



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **APVV –0098-10**

**Príprava bakteriofágov a fágových proteínov na devitalizáciu patogénov v potravinách využitím prístupov syntetickej biológie**

Zodpovedný riešiteľ **Doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta
2. Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava
3. Národné poľnohospodárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 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. Hojckova, Stano, M., Klucar, L. (2013) phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzybiotics, relevant research studies and practical applications. BMC Microbiology 13, 53.
2. Vidová, B., Šramková, Z., Tišáková, L., Oravkinová, M., Godány, A. Bioinformatics analysis of bacteriophage and prophage endolysin domains. (2014) Biologia 69 (5), pp. 541-556.
3. Gičová, A., Orišková, M., Oslanecová, L., Drahovská, H., Kaclíková, E. Identification and characterization of Cronobacter strains isolated from powdered infant foods (2014) Letters in Applied Microbiology, 58 (3), pp. 242-247.
4. Kajsík, M., Oslanecová, L., Szemes, T., Hýblová, M., Bilková, A., Drahovská, H., Turňa, J. Characterization and genome sequence of Dev2, a new T7-like bacteriophage infecting

*Cronobacter turicensis* (2014) Archives of Virology 159 (11), pp. 3013-3019.

5. Kajsík, M., Krahulec, J., Tóth, C., Drahovská, H., Stuchlík, S., Turňa, J. *Cronobacter* control in reconstituted infant formula by combined application of cathelicidin LL-37 and bacteriophages (2014) Journal of Food and Nutrition Research, prijaté do tlače.

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky riešenia projektu priniesli nové poznatky o bakteriofágoch infikujúcich kmene *Salmonella* a *Cronobacter*. Zistili sme, že bakteriofágy so širokou hosťiteľskou špecificitou sú vhodné na použitie pri dekontaminácii a ochrane potravín. Aplikácia bakteriofágov v potravinách je v súčasnosti perspektívna aj vzhľadom na rozširujúcu sa rezistenciu patogénov na antibiotiká. Na základe získaných bakteriofágových sekvencií bude tiež možné pri ďalšom štúdiu izolovať fágové proteíny s antibakteriálnou aktivitou (endolýzíny, enzýmy fágových chvostíkov a skoré fágové proteíny), ktoré je možné uplatniť v terapii a v potravinárstve. Štúdium vlastností modelových fágových endolýzínov z fágov infikujúcich Gram-pozitívnych hosťiteľov prispelo k lepšiemu pochopeniu faktorov ovplyvňujúcich katalytickú a väzbovú aktivitu endolýzínov a v budúcnosti umožní pripraviť enzýmy so zvýšenou antimikrobiálnou aktivitou proti cieľovým organizmom. Vytvorený matematický model na predikciu rastu fágov a ich hosťiteľov je vhodný pre tvorbu simulácií na vyhľadanie vhodných podmienok pre fágovú terapiu a pre potravinárske aplikácie.

## **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

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

V rámci projektu sme izolovali a charakterizovali bakteriofágy vhodné na inaktiváciu baktérií v potravinách. Využitím postupov sekvenovania novej generácie sme stanovili celogenómovú sekvenciu bakteriofága Pet-SE1 infikujúceho salmonely, šiestich fágov z čeľadí Podoviridae a Myoviridae infikujúcich kmene rodu *Cronobacter* ako aj fága phiBP z priemyselného kmeňa *Paenibacillus polymyxa*. Získané sekvencie sme anotovali pomocou bioinformatických prístupov, popísali sme predpokladanú funkciu fágových génov a určili sme gény zodpovedné za hosťiteľskú špecificitu bakteriofágov. Na základe získaných výsledkov a overením v modelových podmienkach rekonštituovanej mliečnej výživy sme určili, že bakteriofágy so širokou hosťiteľskou špecificitou (Dev-CS701, Pet-CM3-4, Dev-CT57 a Dev-CD23823) sú vhodné na elimináciu kmeňov *Cronobacter* v potravinách. V rámci projektu sme tiež vytvorili matematický model rastu fágov a ich bakteriálnych hosťiteľov zahrňujúci parametre závislosti na zmene teploty a pH a umožnili jeho voľné využitie pomocou webovej aplikácie (<http://www.phisite.org/model>). Ďalšou časťou projektu bolo štúdium fágových lytických enzýmov. Pomocou bioinformatického porovnania sekvencií sme spracovali prehľad endolýzínov vyskytujúcich sa u fágov infikujúcich Gram-negatívne a Gram-pozitívne baktérie. Taktiež sme skúmali vlastnosti troch endolýzínov z fágov phiBP, BFK20 a  $\mu$ 1/6. Pripravili sme rekombinantné endolýzíny a ako aj ich samostatné katalytické a väzbové domény a určili sme enzymatické vlastnosti a hosťiteľskú špecificitu týchto proteínov. Cielenu mutagenezou sme stanovili aminokyseliny dôležité pre aktivitu proteínov.

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

In this project we isolated and characterized bacteriophages suitable for inactivation of bacteria in food. By next-gen sequencing approach we determined whole genome sequences of salmonella bacteriophage Pet-SE1, six phages belonging to Podoviridae and Myoviridae which are specific for *Cronobacter* strains and the phiBP phage from the industrial strain of *Paenibacillus polymyxa*. DNA sequences were annotated by bioinformatics methods, proposed functions of phage genes were determined and genes responsible for the host specificity were identified. Based on obtained results we concluded that bacteriophages possessing broad host specificity (Dev-CS701, Pet-CM3-4, Dev-CT57 and Dev-CD23823) are

suitable to be used for elimination of Cronobacter in food and the results were verified in model conditions of reconstituted milk formula. In the project we developed the mathematical model for the growth of phages and their hosts including several growth parameters as temperature and pH. Designed phage-host model is freely accessible for external users through the web application (<http://www.phisite.org/model>). The study of the phage lytic enzymes comprised another part of the project. We prepared the review of phage endolysins infecting Gram-negative and Gram-positive bacteria by using bioinformatics sequence comparisons. Properties of three endolysins from phages phiBP, BFK20 and  $\mu$ 1/6 were investigated in more detail. We prepared recombinant endolysins, isolated their catalytic and binding domains and determined enzyme properties and the host specificity of these proteins. By site-directed mutagenesis we determined aminoacids important for the activity.

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

**Zodpovedný riešiteľ**

Doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.

V Bratislave 25. 11. 2014

**Štatutárny zástupca príjemcu**

prof. RNDr. Karol Mičieta, PhD.

V V Bratislave 25. 11. 2014

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu