

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Doc. RNDr. P. Javorský, DrSc.	Evidenčné číslo projektu: APVV-0586-07
Názov projektu: Enzybiotiká - molekulárny dizajn nových antibakteriálnych látok degradujúcich bunkovú stenu Gram-pozitívnych kokov.	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice
	Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	<p>L. Maliničová, M. Píknová, P. Pristaš and P. Javorský : Uncovering the mechanism of resistance against type III bacteriocin, enterolysin A. In: ICAR 2010, Book of Proceedings, , Science and Technology against Microbial-Pathogens Research , Development and Evolution, Valladolid, Spain, 3-5 November 2010, pp. ...-</p> <p>Lenka Maliničová, Mária Píknová, Peter Pristaš, and Peter Javorský: Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Ed. A. Méndez-Vilas, 2011, pp...-..</p> <p>Lauková, A., Stropfňová, V.: Bacteriocin active enterococci from mastitis milk, Small Ruminant Research, 2011, pp ...-... .</p> <p>Tothova Timea, Elecko Juraj, Vasiľ Milan , Jaroslav Legath, Peter Pristas, Peter Javorsky: Limited genetic diversity of <i>Aerococcus viridans</i> strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis in Slovakia, Veterinary Microbiology, 2011, pp....-...</p> <p>Lenka Maliničova, Maria Píknova, Katarína Dubíková, Peter Pristaš, Peter Javorsky: Peptidoglycan hydrolase enterolysin A regognises lipoteichoic acid chains in the cell walls of sensitive bacteria, Molecular Microbiology, 2011, pp...-...</p>
V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Získané výsledky sa dajú použiť pri príprave nových antibakteriálnych substancií degradujúcich bunkovú stenu Gram-pozitívnych baktérií.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum: 29. 1. 2011.

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVV-0586-07

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Naše výsledky potvrdzujú, že bakteriolyzíny a bakteriocíny sú relatívne často produkované viacerými druhmi baktérií a sú aktívne voči mnohým baktériám podieľajúcim sa na vzniku mastitíd hovädzieho dobytku. Väčšina nami identifikovaných aktívnych látok však nepatrí do rodiny peptidoglykánových hydroláz ale k bakteriocínom – väčšinou II. typu, čo su malé tepelne stabilné proteíny.

V rámci projektu sa získalo celkovo 6 fágov aktívnych voči druhu *Enterococcus faecalis*, 3 z nich sa podrobnejšie charakterizovali, u dvoch sa klonovali lýticke moduly kódujúce endolyzíny. Komparatívna genomická analýza však ukázala, že minimálne časť týchto fágov je už známa vo forme profágov v genóme kompletne sekvenovaných druhov *E. faecalis*.

V zhode s výsledkami etapy č. 2 sme dokázali, že genómy Gram-pozitívnych baktérií sú bohatým zdrojom peptidoglykánových hydroláz. Väčšina identifikovaných génov je profágového pôvodu. Fylogenetické analýzy ukázali, že tieto hydrolázy majú typickú doménovú štruktúru

Najzaujímavejšie výsledky sa získali pri charakterizácii enterolyzínu A. Väzbová aktivita C-terminálnej domény (CWT) k bunkovým povrchom sa testovala pomocou fúzie CWT s GFP (green fluorescent protein) ako reportérovým proteínom. Potvrdila sa schopnosť C-terminálnej domény viazať sa k bunkovým povrchom senzitivných kmeňov, pričom sme pozorovali jednoznačnú koreláciu medzi väzbou GFP-CWT a senzitivitou voči enterolyzínu A a teda rezistencia voči EnlA súvisí s neprítomnosťou receptora v bunkovej stene cieľových mikroorganizmov. Podarilo sa objasniť povahu receptora rozoznávaného CWT doménou EnlA ktorým je lipoteichoová kyselina

Všetky študované proteíny vykazujú biologickú aktivitu voči vybraným pôvodcom mastitíd v podmienkach *in vitro*. V pilotnom experimente sme overili a potvrdili možnosť použitia rekombinantného enterolyzínu aj v reálnych podmienkach produkčného chovu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

Bacteriolytins and bacteriocins are frequently produced by bacteria, some of them showing activity against bacteria causing mastitis in dairy cow. The majority of antibacterial activities detected in Gram-positive cocci belongs to II. type bacteriocin groups (small thermostabile peptides and proteins) and not to the peptidoglycan hydrolases.

In our experiments 6 phages with lytic activity against *Enterococcus faecalis* were obtained, 3 of them characterized at molecular level. Lytic modules of two bacteriophages were identified encoding lysins and holins. Comparative genomic analyses showed that majority of phages obtained are already known free living variants of prophages in genomes of completely sequenced *E. faecalis* strains.

In agreement with results obtained in phase 2 we showed that genomes of Gram-positive bacteria are promising source of peptidoglycan hydrolases and the majority of endolysins genes identified are of prophage origin. Phylogenetic analyses showed modular structure of hydrolases.

The most valuable results were obtained during characterization of enterolysin A. Binding activity of C-terminal domain (CWB) to cell surfaces was analyzed using CWB-GFP (green fluorescent protein) fusion protein. Binding activity was confirmed and perfect correlation was observed between sensitivity to enterolysin A bacteriolytic activity and binding ability of CWB-GFP fusion protein indicating that lack of surface receptor is a main mechanism of enterolysin A resistance. The enterolysin A receptor was identified as a lipoteichoic acid.

All studied proteins were confirmed to possess biological activity against selected mastitis bacteria. In a pilot experiment we confirmed the applicability of recombinant enterolysin A in reduction of mastitis causing bacteria in real farm conditions.

Podpis riešiteľa: