

## Formulár ZK - Záverečná karta projektu

|                                                                                                          |                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Riešiteľ: Ing. Jozef Nahálka, PhD                                                                        | Evidenčné číslo projektu: APVV-51-040205 |
| Názov projektu: Oligosacharidy, neoglykopeptidy/proteíny a humanizované plasty – ich syntéza a aplikácie |                                          |

|                                                                       |                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:                          | Chemický ústav – Slovenská akadémia vied                                                       |
|                                                                       | Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava                                                           |
|                                                                       |                                                                                                |
|                                                                       |                                                                                                |
|                                                                       |                                                                                                |
|                                                                       |                                                                                                |
| Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát): | Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering, Graz University of Technology, Austria |
|                                                                       |                                                                                                |
|                                                                       |                                                                                                |

|                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače):</b><br><br><b>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</b> | Nahálka, J. & Pätoprstý, V. 2009, "Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3)", <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> , vol. 7, no. 9, pp. 1778-1780. (3.550-IF2008)                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                     | Nahálka, J., Mislovičová, D. & Kavcová, H. 2009, "Targeting lectin activity into inclusion bodies for the characterisation of glycoproteins", <i>Molecular BioSystems</i> , vol. 5, no. 8, pp. 819-821. (4.236-IF2008)                                                                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                     | Nahálka, J., Vikartovská, A. & Hrabárová, E. 2008, "A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis", <i>Journal of Biotechnology</i> , vol. 134, no. 1-2, pp. 146-153. (2.478-IF2008)                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                                     | Nahálka, J. 2008, "Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from <i>Pyrococcus furiosus</i> and its application in a process of batch starch degradation to alpha-D-glucose-1-phosphate.", <i>Journal of industrial microbiology &amp; biotechnology</i> , vol. 35, no. 4, pp. 219-223. (1.919-IF2008)                                  |
|                                                                                                                                                                                                     | Nahálka, J., Shao, J. & Gemeiner, P. 2007, "Oligosaccharides, neoglycoproteins and humanized plastics: Their biocatalytic synthesis and possible medical applications", <i>Biotechnology and applied biochemistry</i> , vol. 46, no. 1, pp. 1-12. (1.288-IF2008)                                                                                       |
|                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:                                                                                                                                                         | <b>Projekt sa pohyboval 100% v základnom výskume (Bioorganická chémia, Bioinžinierstvo a priem. Biotechnológia, Molekulárna biológia). Bol zameraný na spoločenský prínos, na rozšírenie VT duchovného bohatstva – medzinárodne orientovaná miera riešenia.</b><br><b>Základné uplatnenie projektu vidíme v príprave „pôdy“ pre Aplikovaný výskum.</b> |

## Charakteristika výsledkov

### Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Hlavným cieľom projektu bol vývoj ekonomicky relevantnej stratégie zameranej na syntézu biologicky aktívnych oligosaccharidov, glykopeptidov, glykoproteínov a glykoplastov s využitím najmodernejších poznatkov z oblastí molekulárnej biológie, syntetickej chémie, a biochémie.

Efektívna regenerácia enzýmových kofaktorov a enzýmová imobilizácia sú dva faktory, ktoré boli v minulosti najväčším problémom pre industrializáciu viacerých sľubných glyko-chemo-enzymatických procesov, preto sme sa sústredili na riešenie týchto aspektov. Objavili sme novú polyfosfát kinázu, PPK3, ktorá efektívne prenáša makroergické fosfátové väzby z rozpustných polyfosfátov na nukleoziddifosfáty. Polyfosfát ( $P_n$ ) môže byť priemyselne ľahko získaný hasením roztaveného fosforečnanu sodného. Očakávame, že takto konzervovaná energia vo forme  $P_n$  bude môcť byť efektívne použitá nielen pre glyko- ale aj pre proteo- a nukleosyntézu.

Vznik neaktívnych proteínových agregátov, známych ako inklúzne telieska (IBs), je bežným pozorovaním v priebehu produkcie rekombinantných proteínov prokaryotickými host'ovskými bunkami. Vyvinuli sme metódu kontrolovanej *in vivo* precipitácie, v ktorej cieľový proteín je pripojený s *N*-koncom ku celulózo viažucej doméne z *Clostridium cellulovorans* (CBDclos). Exprimovanie v *Escherichia coli* prebieha za podmienok, v ktorých sa indukuje selektívna precipitácia chimérneho proteínu cez CBDclos-agregačný modul. V počte viac ako desiatich enzýmov sme úspešne stiahli takmer celú vnútrobunkovú aktivitu do IBs. Touto metódou sme tiež navrhli fyziologicky agregovať lektínové funkčné domény a využiť IBs ako nástroj na "čítanie" glykokódu.

Na jednej strane máme k dispozícii technológiu pre syntézu nukleotidukrov (CMP-NeuAc, UDP-Glc/Gal, GDP-Man/Glc) a na strane druhej máme skríning stratégiu (lektín-IBs) pre riadenú evolúciu glykosyltransferáz.

Nakoniec je možné zdôrazniť, že sme vyvinuli ekonomicky relevantnú stratégiu pre „scale up“ glykosyntéz a tiež treba vyzdvihnúť význam výskumu programovateľnej glykosyntézy na úrovni *in vitro* systémov.

### Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

The project was about development of economically feasible strategy aimed at the synthesis of biological active oligosaccharides, glyco-peptides/proteins and glycoplastics by integration of recent development in the fields of molecular biology, synthetic chemistry and biochemistry.

Effective cofactor regeneration and enzyme immobilization are two factors that have been great hurdles in the industrialization of many promising glyco-chemo-enzymatic processes; therefore we mainly focused on them. We discovered novel polyphosphate kinase - PPK3 which effectively transfer macroergic phosphate bonds from soluble polyphosphates to nucleoside diphosphates. The polyphosphate ( $P_n$ ) can be industrially obtained easily by quenching of molten sodium phosphate. We expect that bio-energy conserved in  $P_n$  will be possible effectively used by PPK3 not only for glyco- but also for proteo- and nucleic acid-synthesis.

Inactive protein aggregates, widely known as inclusion bodies (IBs), are a common observation during recombinant protein production in prokaryotic hosts. We have developed a novel method of controlled precipitation *in vivo*, in which a target protein is *N*-terminally fused to the cellulose-binding domain of *Clostridium cellulovorans* (CBDclos). Expression in *Escherichia coli* is performed under conditions that induce selective pull-down of the folded chimeric protein via intermolecular self-aggregation of CBDclos. Using this method, we successfully IB-targeted almost all intracellular activity in the case over ten enzymes. We proposed new applications of this method - physiological aggregation of lectin functional domains into IBs and use it as glycode "reading" tool.

On one side, we have technology for biosynthesis of sugar-nucleotides (CMP-NeuAc, UDP-Glc/Gal, GDP-Man/Glc), on other side we have screen strategy (lectin-IBs) for directed evolution of glycosyltransferases.

Finally, we can say that we developed feasible strategy for the scale up of glycosynthesis and we can highlight research for programmable glycosynthesis by engineering of *in vitro* systems.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas so zverejnením údajov v nej uvedených.

Podpis zodp. riešiteľa: .....

Dátum: .....

Podpis štatutárneho zástupcu: .....

Pečiatka: