

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-0119-12**Štúdium in vitro proteázového procesingu vybraných proteáz**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Ján Krahulec, PhD.**Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
2. Oddelenie anorganickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie Slovenskej technickej univerzity v Bratislave
- 3.
- 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. Patentová prihláška podaná na Urade priemysleného vlastníctva v Banskej Bystrici pod číslom 50048-2016.
- 2.
- 3.

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

1. Kristína Jiríčková, Miroslav Gál, Ján Krahulec, Ján Híveš: Electrochemical determination of basic biochemical properties of enzyme enterokinase. Monatsh. Chem. (2015) 146: 755
2. Melicherová K., Krahulec J., Šafránek M., Lišková V., Hopková D., Széliová D., Turňa J. (2016) Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol., DOI 10.1007/s00253-016-7960-3.
3. Alica Janovjáková, Miroslav Gál, Ján Krahulec, Romana Sokolová, Monika Naumowicz, Ján Híveš: Native and denatured enzyme enterokinase determined by electrochemical

methods. Monatsh. Chem. DOI: 10.1007/s00706-016-1915-3, 2017.

4. Disruption of maltase gene as a key for explanation ploidy in yeast *Candida utilis* Veronika Lišková, Krahulec Ján, Boňková Hana, Lichvariková Aneta, Šafranek Martin, Turňa Ján, Drug Discovery and Therapy World Congress (DDTWC) 2016 and Global Biotechnology Congress 2016.

5. Kristína Jiríčková, Zdeno Levarski, Diana Hopková, Stanislav Stuchlík, Ján Krahulec and Ján Turňa: "Preparation of mutated forms of human enterokinase light chain and their production in *Pichia pastoris*.", 8th Conference on Recombinant Protein Production. Malorka, Španielsko, 22. – 24. 4. 2015, Organizátor: Universitat Autònoma de Barcelona.

Uplatnenie výsledkov projektu

Vypracovanie originálneho protokolu pre kultiváciu *P. pastoris* a protokolu pre purifikáciu enterokinázy, ktorý je aj podstatou podanej patentovej prihlášky môže mať zásadný dopad na dostupnosť rekombinantných liečiv. Je všeobecne známe, že náklady na výrobu rekombinantných liečiv nie sú malé a častokrát náklady na výrobu proteázy, ktorá odstraňuje fúzny partner z exprese ďaleko prevyšujú náklady na výrobu samotného cieľového rekombinantného liečiva. Znížením nákladov na produkciu enterokinázy aplikáciou predmetného protokolu, by mohlo dôjsť aj k zníženiu nákladov na rekombinantné liečivá, následne zníženie ich ceny na trhu a zvýšeniu dostupnosti liečiva pre konečného užívateľa. Nie menej významná by mohla byť aj dostupnosť uvedenej proteázy pre vedeckú komunitu, znednodušujú tak dosahovanie ďalších zaujímavých výsledkov ako v základnom tak aj aplikovanom výskume.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

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

Podarilo sa zoštandardizovať kultivačný protokol pre produkciu vysokých množstiev enterokinázy a protokol pre purifikačné procesy po kultivácii. Podarilo sa zoštandardizovať protokoly pre stanovenie enzymovej aktivity ako aj jej kinetiky ako konvenčnými metódami tak aj prostredníctvom elektrochemickej impedačnej spektroskopie. Podarilo sa zhotoviť 5 expresných vektorov, ktoré nesú 5 rôznych mutácií v aktívnych centrách enterokinázy. Podarilo sa týmito vektormi transformovať *P. pastoris* a pomocou baničkových pokusov vyselektovať kmene produjúce najväčšie množstvo enterokinázy. Podarilo sa zistiť, že na množstvo a aj kvalitu enterokinázy má zásadný vplyv zdroj komponentov média (dodávateľ). Nepodarilo sa zatiaľ ocharakterizovať vplyv jednotlivých mutácií na vlastnosti enzýmu. Podarilo sa skonštruovať expresný vektor nesúci gén pre ďalšiu proteázu ekarín z hadieho jedu vretenice. Podarilo sa týmto vektorom transformovať bunky *P. pastoris*, ale nepodarilo sa vyselektovať klon, ktorý by produkoval detekovateľnú ekarínovú aktivitu. Podarilo sa stanoviť ploídium *C. utilis* (ďalší potencionálny hostiteľ pre produkciu proteáz) a skonštruovať expresné vektory na produkciu enterokinázy a ekarínu v bunkách *C. utilis*. Podarilo sa vyvinúť metodiku ako pomocou elektrochemickej impedačnej spektroskopie charakterizovať základné biochemické parametre exprimovaného enzýmu enterokináza aj v podmienkach, kedy zlyhávajú tradičné optické metódy (fúzny substrát Trx-DCD1). Pomocou chronopotenciometrie využitím katalytického vylučovania vodíka na Hg pracovnej elektróde sme dokázali rozlíšiť natívnu, nenatívnu a eventuálne mutovanú formu enzýmu.

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

Process for protocol standardization for high level production of the enterokinase, as well as the protocol for downstream processes were developed. Similarly the protocols for enzyme activity determination by convenient method and method using electrochemical impedance spectroscopy were developed. Five expression vectors carrying genes with 5 different mutations in active centres of enterokinase were created. *P. pastoris* was transformed with these vectors and most potent clones were selected by using small volume flask screening

assay. It was observed that the source (supplier) of the medium components has extremely high impact on quantity and quality of the expressed enzyme. It has not been yet characterized the influence of the particular mutations on enzyme quality. Vector carrying the gene for additional protease, ecarin from viper venom *Echis carinatus*, was successfully constructed. Transformation of the *P. pastoris* cells was successful, but the selection of the clone with detectable ecarin activity was not successful. Ploidy determination of *C. utilis* (additional potential host for protease production) was determined and expression vectors carrying the genes for enterokinase and ecarin for expression in *C. utilis* cells were constructed. Novel method for the determination of basic kinetic parameters of enzyme enteropeptidase has been developed using electrochemical impedance spectroscopy. This approach is useful also in the cases where traditional optical methods failed (fusion substrate Trx-DCD1). Using chronopotentiometric stripping analysis and catalytic hydrogen evolution reaction at Hg working electrode native, denatured and mutated forms of enterokinase can be easily discriminated.

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

Zodpovedný riešiteľ

RNDr. Ján Krahulec, PhD.

V Bratislave 25.1.2017

Štatutárny zástupca príjemcu

prof. RNDr. Karol Mičieta, PhD.

V Bratislave

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu