



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0149**

Zelený expresný systém pre produkciu rekombinantných proteínov v *Candida utilis*

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Ján Krahulec, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie
Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Oddelenie anorganickej technológie

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Biofyzikální ústav AV ČR Brno, Česká republika
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR Praha, Česká republika
Uniwersytet w Białymstoku, Białystok, Poľsko

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

Žiadne patenty

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

KRAHULEC, Ján, LISKOVA, Veronika, BONKOVA, Hana, LICHVARIKOVA, Aneta, SAFRANEK, Martin, TURNA Ján, The ploidy determination of the biotechnologically important yeast *Candida utilis*. *Journal of Applied Genetics* (2020) 61:275–286. ADC
KRAHULEC, Ján, SAFRANEK, Martin, Impact of media components from different suppliers on enterokinase productivity in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology* (2021)
<https://doi.org/10.1186/s12896-021-00681-y>. ADC
ŽABKA, Dušan - KONEČNÁ, Barbora - CELEC, Peter - JANÍKOVÁ, Monika - IVAŠKOVÁ, Nadja - TÓTHOVÁ, Ľubomíra - TAMÁŠ, Michal - BUTOR ŠKULCOVÁ, Andrea - PÚČEK BELIŠOVÁ, Noemi - HORÁKOVÁ, Ivana - BIMOVÁ, Paula - HÍVEŠ, Ján - RYBA, Jozef - KLEMPA, Boris - SLÁVIKOVÁ, Monika - KOPÁČEK, Juraj - KRAHULEC, Ján - GÁL, Miroslav - MACKULÁK, Tomáš. Ferrate (VI), Fenton Reaction and Its Modification: An Effective Method of Removing SARS-CoV-2 RNA from Hospital Wastewater. In *Pathogens*. Vol. 11, iss. 4 (2022), s. [1-13], art. no. 450. ISSN 2076-0817 (3.492 - 2020). DOI: 10.3390/pathogens11040450. ADC
MELNÍKOVÁ, Eva - GALICOVÁ, Tatiana - GÁL, Miroslav - OSTATNÁ, Veronika. Chronopotentiometric Analysis of Single Histones and Histone Octamer at Charged Surfaces. In *ChemElectroChem*. Vol. 8, iss. 17 (2021), s. 3360-3365. ISSN 2196-0216 (4.590 - 2020). ADC
DUNAJOVÁ, Aneta Anna - GÁL, Miroslav - TOMČÍKOVÁ, Kornélia - SOKOLOVÁ, Romana - KOLVOŠKA, Viliam - VANĚČKOVÁ, Eva - KIELAR, Filip - KOSTOLANSKÝ, František -

VAREČKOVÁ, Eva - NAUMOWICZ, Monika. Ultrasensitive impedimetric immunosensor for influenza A detection. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 858, (2020), s. [1-5], art. no. 113813. ISSN 1572-6657 (4.464 - 2020). ADC

ČIERNA, Martina - NAUMOWICZ, Monika - BIROŠOVÁ, Lucia - KRAHULEC, Ján - SOKOLOVÁ, Romana - KOLIVOŠKA, Viliam - SEBECHLEBSKÁ, Táňa - KIELAR, Filip - GÁL, Miroslav. Study of permeabilization of bacterial membrane by electrochemical methods. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 857, (2020), s. [1-5], art. no. 113761. ISSN 1572-6657 (4.464 - 2020). ADC

NAUMOWICZ, Monika - ZAJAC, Marcin - KUSACZUK, Magdalena - GÁL, Miroslav - KOTYNSKA, Joanna. Electrophoretic Light Scattering and Electrochemical Impedance Spectroscopy Studies of Lipid Bilayers Modified by Cinnamic Acid and Its Hydroxyl Derivatives. In *Membranes*. Vol. 10, iss. 11 (2020), s. [1-22], art. no. 343. ISSN 2077-0375 (online) (4.106 - 2020). ADC

VANĚČKOVÁ, Eva - BOUŠA, Milan - SOKOLOVÁ, Romana - MORENO-GARCÍA, Pavel - BROEKMANN, Peter - SHESTIVSKA, Violetta - RATHOUSKÝ, Jiří - GÁL, Miroslav - SEBECHLEBSKÁ, Táňa - KOLIVOŠKA, Viliam. Copper electroplating of 3D printed composite electrodes. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 858, (2020), s. [1-8], art. no. 113763. ISSN 1572-6657 (4.464 - 2020). ADC

VANĚČKOVÁ, Eva - BOUŠA, Milan - VIVALDI, Federico - GÁL, Miroslav - RATHOUSKÝ, Jiří - KOLIVOŠKA, Viliam - SEBECHLEBSKÁ, Táňa. UV/VIS spectroelectrochemistry with 3D printed electrodes. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 857, (2020), s. [1-9], art. no. 113760. ISSN 1572-6657 (4.464 - 2020). ADC

VANĚČKOVÁ, Eva - BOUŠA, Milan - LACHMANOVÁ NOVÁKOVÁ, Štěpánka - RATHOUSKÝ, Jiří - GÁL, Miroslav - SEBECHLEBSKÁ, Táňa - KOLIVOŠKA, Viliam. 3D printed polylactic acid/carbon black electrodes with nearly ideal electrochemical behaviour. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 857, (2020), s. [1-8], art. no. 113745. ISSN 1572-6657 (4.464 - 2020). ADC

MELNÍKOVÁ, Eva - IZADI, Nasim - GÁL, Miroslav - OSTATNÁ, V. Chronopotentiometric Analysis of Proteins at Charged Electrode Surfaces. In *Electroanalysis*. Vol. 31, iss. 10 (2019), s. 1868-1872. ISSN 1040-0397 (2.544 - 2019). ADC

KRUSZEWSKI, Marcin A. - KUSACZUK, Magdalena - KOTYNSKA, Joanna - GÁL, Miroslav - KRETOWSKI, Rafal - CECHOWSKA-PASKO, Marzanna - NAUMOWICZ, Monika. The effect of quercetin on the electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells. In *Bioelectrochemistry*. Vol. 124, (2018), s. 133-141. ISSN 1567-5394 (4.474 - 2018). ADC

ZHENG, Poonnapa - CHAIBUTH, Pawittra - LO, Wai-Sum - JIN, Weiwei - SUN, Xinyang - MEKSAWANGWONG, Sureemas - PUNYAIN, Wikorn - GÁL, Miroslav - GU, Yanjuan - CHAN, Wesley Ting Kwok - KIELAR, Filip - LAW, Ga-Lai. Two-Photon Excitable Iridium Complex Containing Dipyrzolytriazine as Cellular Imaging Dyes. In *European Journal of Inorganic Chemistry*. Iss. 41 (2018), s. 4533-4542. ISSN 1434-1948 (2.578 - 2018). ADC

Uplatnenie výsledkov projektu

Candida utilis je považovaná za reálneho konkurenta pre momentálne dostupné platformy na expresiu rekombinantných proteínov. Práve pre jej konkurenčné výhody bola táto kvasinka vybraná ako predmet riešenia tohto projektu. Výsledný expresný systém na báze *C. utilis* by priniesol mnoho výhod, ktoré by sa uplatnili pri expresii rekombinantných proteínov, hlavne farmaceutického charakteru, či už na terapeutické alebo diagnostické účely. Výsledky tohto projektu je možné uplatniť hlavne pri ďalšom štúdiu a vývoji expresného systému na báze *C. utilis*. Získaný výsledok v rámci tohto projektu o množstve chromozómových sád bude možné uplatniť pri určovaní počtu kópií inzertovanej expresnej kazety pri tvorbe produkčného kmeňa metódou kvantitatívnej PCR. Nové výsledky získané v rámci tohto projektu o regulácii transkripcie génov zúčastňujúcich sa metabolizmu maltózu sa uplatnia v smerovaní ďalšieho výskumu pri hľadaní sensorovej molekuly pre maltózu. Vytvorené konštrukt pre integráciu ľudskej enterokinázy do Golgiho aparátu sa uplatnia pri konštrukcii mutovaných kmeňov, ktoré by mali zabudovanú ľudskú enterokinázu do membrány Golgiho aparátu smerom do jeho lumenu. Takéto kmene by mohli byť schopné in

vivo procesovať sekrečné signály nezávisle od prirodzenej mašínérie, ktoré by mali zaradené rozpoznávacie miesto pre enterokinázu za sekrečný signál. Plazmidy s mutovanou formou maltázy, kde sa cielene integrovalo miesto pre enterokinázu sa uplatnia pri selekcii a validácii kmeňov s integrovanou enterokinázou v Golgijho aparáte. Enterokinázová aktivita v Golgijho aparáte by mala eliminovať maltázovú aktivitu, a prostredníctvom tejto eliminácie by malo byť možné kvalifikovať účinnosť procesovania.

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

V rámci riešenie projektu sa podarilo získať viacero veľmi zaujímavých výsledkov. V rámci projektu sa podarilo vyriešiť problém nejednotnosti publikovaných výsledkov ohľadne ploídie *C. utilis*. Prostredníctvom viacerých nezávislých metód bolo preukázané, že kvasinka je tetraploidná. Ďalšia časť skúmania bola zameraná na štúdium regulácie expresie génov metabolizmu maltózy za účelom využitia transkripčného regulátora z génu maltázy. V rámci skúmania sa ukázalo, že stimulačnou molekulou pre spustenie transkripcie z tohto promótoru je samotný aktivátor bez potreby koaktívácie maltózou. Potvrdila sa ale prítomnosť väzbových miest pre Mig represor, prostredníctvom cielenej mutagenézy. V rámci štúdie regulácie expresie operónu pre metabolizmus maltózy sa zistilo, že model *C. utilis* je v tomto smere odlišný od modelu *S. cerevisiae*. V dôsledku zistení sa začala práca na konštrukcii plazmidov, pomocou ktorých sa bude zisťovať priamy vplyv maltózy na expresiu z promótoru kontrolujúceho transkripciu génu pre aktivátor. Vytvorili sa plazmidy, kde je promótor z génu pre aktivátor situovaný pred gén rezistencie na zeocín. Takéto plazmidy budú slúžiť na selekcii náhodných aj cílených mutantov. Na aktivátorovom promótoe boli identifikované 3 väzbové miesta pre Mig represor, ktoré bude nutné metódou riadenej mutagenézy eliminovať a potvrdiť ich vplyv na transkripčnú aktivitu tohto promótoru v prítomnosti aj absencii glukózy. V rámci projektu sa vytvorila aj séria plazmidov, ktoré budú potrebné na zavedenie génu pre enterokinázu do chromozómu *C. utilis* a jeho účinnu expresiu. Konštrukty sú kreované tak, aby sa enterokináza zabudovala do membrány Golgijho aparátu smerom do lumenu a tak účinne procesovala sekrečné signály, za ktorými je umiestnené rozpoznávacie miesto pre enterokinázu. Sfinalizovala sa aj konštrukcia detekčných plazmidov pre potreby detekcie enterokinázovej aktivity in vivo. V jednom prípade došlo k riadenej mutagenéze maltázového génu tak, že do vnútra maltázy bolo vnesené rozpoznávacie miesto pre enterokinázu, pričom si maltáza zachovala aktivitu. Toto bolo dokázané tak, že v kmeni neschopnom metabolizovať maltózu, sa táto schopnosť vrátila transformáciou tohto kmeňa takýmto génom. Aktivitou enterokinázy by sa mala eliminovať aktivita maltázy. Ďalší vytvorený detekčný plazmid bol vytvorený tak, že za sekrečný signál (α -MF) bolo umiestnené rozpoznávacie miesto pre enterokinázu a nakoniec za toto miesto divá forma maltázy. V neposlednom rade cieľom projektu bolo využitie aj nekonvenčných elektrochemických prístupov pre vyhodnotenie expresného systému. Podarilo sa nám úspešne uplatniť 3D tlač pri cielenej konštrukcii nádoby, využiť miniaturizované sieťotlačené elektródy a Hg kvapku pre sledovanie interakcií proteín-proteín a proteín-DNA a formovanie a stabilitu samoorganizovaných vrstiev pri hodnotení úspešnosti konštrukcie expresného systému.

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

Several very interesting results were obtained as part of the project solution. As part of the project, it was possible to solve the problem of the inconsistency of the published results regarding the ploidy of *C. utilis*. Yeast has been shown to be tetraploid by several independent methods. Another part of the investigation was focused on the study of the regulation of the expression of maltose metabolism genes in order to use the transcriptional regulator from the maltase gene. As part of the investigation, it was shown that the activator itself is the stimulatory molecule for starting transcription from this promoter without the need for maltose co-activation. However, the presence of binding sites for the Mig repressor was confirmed through targeted mutagenesis. As part of the study of the regulation of the expression of the operon for maltose metabolism, it was found that the *C. utilis* model is different from the *S. cerevisiae* model in this respect. As a result of the findings, work began on the construction of plasmids, with the help of which the direct effect of maltose on the expression from the promoter controlling the transcription of the gene for the activator will be

determined. Plasmids were created where the promoter from the activator gene is located upstream of the zeocin resistance gene. Such plasmids will serve for the selection of both random and targeted mutants. 3 binding sites for the Mig repressor were identified on the activator promoter, which will have to be eliminated by the method of controlled mutagenesis and their influence on the transcriptional activity of this promoter in the presence and absence of glucose confirmed. The project also created a series of plasmids that will be needed to introduce the enterokinase gene into the *C. utilis* chromosome and its effective expression. The constructs are created so that the enterokinase is built into the membrane of the Golgi apparatus towards the lumen and thus effectively processes secretory signals, behind which the recognition site for enterokinase is located. The construction of detection plasmids for the needs of detection of enterokinase activity in vivo was also finalized. In one case, a site-directed mutagenesis of the maltase gene was carried out by introducing a recognition site for enterokinase into the maltase, while the maltase retained its activity. This was demonstrated by the fact that in a strain unable to metabolize maltose, this ability was restored by transforming this strain with such a gene. Enterokinase activity should eliminate maltase activity. Another created detection plasmid was created by placing the recognition site for enterokinase behind the secretion signal (α -MF) and finally the wild-type maltase after this site. Last but not least, the goal of the project was the use of unconventional electrochemical approaches for evaluation of the expression system. We managed to successfully apply 3D printing in targeted construction cell, use miniaturized screen-printed electrodes and a Hg drop electrode for monitoring protein-protein and protein-DNA interactions and formation and stability of SAM in evaluating the success of the construction of the expression system.