

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0439****Využitie myrozínázy na aktiváciu sulforafanu pre vývoj preparátu s preventívnymi účinkami nádorových ochorení**Zodpovedný riešiteľ **doc. Ing. Martin Šimkovič, PhD.**Príjemca **Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

- Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave
- Centrum biovied SAV
- Biomedicínske centrum SAV
- Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV
- VUP, a.s., Prievidza

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Bez zahraničnej spolupráci.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Polozsány, Z., Galádová, H., Breier, A., Šimkovič, M.: Spôsob prípravy glukorafanínu z vesnovky obyčajnej; STU Bratislava (evid.číslo: PUV 50101-2021)

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

1. Kontar, S., Imrichová, D., Bertová, A., Macková, K., Poturnayová, A., Sulová, Z., Breier, A. (2020) Cell Death Effects Induced by Sulforaphane and Allyl Isothiocyanate on P-Glycoprotein Positive and Negative Variants in L1210 Cells. *Molecules* 25(9):2093
2. Rosenbergová, Z., Kántorová, K., Šimkovič, M., Breier, A., Rebroš, M. (2021) Optimisation of Recombinant Myrosinase Production in *Pichia pastoris*. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7):3677
3. Polozsányi, Z., Galádová, H., Šimkovič, M.: Izolácia glukozinolátov z menej známych rastlinných druhov čeľade kapustovité. In: Drobnicov memoriál 10. ročník, Stará Lesná, Slovensko, 11.-13.9.2019, s. 41 (ISBN 978-80-972752-6-6)
4. Galádová, H., Polozsányi, Z., Šimkovič, M.: Purification of myrosinase from *Lepidium sativum* seeds employing a novel affinity chromatography resin with the 4-(methylsulfinyl) butyl ligand attached via thiourea group. In: XXVI. Annual Congress of Czech and Slovak Societies for Biochemistry and Molecular Biology with cooperation of Austrian and German Biochemical Section, České Budejovice, Czech Republic, August 29th - September 1st, 2021, p. 115 (ISBN 978-80-907779-1-0)
5. Mikitová, V., Klobučník, M., Kleman, J., Libantová, J., Jopčík, M.: Isolation and characterization of myrosinase gene from the hoary cress (*Cardaria draba*). In: Book of

Uplatnenie výsledkov projektu

Glukorafanín (GR) zohráva významnú úlohu v prevencii vzniku a progresie civilizačných ochorení. Na slovenskom trhu sa GR ponúka vo forme preparátov vytvorených zo sušenej brokolice, v ktorých obsah GR je často nízky. Samotný GR je neaktívny a vyžaduje enzýmovú aktiváciu. Našou predstavou bolo vytvoriť dvojzložkový preparát zložený z GR a stabilizovanej myrozinázy, ktorá by slúžila na konverziu GR na aktívnu formu, sulforafan. Z tohoto dôvodu riešenie projektu viedlo k vypracovaniu originálnych postupov prípravy myrozinázy a GR vo vysokej čistote, v laboratórnom resp. v poloprevádzkovom meradle. Nakoľko záujem o tieto látky v poslednej dekáde prudko vzrástol, dá sa očakávať využitie týchto postupov v rôznych oblastiach života. V potravinárskom priemysle pri príprave nutričných doplnkov na báze GR, alebo pri príprave rastlinných a funkčných potravín obohatených o GR. V poľnohospodárstve pri ekologickej ochrane užitkových rastlín pred škodcami. Široká substrátová špecifickosť myrozinázy je kľúčová v organickej syntéze na prípravu cielených tioglykozidov a v potravinárstve pri výrobe aróm.

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

V rámci projektu sme vypracovali dva postupy prípravy myrozinázy. Pri klasickom postupe izolácie enzýmu sme využili kombináciu izoelektrickej precipitácie so síranom amónnym a afinitnej chromatografie s kovalentne viazaným sulforafanom ako ligandom. Touto metódou sa nám podarilo pripraviť elektroforeticky čistý enzým z napučaných semien *Lepidium sativum*. Príslušnosť enzýmu s rodinou beta-glukozidáz sme potvrdili MS/MS analýzou a meraním aktivity s prirodzenými a syntetickými substrátmi. Merania ukázali, že enzým preferenčne štiepi tioglykozidovú väzbu a jeho aktivita je závislá na prítomnosti L-askorbátu. V druhom postupe sme myrozinázu (TGG1) z *Arabidopsis thaliana* pripravili heterológnu expresiou v kvasinke *Pichia pastoris*. Tento postup, v porovnaní s klasickou cestou izolácie, zásadným spôsobom uľahčil prípravu enzýmu a poskytol rádovo vyššie výťažky. Navyše, charakterizácia enzýmových vlastností ukázala, že rekombinantný enzým má lepšiu stabilitu a vyššiu špecifickú aktivitu. Enzým sme úspešne imobilizovali do polyvinyl alkoholového gélu, čím sme stabilitu enzýmu ešte zvýšili a umožnili jeho viacnásobné využitie bez straty aktivity. Ďalej sme vypracovali postup na izoláciu glukorafanínu (GR) z *Cardaria draba*. Produkt, s dosiahnutou čistotou viac ako 96%, sme použili na testovanie účinkov jeho aktívnej formy, sulforafanu (SFN), vytvorenej v podmienkach *in situ* katalytickou aktiváciou s myrozinázou. Ukázalo sa, že aktívna forma GR inhibovala metabolickú aktivitu myších leukemických buniek L1210/S a rovnako aj rast viacerých bakteriálnych a kvasinkových druhov. Súbežne s týmito pokusmi, sme na bunkovej línii L1210 študovali molekulové mechanizmy cytotoxicity SFN a alyl izotiokyanátu.

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

As part of this project, two procedures for the myrosinase preparation were developed. At the classic/standard isolation procedure, the combination of isoelectric precipitation with ammonium sulfate and sulforaphane (SFN) based affinity chromatography were employed to purify the enzyme. By this method, the preparation of *Lepidium sativum* myrosinase with electrophoretic purity was obtained. The affiliation of the enzyme with the β -glucosidase family was confirmed by MS/MS analysis and by enzyme activity measurements with natural and synthetic substrates. Measurements showed that the enzyme preferentially cleaves the thioglycoside bond and its activity is dependent on the presence of L-ascorbate. In the second procedure, the myrosinase (TGG1) from *Arabidopsis thaliana* was prepared by the heterologous expression in the yeast *Pichia pastoris*. This procedure, in comparison with the classical one, significantly simplified the enzyme preparation and allowed to obtain higher yields. In addition, characterization of the enzyme properties showed that the recombinant enzyme has better stability and higher specific activity. Immobilization of the enzyme in a polyvinyl alcohol gel lead to increased stability of the enzyme and allowed its multiple use without any loss of enzyme activity. Moreover, a procedure for the isolation of glucoraphanin

(GR) from *Cardaria draba* was developed. The product, with a purity of more than 96%, was used to test the effects of its active form, sulforaphane (SFN), formed under in situ conditions by catalytic activation with myrosinase. The active form of GR has been shown to inhibit the viability of L1210 mouse leukemic cells and, as well as, the growth of several bacterial and yeast species. In parallel with these experiments, the molecular mechanisms of the cytotoxic effects of SFN and allyl isothiocyanate on the L1210 cell lines was studied.