



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-0354-07

Funkčná a štruktúrna analýza replikačného modulu korynefága BFK20.

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Gabriela Bukovská, CSc.**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej biológie SAV
2. Farmaceutická fakulta UK Bratislava
- 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.
- 2.
- 3.

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

1. HALGAŠOVÁ, Nora - UGORČÁKOVÁ, Jana - GEROVÁ, Martina - TIMKO, Jozef - BUKOVSKÁ, Gabriela: Isolation and characterization of bacteriophage phiBP from *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400. In FEMS Microbiology Letters, 2010, vol. 305, p. 128-135. (2.199 - IF2009). ISSN 0378-1097.
2. GEROVÁ, Martina - HALGAŠOVÁ, Nora - UGORČÁKOVÁ, Jana - BUKOVSKÁ, Gabriela: Endolysin of bacteriophage BFK20: evidence of a catalytic and a cell wall binding domain. In FEMS Microbiology Letters, 2011, DOI:10.1111/j.1574-6968.2011.02312.x
3. Bukovska, G.: The analysis of bacteriophage BFK20 genome. In Abstract book of XXI. Biochemický sjezd ČSSMB, České Budejovice, Czech Republic, 2008, Sborník přednášek a posterů, JPM Tisk s.r.o. 2008, pp. 49.(invited plenary lecture)

4. HALGAŠOVÁ, N. MESAROSOVA, I., BUKOVSKÁ, G.: RepA like protein from corynephage BFK20. In Mikroorganizmy a kvalita života : 25. Kongres ČSSM 2010, Stará Lesná, Vysoké Tatry 15.-18.9.2010. (Program a abstrakty). -Bratislava - Praha: Československá spoločnosť mikrobiologická, 2010, s. 183. ISBN 970-80-970477-8-8.

5. UGORČÁKOVÁ, J., HALGAŠOVÁ, N., BUKOVSKÁ, G.: Study of ORF 39 region - probable origin of corynephage BFK20. In Mikroorganizmy a kvalita života: 25. Kongres ČSSM 2010, Stará Lesná, Vysoké Tatry 15.-18.9.2010. (Program a abstrakty). - Bratislava - Praha : Československá spoločnosť mikrobiologická, 2010, s. 205. ISBN 970-80-970477-8-8.

Uplatnenie výsledkov projektu

Príprava fágovo rezistentného kmeňa hostiteľa *Brevibacterium flavum* CCM 251, ktorý je významným priemyselným producentom L-lyzínu.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

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

Potvrdili sme správnosť bioinformatickej analýzy genómu korynefága BFK20. Pre vybrané replikačné proteíny gp41 (helikáza), gp43 (RepA like proteín), gp43N (primáza) a gp44 (DNA polymeráza) sme naklonovali gény do expresného systému *E.coli* a izolovali sme rekombinantné proteíny v dostatočnom množstve a vysokom prečistení. Stanovili sme fyzikálno-chemické vlastnosti izolovaných proteínov - molekulovú hmotnosť, stupeň oligomerizácie, enzýmovú aktivitu. Vypracovali sme a modifikovali viacero metód na stanovenie enzýmovej aktivity replikačných proteínov: ATPázovú, helikázovú, primázovú a polymerizačnú aktivitu. Dokázali sme, že gp43N (primáza) BFK20, podobná replikázam z archaeálnych plazmidov, má primázovú aktivitu. Enzým je dNTP závislý, čím sa odlišuje od všetkých doteraz charakterizovaných fágových replikáz. Vypracovali sme novú metódu prípravy špecifických polyklonálnych protilátok z myší. Pripravili sme špecifické protilátky proti trom fágovým replikačným proteínom s vysokým titrom a špecificitou. Pomocou protilátok sme detegovali natívne fágové proteíny pomocou Western blot analýzy, ktoré sú syntetizované po infekcii hostiteľa *B. flavum* CCM 251. Pripravili sme konštrukty plazmidov pBOS1, pBOS2 pBORI39, pBORI39+, ktoré obsahujú fágový počiatok replikácie. Prítomnosť funkčných plazmidov v korynebaktériách sme overili restričnou analýzou, pomocou PCR a Southern hybridizáciou. Pripravili sme fágovo rezistentný kmeň *B.flavum* CCM251 s plazmidom pBOS1 a overili sme si funkčnosť PER fenotypu po infekcii BFK20. Celkovo získané výsledky sú významným príspevkom k objasneniu replikačného mechanizmu akým sa replikuje fágová DNA BFK20 po vniknutí do bakteriálneho hostiteľa.

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

We have approved the accuracy of bioinformatic analysis of BFK20 genome. We have cloned genes of the selected replication proteins gp41 (helicase), gp43 (RepA like protein), gp43N (primase) a gp44 (DNA polymerase) into *E.coli* expression system. We have isolated the recombinant fusion proteins in sufficient amount and highly purified. We determined the physic-chemical properties of isolated proteins as the molecular size, order of oligomerization and enzymatic activity. We have developed and optimized several methods for determination of replication protein activity: ATPase, helicase, primase and DNA polymerase enzymatic activity. We have shown, that gp43N (primase) of BFK20 is similar to replicase from archeal plasmids and has primase activity. This enzyme is dNTP dependent and such it is different from others known and characterized phage replicases. We have elaborated a new method for preparation of specific polyclonal antibodies isolated from mice. We prepared specific antibodies against three phage replication proteins with high titer and specificity. By using specific mouse polyclonal antibodies we detected by using Western blot analysis the three native phage proteins synthesized after phage infection of host *B.flavum* CCM251. We constructed plasmids pBOS1, pBOS2 pBORI39, pBORI39+ harbouring phage BFK20 origin

of replication – oriBFK20. The presence of functional plasmids in corynebacterial cells was verified by restriction analysis, PCR and Southern hybridization. We prepared the phage resistant strain of host *B. flavum* CCM 251 carrying the plasmid pBOS1 and we proved the functionality of PER phenotype by BFK20 infection. Generally the presented results are significant contribution to the explanation of the phage BFK20 DNA replication mechanism after entering the bacterial host cell.

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

Zodpovedný riešiteľ

RNDr. Gabriela Bukovská, CSc.

V Bratislave 29. 06. 2011

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Imrich Barák, DrSc.

V Bratislave 29. 06. 2011

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu