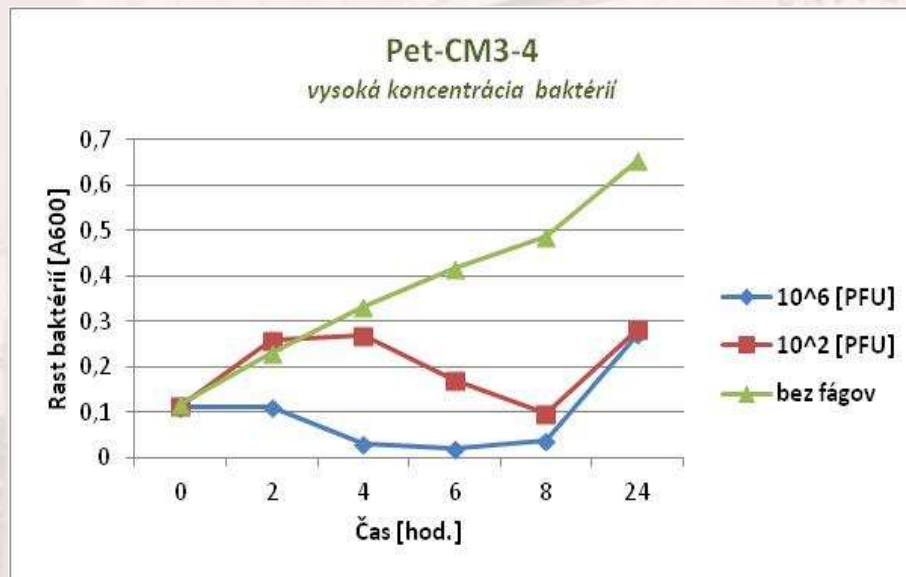


Meno	Veľkosť genómu (kbp)	Najpríbuznejší fág	Podobnosť	Skup.	Čeľaď	Hostiteľská špecificita
Dev2	39	K1F, EcoDS1	80%	T7	Podoviridae	2/50
Pet-CM3-4	172	CC31	95%	T4	Myoviridae	39/50
Dev-CS701-M	170	vB_CsaM_GAP161	95%	T4	Myoviridae	49/50
Dev-CT57M	40	vB_CskP_GAP227	95%	T7	Podoviridae	54/50
Dev-CD23-01	40	vB_CskP_GAP227	80%	T7	Podoviridae	39/50

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

Dosiahnuté výsledky v projekte:

Inhibícia rastu *C. malonaticus* 161007/29 fágom Pet-CM3-4



Izolované fágy je možné využiť na potlačenie rastu kmeňov *Cronobacter* v potravinách (sušenej detskej mliečnej výžive)

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Teluričitanová rezistencia

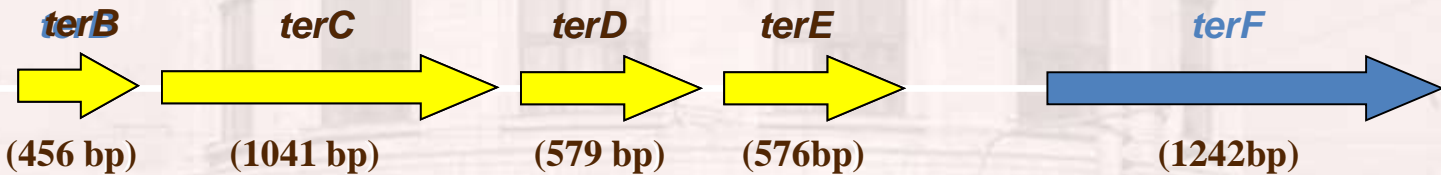
Teluričitanové oxyanióny (TeO_3^{2-}) - Najčastejšia forma výskytu telúru v prírode
- vysoko toxické hlavne pre Gram- baktérie (MIC pre *E. coli* = $<1\mu\text{g/ml K}_2\text{TeO}_3$)

Genetické determinanty teluričitanovej rezistencie (GDTR)

- 5 druhov GDTR u Gram- baktérií
- fixácia v genóme aj pri absencii selekčného tlaku (prítomnosť teluričitanu)
- častý výskyt u patogénnych kmeňov (napr. *E. coli* O157:H7, *E. coli* KL53)

Dakázaný pozitívny efekt na patogenicitu zvýšením odolnosti hostiteľského mikroorganizmu

Izolácia GDTR z klinického izolátu *E. coli* KL53 *ter* operon – štyri *ter* gény esenciálne pre navodenie rezistencie



- Molekulárny mechanizmus pre *ter* operón - špecifický mechanizmus, neznámy**
- Prístup – štúdium proteín-proteínových interakcií esenciálnych Ter proteínov**
- Identifikácia potenciálnych bunkových partnerov (*in vivo* crosslinking)**

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Identifikácia potenciálnych bunkových partnerov Ter proteínov

In vivo crosslinking

aplikácia DSP chemického crosslinker-a DSP (dithiobis[succinimidylpropionate])
voľný prechod cez bunkovú membránu – detekcia vnútrobunkových interakcií



Purifikácia
proteínových
komplexov

Produkcia cieľového Ter proteínu (IPTG/T7)



In vivo crosslinking

Bunkový lyzát

Ni-NTA
column

Štiepenie
väzby
crosslinkera

MS analýza -
identifikácia
kopurifikovaných
proteínov

Deplécia

Ni-NTA
column



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Identifikácia potenciálnych bunkových partnerov TerB proteínu



Acc. Num.	Entry
Q9X733_ECOLX	Tellurite resistance OS=Escherichia coli GN=terB PE=4 SV=1
C3SQN2_ECOLX	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli GN=slyD PE=3 SV=1
C3TRK2_ECOLX	Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli GN=dnaK PE=3 SV=1
B1B6S9_ECOLX	Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein (Fragment) OS=Escherichia coli GN=ahpC PE=4 SV=1
Q1XDY7_ECOLX	TerD protein OS=Escherichia coli GN=terD PE=4 SV=1
E2QL02_ECOLX	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Escherichia coli GN=fkIB PE=3 SV=1
Q9X735_ECOLX	Tellurite resistance OS=Escherichia coli GN=terE PE=4 SV=1
C3T3I7_ECOLX	Pseudouridine synthase OS=Escherichia coli GN=rsuA PE=3 SV=1
E2QK17_ECOLX	HIT-like protein ycfF OS=Escherichia coli GN=hinT PE=4 SV=1
C3SQ42_ECOLX	33 kDa chaperonin 1 OS=Escherichia coli GN=hslO1 PE=3 SV=1
C3T0B7_ECOLX	Bacterioferritin comigratory protein OS=Escherichia coli GN=bcp PE=4 SV=1
Q46977_ECOLX	RNase E (Fragment) OS=Escherichia coli GN=rne PE=4 SV=1
C3SP37_ECOLX	Nickel-responsive regulator OS=Escherichia coli GN=nikR PE=3 SV=1
C3TBH7_ECOLX	Thiol peroxidase OS=Escherichia coli GN=tpx PE=3 SV=1
C3T6W7_ECOLX	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB OS=Escherichia coli GN=msrB PE=3 SV=1
C3SKY2_ECOLX	Putative 2-component regulator OS=Escherichia coli GN=yifE PE=4 SV=1
E2QFJ4_ECOLX	Elongation factor Tu 1 OS=Escherichia coli GN=tufB PE=3 SV=1
Q6J0R8_ECOLX	Chloramphenicol acetyltransferase OS=Escherichia coli GN=cat PE=3 SV=1
D5LS48_ECOLX	Heat shock protein (Fragment) OS=Escherichia coli GN=grpE PE=3 SV=1

Deplécia

- +



TerB
~15kDa →

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja





Diseminácia dosiahnutých výsledkov

- *Diseminácia výsledkov výskumu na medzinárodných odborných konferenciách:*
- 11th Central European Forum of Biotechnology and Innovative BioEconomy, ČR, Brno, 2012
- Kongres IUMBM a FEBS, Španielsko, Seville, 2012
- Konferencia EMBO Viruses of Microbes, Belgicko, Brusel, 2012
- XXIII. Biochemický zjazd, ČR, Brno, 2012
- Konferencia 7. RPP (Recombinant protein production), Nemecko, Laupheim, 2013
- 26. Kongres československej spoločnosti mikrobiologickej, ČR, Brno, 2013
- 5. Kongres FEMS, Nemecko, Leipzig, 2013

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Diseminácia dosiahnutých výsledkov

- European biotechnology congress 2014, Taliansko, Lecce, 2014
- 16th European Congress on Biotechnology , Spojené kráľovstvo, Edinburgh, 2014
- FEBS EMBO 2014 Conference, Francúzsko, Paríž, 2014
- XXIV. Biochemický zjazd SSBMB A ČSBMB, Bratislava, Slovenská republika, 2014

SCI publikácie:

Levarki Z., Šoltýsová A., Krahulec, J., Stuchlík, S., Turňa, J. High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 100, 40-47, 2014

Osadská M., Boňková H., Krahulec J., Stuchlík, S., Turňa, J. Optimization of expression of untagged and histidine-tagged human recombinant thrombin precursors in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. May 2014, DOI 10.1007/s00253-014-5840-2

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





Kolektív riešiteľov z Katedry molekulárnej biológie PriFUK

Výskumní pracovníci:

Ján Turňa

Stanislav Stuchlík

Ján Krahulec

Hana Drahovská

Jozef Gronos

Marcela Bieliková

Roman Šmidák

Pavol Koiš

Alena Hajdúchová

Anna Belicová

Barbora Gaálová

Mária Mikulášová

Diana Hopková

Michal Kajsík

Michaela Osadská

Mária Orišková

Lucia Oslanecová

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja

