

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-15-0069**Transformácia integrálneho membránového proteínu na vo vode rozpustnú formu:
prípád GPCR**Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Erik Sedlák, PhD.**

Príjemca

**Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Prírodovedecká
fakulta****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park Univerzity Pavla
Jozefa Šafárika**Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení**Laboratórium Prof. Dr. Andreasa Pluckthuna z Katedry biochémie na Univerzite v Zurichu,
Švajčiarsko**Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú
výsledkami projektu**

Žiadne.

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

Riešenie projektu viedlo k výraznému nárastu publikačných výstupov nášho laboratória. Doteraz sme publikovali 16 prác v karentovaných časopisoch, 4 rukopisy sú v oponentskom konaní a viacero prác, ako priamy výsledok riešenia projektu, bude pripravených v najbližšom období.

Výsledky práce na projekte, resp. na projektoch úzko súvisiacich s riešeným projektom boli prezentované na 17 prednáškach (z toho 2 pozvaných) a 38 plagátových oznámeniach na domácich a zahraničných konferenciách.

Riešitelia projektu prezentovali výsledky aj v 8 popularizačných prednáškach pre študentov stredných škôl a svojich kolegov z príbuzných študijných programov.

Rukopisy v recenznom konaní (4):

(1) *Tomášková N., Kožár T., Varhač R., Musatov A., Sedlák E. (2021) Anions specific effects on alkaline state of cytochrome c.

Biochemistry (Moscow). F2019 1.978 Q4

(2) Nemergut M., Škrabana R., Plückthun A., *Sedlák E. (2021) Efficient purification of MBP fusion proteins on DARPin affinity matrix.

Int. J. Biol. Macromol. IF2019 5.162 Q1

(3) Sedlák E., Kožár T., *Musatov A. (2020) (invited review) Interplay between aggregation state, subunits composition and tightly bound cardiolipin of bovine heart cytochrome c oxidase. Physiological relevance.

Cells IF2019 4.366 Q2

- (4) Tomášková N., Novák P., Kožár T., Petrenčáková M., Jancura D., Yassaghi G., *Man P., *Sedlák E. (2020) Modification of cytochrome c upon interaction with hydrogen peroxide. *Int. J. Biol. Macromol.* IF2019 5.162 Q1
- Publikované práce (16):
- (16) Garajová K., Sedláková D., Berta M., Gažová Z., *Sedlák E. (2020) Destabilization effect of imidazolium ionic liquids cation-Hofmeister anion salts on cytochrome c. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 3808-3813. IF2019 5.162 Q1
- (15) Petrenčáková M., Filander F., Hovan A., Yassaghi G., Man P., Kožár T., Jancura D., Schwer M-S., Plückthun A., Novák P., Miškovský P., *Bánó G., *Sedlák E. (2020) Photoinduced damage of AsLOV2 domain is accompanied by increased singlet oxygen production due to flavin dissociation. *Sci. Rep.* 10: 4119. IF2019 3.998 Q1
- (14) Petrenčáková M., Varhač R., Nemergut M., Schwer M-S., Jancura D., *Sedlák E. (2020) Conformational properties of LOV2 domain and its C450A variant within broad pH region. *Biophys. Chem.* 259, 106337. IF2019 1.995 Q3
- (13) Sedlák E., Sedláková D., Marek J., Hančár J., Garajová K., *Žoldák G. (2019) Ion-specific protein/water interface determines Hofmeister effect on the kinetic stability of glucose oxidase. *J. Phys. Chem. B* 123, 7965-7973. IF2018 2.923 Q1
- (12) Šipošová K., *Sedlák E., Kožár T., Nemergut M., Musatov A. (2019) Dual Effect of Non-ionic Detergent Triton X-100 on Insulin Amyloid Formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 173, 709-718. IF2018 3.973 Q1
- (11) Dušeková E., Garajová K., Yavaşer R., Varhač R., *Sedlák E. (2018) Hofmeister effect on catalytic properties of chymotrypsin is substrate-dependent. *Biophys. Chem.* 243, 8-16. IF2017 1.870 Q2
- (10) Tomášková N., Varhač R., Lysáková V., Musatov A., *Sedlák E. (2018) Peroxidase activity of cytochrome c in its compact state depends on dynamics of the heme region. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins & Proteomics* 1866, 1073-1083. IF2017 2.609 Q1
- (9) Schaefer J.V., Sedlák E., Kast F., Nemergut M., *Plückthun A. (2018) Modification of kinetic stability of immunoglobulin G by solvent additives. *mAbs* 10(4): 607-623. doi: 10.1080/ 19420862. IF2017 5.165 Q1
- (8) *Sedlák E., Žoldák G., *Wittung-Stafshede P. (2018) Synergistic effects of copper sites on apparent stability of multicopper oxidase, Fet3p. *Inter. J. Mol. Sci.* 19, 269; doi:10.3390/ijms19010269 IF2016 3.226 Q2
- (7) Garajová K., Dzurová L., Zimmermann M., Škultéty L., Žoldák G., *Sedlák E. (2017) The molten-globule residual structure is critical for refluorination of Glucose Oxidase. *Biophys. Chem.* 230, 74-83. IF2015 2.402
- (6) Nemergut M., Žoldák G., Schaefer J.V., Kast F., Miškovský P., *Plückthun A., *Sedlák E. (2017) Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. *Protein Sci.* 26, 2229-2239. IF2016 2.523
- (5) Belej D., Jurasekova Z., Nemergut M., Wagnieres G., Jancura D., Huntosova V. (2017) Negligible interaction of [Ru(Phen)(3)](2+) with human serum albumin makes it promising for a reliable in vivo assessment of the tissue oxygenation. *J. Inorg. Biochem.* 174, 37-44. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.05.016. IF2016 3.205
- (4) Sedlák E., *Musatov A. (2017) Inner mechanism of protection of mitochondrial electron-transfer proteins against oxidative damage. Focus on hydrogen peroxide decomposition. Minireview. *Biochimie* 142, 152-157. IF2016 3.112
- (3) Musatov A., *Sedlák E. (2017) Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. Review. *Biochimie* 142, 102-111. IF2016 3.112
- (2) Žoldák G., Jancura D., *Sedlák E. (2017) Utilization of fluorescence ratio in determination of inflection point in pH, denaturant and temperature dependences. *Protein Sci.* 26(6), 1236-1239. IF2016 2.523
- (1) Garajová K., Balogová A., Dušeková E., Sedláková D., Sedlák E., *Varhač R. (2017) Correlation of lysozyme activity and stability in the presence of Hofmeister series anions. *BBA – Proteins & Proteomics* 1865(3), 281–288. IF2015 3.016
- Lectures (17) - z toho najvýznamnejšie:
- (i) Sedlák E., Evolúcia proteínov v skúmavke.
- Pozvaná prednáška v rámci cyklu "Jesenné stretnutia v Parku" v spolupráci so Slovenskou spoločnosťou pre biochémiu a molekulárnu biológiu.
- Konferenčná miestnosť VP UK Ilkovičova 8, Bratislava, dňa 22.11.2019.

- (ii) Nemergut M., Sedlák E., Affinity chromatography based on DARPin and maltose binding protein complex formations,
Book of Abstracts, pp 33. ISBN 978-961-90942-4-2
8th Regional Biophysics Conference, 16.-20.5.2018, Zreče, Slovinsko
- (iii) Nemergut M., Sedlák E., The use of DARPins in the purification of MBP-fused proteins.
Book of Contributions (reviewed), p.32, short communications SC4.
8th Slovak Biophysical Symposium, ISBN: 978-80-973086-7-4
May 30 – June 1, 2018, Košice, Slovakia
- (iv) Sedlák E., Plückthun A., Analysis of kinetic stability of antibodies by microcalorimetry.
Book of Contributions (reviewed), p.28, short communications SC1.
8th Slovak Biophysical Symposium, ISBN: 978-80-973086-7-4
May 30 – June 1, 2018, Košice, Slovakia
- (v) Sedlák E., Role of cardiolipin for stability of cytochrome c oxidase. (English)
(invited lecture) Regional Biophysics Conference RBC2016, 25-28 August 2016, Trieste, Italy

Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt APVV výrazne prispel ku kvalitatívnemu rozvoju laboratória zodpovedného riešiteľa ako aj laboratórií Centra interdisciplinárnych biovied na TIP UPJŠ v Košiciach.
Projekt APVV viedol k etablovaní metódy ribozómového displeja, efektívnej techniky vývoja nových proteínov a enzýmov, v laboratóriách CIB TIP-UPJŠ ako aj mnohých techník molekulovej biológie, biochémie a biofyziky akými sú:

- (i) amplifikácia génov pomocou PCR, klonovanie génov, príprava DNA konštruktu, in vitro transkripcia, in vitro translácia, selekcia, elúcia mRNA, reverzná transkripcia,
 - (ii) expresia proteínov v baktériách a ich izolácia a charakterizácia technikami ako SEC a SDS PAGE, western blot,
 - (iii) charakterizácia termodynamickú a kinetickú stability membránových proteínov.
- Tieto výsledky viedli k nadviazaniu, resp. prehĺbeniu, medzinárodnej spolupráce v rámci akademického prostredia so skupinami:
- (i) prof. Andreasa Plückthuna z Univerzity v Zurichu a prof. Matthiasa Riefa z Technickej univerzity v Mníchove, s ktorými sme získali projekt v rámci výzvy H2020-WIDESPREAD-2018-2020 (WIDESPREAD)-Twinning, ktorého hlavným cieľom je posilniť oblasť výskumu proteínového inžinierstva v oblasti evolučných techník na UPJŠ s významom pre východné Slovensko, ale s dosahom na celé Slovensko v tejto oblasti výskumu. Práve skupina Prof. Plückthuna je jedna z vedúcich skupín na svete zaoberajúca sa metódami evolučných techník vo vývoji a dizajne proteínov.
 - (ii) prof. Mgr. Jiřího Damborského, Dr., vedúci Loschmidtových laboratórií na Masarykovej univerzity v Brne, na téme vývoja jednej skupiny enzýmov, haloalkánových dehalogenáz, pomocou evolučných techník. Haloalkánové dehalogenázy tvoria dôležitú skupinu hydroláz, ktoré štiepia väzbu medzi uhlíkom a halogénom v halogénovaných uhľovodíkoch. Vďaka unikátnemu katalytickému mechanizmu majú tieto enzýmy vysoký aplikačný potenciál v bioremediácii toxických environmentálnych polutantov, dekontaminácii chemických bojových látok, na biomonitoring znečisťujúcich látok v prostredí, značenie proteínov pri bunkovom zobrazovaní a na prípravu opticky jednotných alkoholov vo farmaceutickom priemysle.
 - (iii) Dr. Babaka Minofara z Inštitútu fyziky a biofyziky na Juhočeskej univerzite v oblasti teoretického štúdia a predikcií vlastností proteínov pomocou počítačových simulácií. Táto spolupráca predpokladá pochopenie efektu solí na katalytické vlastnosti biotechnologicky významných proteáz – akou je napr. 3C proteáza.

Na základe dosiahnutých výsledkov v rámci tohto APVV projektu bolo vytvorené partnerstvo s podnikateľským subjektom Safta Photonics, s.r.o., výsledkom ktorej je žiadosť o finančnú podporu spoločného projektu s názvom: Vývoj nanosenzorických fotonických systémov na rýchlu detekciu vírusov využitím metód riadenej evolúcie proteínových platforiem: prípad SARS-CoV-2 v Operačnom programe: 311000 - Operačný program Integrovaná infraštruktúra v rámci výzvy: OPII-VA/DP/2020/9.4-01. Predpokladaný začiatok riešenia projektu je 1.1.2021.

Hlavným cieľom tohto projektu je vývoj proteínovej platform na detekciu vírusových častíc, resp. častí povrchu týchto vírusov s veľkým významom pre klinickú prax pre praktickú

detekciu vírusu COVID-19. Hlavnou výhodou vyvíjanej platformy je jej modulovateľnosť, vďaka ktorej by malo byť možné v krátkej dobe (niekoľko týždňov) zmeniť špecifitu rozpoznávajúcej častice, napr. v prípade mutácie proteínov na povrchu častice vírusu, resp. rozpoznávanie úplne inej vírusovej častice. Táto technológia je založená predovšetkým na evolučných technikách ako ribozómový a kvasinkový displej.

Najdôležitejším výsledkom tohto projektu APVV preto považujeme etablovanie techniky ribozómového displeja a na základe získaných skúseností v blízkej dobe aj kvasinkového displeja, ktoré majú nesmierny potenciál pri vývoji nových proteínov a enzýmov aj pre biotechnologickú sféru.

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

Projekt APVV výrazne prispel k rozvoju laboratória zodpovedného riešiteľa ako aj laboratórií Centra interdisciplinárnych biovied na TIP UPJŠ v Košiciach v niekoľkých oblastiach:

(i) Tím zodpovedného riešiteľa výrazne zvýšil svoju publikačnú a prezentačnú aktivitu v období 2016-2020.

Riešenie projektu viedlo k výraznému nárastu publikačných výstupov nášho laboratória reprezentovaných 16 publikovanými prácami v karentovaných časopisoch a 4 zaslanými rukopismi, 17 prednáškami (2 pozvané) a 38 plagátovými oznámeniami na domácich a zahraničných konferenciách a 8 popularizačnými prednáškami pre študentov stredných škôl.

(ii) Nadviazanie, resp. prehĺbenie medzinárodnej spolupráce so skupinami Prof. Dr. Andreasa Plückthuna (Univerzita v Zurichu), Prof. Dr. Jiřího Damborského (Masarykova univerzita v Brne) a Dr. Babaka Minofara (Inštitút fyziky a biofyziky na Juhočeskej univerzite v Českých Budějoviciach).

(iii) Vytvorenie partnerstva s podnikateľským subjektom Safta Photonics, s.r.o., s cieľom vývoja flexibilných proteínových platforiem evolučnými technikami na detekciu (aj) vírusových častíc.

Základným cieľom tohto APVV projektu bolo poskytnúť „proof of principle“ ohľadom možnosti transformovať integrálny membránový proteín na vo vode rozpustný analóg. Úspešná realizácia experimentálnej časti tohto projektu spočívala na splnení niekoľkých čiastkových cieľov:

(i) Etablovanie displej technológie (ribozómový displej) v našich laboratóriách. Tento cieľ bol splnený.

(ii) Identifikácia špecifických pozícií aminokyselín v polypeptidovom reťazci neurotenzín viažúceho receptora a vo všeobecnosti GPCR v lipidovej dvovrstve, ktorých nahradenie by viedlo k zvýšeniu rozpustnosti týchto receptorov. Navrhli sme knižnice pre 2 GPCR – neurotenzín viažúci receptor (NTR1) a kappa-opioid receptor (hKOR).

(iii) Vytvorenie DNA knižnice pre GPCR. Cieľ splnený pre obidva vybrané GPCR.

(iv) Selekcia analógov GPCR s vhodnými vlastnosťami. Vhodné analógy boli vyselektované pre hKOR. Knižnica pre NTR1 pravdepodobne nemala pre potreby ribozómového displeja dostatočnú diverzitu.

(v) Charakterizácia biofyzikálnych a biochemických vlastností vybraných analógov GPCR. Čiastkové ciele (iv) a (v) veľmi úzko súvisia. Podarilo sa nám doteraz charakterizovať niekoľko vybraných hKOR, ktoré sme vybrali na základe ich primárnej sekvencie. Ukázali sme, že vytvárajú definovanú 3D štruktúru, avšak vo vode, bez prítomnosti detergentov, tvoria nehomogénne oktaméry. V súčasnosti sa snažíme metódami molekulovej biológie o „rozbitie“ týchto oktamérov na menšie štruktúry a zároveň zvýšiť homogenitu takto vytvorených štruktúr. Avšak, existencia vo vode rozpustných analógov GPCR detegovaných týmito analýzami je možné považovať za „proof of principle“ hlavného cieľa tohto projektu. Konečným dôkazom a potvrdením existencie funkčného vo vode rozpustného analóga GPCR je určenie jeho 3D štruktúry, čo je našim cieľom pre budúci rok v spolupráci so skupinou Prof. Dr. Plückthuna v rámci projektu CasProt (Horizon 2020 – Twinning).

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

The APVV project significantly contributed to the development of the laboratory of the principal investigator as well as the laboratories of the Center for Interdisciplinary Biosciences at TIP UPJŠ in Košice in several areas:

(i) The team of the principal investigator significantly increased its publishing and

presentation activity in the period 2016-2020.

The solution of the project led to a significant increase in the publication output of our laboratory represented by 16 published works in peer-reviewed journals and 4 submitted manuscripts, 17 lectures (2 invited) and 38 poster announcements at domestic and foreign conferences and 8 popularization lectures for high school students.

(ii) Establishment, resp. deepening of international cooperation with groups of Prof. Dr. Andreas Plückthun (University of Zurich), Prod. Dr. Jiří Damborský (Masaryk University in Brno) and Dr. Babaka Minofara (Institute of Physics and Biophysics at the University of South Bohemia in České Budějovice).

(iii) Forming a partnership with Saftra Photonics, s.r.o., to develop flexible protein platforms by evolutionary techniques for the detection of (also) viral particles.

The main goal of this APVV project was to provide a "proof of principle" regarding the possibility of transforming an integral membrane protein into a water-soluble analogue.

The successful implementation of the experimental part of this project was based on the fulfillment of several sub-objectives:

(i) Established display technology (ribosome display) in our laboratories. This goal has been met.

(ii) Identification of specific amino acid positions in the polypeptide chain of the neurotensin binding receptor and in general the GPCRs in the lipid bilayer, the replacement of which would increase the solubility of these receptors. We designed libraries for 2 GPCRs - neurotensin binding receptor (NTR1) and kappa-opioid receptor (hKOR).

(iii) Creation of a DNA library for GPCR. Goal met for both selected GPCRs.

(iv) Selection of GPCR analogs with suitable properties. Suitable analogs were selected for hKOR. The NTR1 library probably did not have sufficient diversity for ribosome display.

(v) Characterization of biophysical and biochemical properties of selected GPCR analogs.

Sub-objectives (iv) and (v) are very closely related. So far, we have been able to characterize several selected hKORs, which we selected based on their primary sequence. We have shown that they form a defined 3D structure, but in water, without the presence of detergents, they form inhomogeneous octamers. We are currently trying to "break" these octamers into smaller structures using molecular biology methods and at the same time increase the homogeneity of the structures thus created. However, the existence of water-soluble GPCR analogs detected by these analyzes can be considered as a "proof of principle" of the main goal of this project. The final proof and confirmation of the existence of a functional water-soluble analogue GPCR is to determine its 3D structure, which is our goal for next year in cooperation with the group Prof. Dr. Plückthuna within the CasProt project (Horizon 2020 - Twinning).