



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

december 2013

INFORMAČNÝ LIST ÚSPEŠNE ZREALIZOVANÉHO PROJEKTU

| | | |
|-------------------------|--------------|---|
| Názov projektu | | Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života |
| Kód ITMS | | 26240120003 |
| Prijímateľ | Názov | Univerzita Komenského v Bratislave |
| | Sídlo | Šafárikovo námestie 6, 818 06 Bratislava |
| Operačný program | | Výskum a vývoj |
| Prioritná os | | 4 Podpora výskumu a vývoja v Bratislavskom kraji |
| Opatrenie | | 4.1 Podpora sietí excelentných pracovísk výskumu a vývoja ako pilierov rozvoja regiónu v Bratislavskom kraji |
| Partner | | Ústav molekulárnej biológie SAV (ÚMB SAV) Virologický ústav SAV (VÚ SAV) |

1. Miesto realizácie projektu

| Okres | Obec | Ulica | Číslo |
|------------|--------------------------|-----------------|-------|
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Mlynská dolina | CH1 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Mlynská dolina | B1 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Mlynská dolina | B2 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Mlynská dolina | G |
| Bratislava | Bratislava – Staré mesto | Sasinkova | 2 |
| Bratislava | Bratislava – Nové mesto | Odbojárov | 10 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Dúbravská cesta | 9 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Dúbravská cesta | 21 |
| Bratislava | Bratislava – Karlova Ves | Mlynská dolina | F1 |

2. Finančný a časový rámec realizácie projektu

| | | |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Časový rámec realizácie projektu (MM/RRRR) | Začiatok realizácie aktivít projektu | Ukončenie realizácie aktivít projektu |
| | 05/2009 | 10/2011 |

| | | | |
|--|-----------------------------------|------------------------|--------------|
| Výdavky projektu v EUR | Celkové oprávnené výdavky | | 1 391 315,81 |
| | Z toho | NFP | 1 321 750,02 |
| | | Vlastné zdroje | 69 565,79 |
| Čerpané výdavky projektu v EUR po schválení záverečnej ŽoP | Čerpané celkové oprávnené výdavky | | 1 126 706,16 |
| | Z toho | Čerpané NFP | 1 070 370,85 |
| | | Čerpané vlastné zdroje | 56 335,31 |

3. Cieľ a dosiahnuté výsledky projektu

| | |
|--|--|
| Cieľ projektu | <p>Cieľ projektu Vybudovanie infraštruktúry pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej biomedicínskej diagnostiky, terapie a bioinformatiky.</p> <p>Špecifický cieľ projektu 1 Vybudovanie infraštruktúry pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej biomedicínskej diagnostiky.</p> <p>Špecifický cieľ projektu 2 Vybudovanie infraštruktúry pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej biomedicínskej terapie.</p> <p>Špecifický cieľ projektu 3 Vybudovanie infraštruktúry pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej biomedicínskej bioinformatiky.</p> |
| Dosiahnuté výsledky merateľných ukazovateľov | <p>1. Počet publikácií v nekarentovaných časopisoch 15/20,8 (138,68%)</p> <p>2. Počet prác publikovaných v nerecenzovaných vedeckých periodikách a zborníkoch 20/25,8 (129,00%)</p> <p>3. Študenti doktorandského štúdia vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – ženy 47/70 (148,94%)</p> <p>4. Študenti doktorandského štúdia vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – muži 47/37(78,72 %)</p> <p>5. Výskumníci do 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – ženy 47/46 (97,87%)</p> <p>6. Výskumníci do 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – muži 47/44 (93,62%)</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>7. Výskumníci nad 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – ženy 57/56 (98,25%)</p> <p>8. Výskumníci nad 35 rokov vlastnej organizácie a partnerov v projekte, ktorí využívajú poskytnutú podporu – muži 55/55 (100,00%)</p> |
| <p>Dosiahnuté výsledky projektu v rámci aktivity</p> | <p>Aktivita 1.1 Genomika a proteomika patogénov s akcentom na identifikáciu potenciálnych terapeutických cieľov</p> <p><i>Cieľ aktivity:</i> Infraštruktúra pre identifikáciu potenciálnych cieľov pre liečbu chorôb spôsobovaných patogénmi</p> <p><i>Výstup aktivity:</i> Vytvorenie infraštruktúry umožňujúcej izoláciu subcelulárnych štruktúr a molekúl patogénnych mikroorganizmov, čo vytvára nevyhnutný predpoklad pre ich podrobnejšiu charakterizáciu. Využitelnosť infraštruktúry bude pre väčšinu ostatných aktivít Centra. Unikátne prístroje umožnia získavanie výsledkov publikovateľných v špičkových zahraničných časopisoch a potenciálne využiteľných aj v medicínskom a farmaceutickom aplikovanom výskume.</p> <p><i>Naplnenie výstupu:</i> Počas riešenia projektu sa podarilo na pôde Prírodovedeckej fakulty položiť základy pracoviska zameraného na biomedicínsky výskum, ktoré spĺňa aj náročné medzinárodné kritériá. Výber laboratórnej infraštruktúry v rámci tejto aktivity odráža potrebu pokrytia celého spektra činností nevyhnutných pre uskutočnenie experimentálnej práce v uvedenej oblasti.</p> <p><u>Vysokokapacitný laboratórny autokláv</u> (slúži na sterilizáciu vybraných roztokov a špeciálnych živných pôd (napr. Luria-Bertani médium a jeho modifikácie pre prácu s baktériami <i>E. coli</i> a vybranými druhmi rodu <i>Mycobacterium</i>, YPD médium pre modelové kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, ako aj podmienene patogénne druhy z rodu <i>Candida</i>, Brain Heart Infusion médium na kultiváciu trypanozomatíd). Prístroj je nevyhnutný aj na likvidáciu biologického odpadu vygenerovaného počas experimentálnej práce podľa požiadaviek aktuálnej slovenskej a európskej legislatívy.</p> <p>Práca s patogénmi, resp. s ich DNA zavedenou do nepatogénnych mikroorganizmov, vyžaduje zvýšené požiadavky na biologickú bezpečnosť - tú zabezpečuje využívanie <u>laminárneho boxu Top Safe 1.2</u> s</p> |

vysokoúčinnými HEPA filtrami, ktoré zabraňujú úniku mikroorganizmov do prostredia, ku ktorému by mohlo dôjsť pri ich očkovaní do tekutých, či tuhých médií, transformácii mikroorganizmov cudzorodou DNA, alebo pri zbieraní kultúr. Zároveň tento prístroj umožňuje prácu v sterilnom prostredí, ktoré je kritické pre manipuláciu s mikroorganizmami a citlivými biochemikáliami.

Vysokokapacitný kultivačný box Multitron

s termostatickou reguláciou umožňuje kultiváciu mikroorganizmov za presne definovaných a kontrolovaných podmienok, ktoré sú nevyhnutné pre zabezpečenie reprodukovateľnosti dosiahnutých výsledkov. Podmienky kultivácie sú kľúčovým faktorom pre zvýšenie produkcie proteínov, pričom najmä v prípade expresie rekombinantných proteínov v najnovších komerčných expresných kmeňoch *E. coli* je dôležitá možnosť kultivácie pri relatívne nízkej teplote (16°C) a vysokých otáčkach trepania (až 180 rpm). Okrem baktérií sa kultivačný box využíval na pestovanie kvasiniek. V rámci pilotných experimentov sa pracovalo s konštruktami obsahujúcimi gény špecifikujúce transkripčné faktory Pdr1p a Yap1p vo vektoroch, ktoré sú schopné replikácie v nepatogénnych *S. cerevisiae*, *K. lactis* a v patogénnych kvasinkách *Candida glabrata*, za účelom ich funkčnej a komparatívnej analýzy v schopnosti navodiť rezistenciu k rôznym cytotoxicky pôsobiacim látkam, ako aj stanovenie účasti génu KNQ1 kvasiniek *K. lactis* v transporte bóru z buniek.

Purifikácia rekombinantných proteínov, resp. štúdium enzýmových aktivít vybraných proteínov vyžaduje dezintegráciu mikroorganizmov. Uprednostňované sú šetrné metódy, ktoré zachovávajú terciárnu štruktúru proteínov, a tým aj ich aktivitu. Za týmto účelom bolo obstarané **zariadenie na dezintegráciu buniek One Shot Cell Disruptor**, ktoré v sebe spája výhody jednoduchej a rýchlej manipulácie, možnosti pracovať s malými objemami vzoriek a reprodukovateľnosti podmienok dezintegrácie. Okrem spracovania kvasiniek (*S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Candida glabrata*) s cieľom študovať faktory virulencie, sme v rámci testovania jeho aplikácie prístroj využili na prípravu bunkových lyzátov *Mycobacterium smegmatis* mc²155, za účelom sledovania špecifických reakcií výstavby bunkovej steny (aktivity galaktozyltransferáz GlfT1 a GlfT2, a dekaprenylfosforyl ribóza epimerázy DprE1/DprE2), ktoré môžu slúžiť ako potenciálne terapeutické ciele pre vývoj nových antituberkulotík.

Subcelulárne frakcie boli pripravené z bunkových lyzátov za využitia **stolnej ultracentrifúgy Optima**

Max. Ide o jedinečné zariadenie, ktoré umožňuje spracovanie malých objemov, ako sú napríklad vzorky pripravené pomocou One Shot Cell Disruptera. Vysoké otáčky, ktoré centrifúga dosahuje, ale aj široké možnosti selekcie objemov spracovaných vzoriek umožňujú špecifické aplikácie, ktoré doposiaľ nášmu pracovisku neboli dostupné. Okrem toho je centrifúga je vybavená HEPA filtrom na zvýšenie biologickej bezpečnosti pri práci so vzorkami. Zistili sme, že enzýmové frakcie z mykobaktérií dezintegrovaných pomocou One Shot Cell Disruptera a frakcionovaných pomocou centrifúgy Optima Max vykazovali vyššiu aktivitu sledovaných enzýmov v porovnaní s bunkami lyzovanými sonikáciou.

Na analýzu študovaných biomakromolekúl slúžia dve zariadenia:

Systém pre dvojrozmernú elektroforézu proteínov Protean IEF cell s denzitometrom určeným na vyhodnotenie získaných profilov. Na tomto zariadení bola realizovaná kompletná analýza proteínovej vzorky - extraktu z baktérií *E. coli* a bolo uskutočnených niekoľko jednorozmerných elektroforetických analýz zameraných na biochemickú charakterizáciu mutantných foriem telomerického proteínu Tay1p, ktorá súvisí s ambíciou identifikovať potenciálne terapeutické ciele u kvasinkových mikroorganizmov.

Bioanalyzér systém má široké spektrum aplikácií na mikrofluidickom čipe. Prístroj pracuje v dvoch modusoch - (i) ako prietokový cytometer na analýzu buniek, (ii) ako elektroforéza na kvalitatívnu a kvalitatívnu analýzu biomolekúl. Pilotné experimenty boli uskutočnené so vzorkami enterobaktérií a euglenoidných mikroorganizmov, hlavne v režime práce elektroforéza na mikrofluidickom čipe, a to na kvalitatívnu analýzu aj kvantifikáciu biomolekúl DNA a RNA; determináciu parametrov, ako sú veľkosť fragmentov DNA, ich koncentrácia a molarita, resp. koncentrácia RNA a jej integrita, zastúpenie rôznych populácií RNA, ich pomer v rámci celkovej RNA.

Vzorky enterobaktérií a euglenoidných mikroorganizmov sa využívali aj na analýzu DNA v **PCR termocykléroch**. Termocyklér umožnil zistiť prítomnosť určitého úseku DNA v danej vzorke, čo v prípade baktérií slúžilo na identifikáciu hľadaného druhu enterokokov v analyzovanej vzorke. Pomocou tzv. reverzne-transkriptázovej PCR s využitím cDNA ako templátu sme semi-quantitatívne stanovovali expresiu génov u euglenoidných mikroorganizmov. Okrem toho PCR termocykléry sú nevyhnutným zariadením pre konštrukciu plazmidov pre expresiu génov, ktoré môžu predstavovať potenciálne ciele pre terapiu vybraných ochorení, ako aj na prípravu kmeňov

pre štúdium esenciality týchto génov.

Na purifikáciu študovaných proteínov sa využíva zariadenie **HPLC - typ 1**, ktoré umožňuje vysokoúčinnú chromatografickú separáciu molekúl, predovšetkým peptidov a proteínov. Najbežnejšou aplikáciou je purifikácia rekombinantných proteínov pripravených v expresných systémoch *E. coli*. Systém bol úspešne využitý pre proteín alkohol dehydrogenázu zo *Saccharomyces cerevisiae* exprimovanú z plazmidu pRSFDuet-ADH v bunkách *E. coli* BL21 (DE3) a v bunkách *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) a pre proteín formiát dehydrogenázu exprimovanú v plazmide pRSFDuet-FDH v bunkách *E. coli* BL21 (DE3) a v bunkách Rosetta-Gami 2 (DE3).

Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:

UK BA 100%

ÚMB SAV 0,00%

VÚ SAV 0,00%

Aktivita 1.2 Diagnostika patogénov v potravinách

Cieľ aktivity:

Infraštruktúra pre komparatívnu genomiku a proteomiku patogénnych eukaryotických mikroorganizmov.

Výstup aktivity:

Výstupom aktivity bude zavedenie nových metodík pre detekciu významných patogénov. Získaná infraštruktúra a metodiky budú prístupné pre ostatných partnerov projektu ako aj pre spolupracujúce pracoviská. Vedecké výsledky budú publikované v odbornej tlači.

Naplnenie výstupu:

Vysokopriepustný PCR cyklier - Invázia kmeňov *S.agalactiae*, *S. uberis*, *S. disgalactiae*, *S. aureus* a rôzne formy *E. coli* do prostredia je v súčasnom období alarmujúca. Vzhľadom k ich vysokej patogenite, rezistencii voči mnohým používaným antibiotikám, možnosti horizontálneho prenosu génov a variabilite v rôznych prostrediach je v súčasnosti nevyhnutné vypracovanie účinných detekčných metód pre izoláty kontaminujúce potraviny. Keďže spomínané izoláty a kmene mikroorganizmov sú spoluzodpovedné aj za mastitídu u prežúvavcov, je veľká pravdepodobnosť ich šírenia v prostredí a prenášania v potravinových reťazcoch ekosystému. Tieto kmene a izoláty, v konečnom dôsledku kontaminujúce potraviny predovšetkým mliečneho pôvodu, cirkulujúce v danom prostredí nie sú charakterizované a podchytené na molekulárno-biologickom základe, čím vzniká relatívne vysoký stupeň rizika nákazy konečného užívateľa v

potravinovom reťazci.

V súčasnom období sú mikrobiologické metódy používané na dôkaz patogénnych baktérií v potravinách časovo náročné, čím sa neumožňuje efektívna kontrola mikrobiálnej nezávadnosti potravín. Ako rýchlejšia alternatíva dôkazu niektorých izolátov patogénnych mikroorganizmov kontaminujúcich potraviny je polymerázová reťazová reakcia (PCR). Na rutinný dôkaz prítomnosti izolátov *S. agalactiae*, *S. aureus* a *E. coli* v mliečnych a mäsových výrobkoch bola rozpracovaná vysoko špecifická metodika využívajúca multiplex PCR priamo zo vzoriek potravín bez predchádzajúcej kultivácie mikroorganizmov na základe nových špecificky dizajnovaných primérov.

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis,

DGGE) – jednou z najcitlivejších techník pre vyhľadávanie mutácií je elektroforéza v gradientovom denaturačnom géli. Rýchlosť denaturácie DNA závisí od počtu vodíkových mostíkov v reťazci DNA. Ľahšie sa od seba oddeľujú v úsekoch bohatých na AT páry, zatiaľ čo úseky bohaté na GC sa budú ťažšie denaturovať. Pomocou DGGE sa dajú oddeliť DNA a amplifikáty vzniknuté PCR. Amplifikáty vzniknuté pomocou PCR pri detekcii patogénnych mikroorganizmov v potravinách alebo nachádzajúce sa v enviromente môžu generovať DNA šablóny rôznych DNA sekvencií, ktoré predstavujú mnoho dominantné mikrobiálne organizmy. PCR produkty na základe daných dizajnovaných primerov sú podobné veľkosťou a preto konvenčné separačné elektroforézy v agarózových géloch dávajú iba jeden fragment, ktorý nie je vždy vhodný pre sekvenčné analýzy. DGGE prístupom sa môžu pomerne jednoducho prekonať tieto problémy tak, že sa oddelia PCR produkty na základe diferenciálnej denaturácie DNA. S dizajnovaním vhodných PCR primérov sa DGGE využíva na charakterizáciu širokej palety špecifických cieľových mikroorganizmov a variability ich génov.

- DGGE elektroforéza sa využívala v obmedzenom režime na identifikáciu bakteriálnych patogénnych mikroorganizmov kontaminujúcich potraviny (*E.coli*, *S. agalactiae* a *S.aureus*)
- Optimalizovali sa podmienky pre charakterizáciu a variabilitu PCR produktov amplifikovaných na základe dizajnovaných primerov a na rýchlu detekciu patogénnych mikroorganizmov v potravinách.

Fluorescenčný mikroskop Leica DM 2500 -

kombinuje vysoký výkon optických prvkov s

počítačovou kontrolou a digitálne snímanie obrazu. Na rozdiel od optických mikroskopov, fluorescenčný mikroskop je schopný rozoznať štruktúru objektu na molekulárnej úrovni a to na základe vlastností fluorescenčného žiarenia. Preto pomocou fluorescenčnej mikroskopie sa dá napr. odhaliť - presné umiestenie vnútrobunkovej zložky označené konkrétnym fluoroforom. Fluorofor je látka, ktorá je schopná absorbovať svetlo určitej vlnovej dĺžky a následne emitovať svetlo o dlhšej vlnovej dĺžke. Fluorescencia taktiež umožňuje vyšetovanie pH, viskozity, indexu lomu, iónovú koncentráciu, membránový potenciál a polaritu rozpúšťadla v živých bunkách a tkanivách. Častou aplikáciou endolyzínov v potravinárstve je biologická kontrola bakteriálnych kontaminácií. Príkladom je produkcia a sekrécia špecifického endolyzínu z *L. monocytogenes* v *Lactococcus lactis*, čím sa vytvorí ochrana voči kontaminácii listériami. CB domény (väzobné domény viažuce sa na bunkovú stenu) na endolyzín sú zodpovedné za jeho špecificitu, pretože sa viažu s vysokou afinitou na špecifické karbohydrátové ligandy. Túto vlastnosť sa využila pri špecifickom označení *L. monocytogenes* pomocou fúzneho produktu CBD a fluorescenčnej značky. Tým sa špecificky odlišili patogénne baktérie medzi bakteriálnou populáciou. V rámci projektu výskumníci pripravili a izolovali špecifický proteín gp24BD-GFP – (väzbová doména lytického proteínu endolyzínu vo fúzii s GFP - zelený fluorescenčný proteín) a sledovali pomocou fluorescenčného mikroskopu špecificitu väzby na povrch buniek brevivaktérii, bacillov a E.coli.

Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:

UK BA 45,00%

ÚMB SAV 55,00%

VÚ SAV 0,00%

Aktivita 1.3 Prietokový cytometer v analýze a detekcii markerov ľudských ochorení

Cieľ aktivity:

Cieľom nákupu prietokového cytometra je získať zariadenie, ktoré umožní študovať rôzne bunkové parametre ako napr. priebeh bunkového cyklu, typ a štádiá bunkovej smrti v rozličných populáciách, rezistenciu na liečivá v rôznych typoch buniek vystavených patologickým podmienkam. Výsledky týchto analýz bude možné následne korelovať s markermi ľudských ochorení ako napr. markery nádorovej progresie (c-erbB-2, CD-44, CA IX), povrchové znaky nádorových buniek, vírusové a mikrobiálne antigény, receptory pre hormóny a cytokíny a pod.. Nákup cytometra je podstatný pre

štúdium molekulárnych mechanizmov ľudských ochorení, identifikáciu vhodných markerov a vývoj diagnostických metód (napr. neinvazívnu detekciu cirkulujúcich nádorových buniek).

Výstup aktivity:

Prietokový cytometer získaný a uvedený do činnosti v rámci tejto aktivity budú pri výskume priamo využívať pracovníci organizácie žiadateľa a partnerov, ktorí patria do nasledujúcich cieľových skupín: študenti doktorandského štúdia, výskumníci do 35 rokov a výskumníci nad 35 rokov (vrátane tých, ktorí sa vrátili pôsobiť do slovenských organizácií), spolu minimálne 20 pracovníkov v priebehu riešenia projektu. Okrem nich budú prístroj využívať aj študenti VŠ pri vypracovávaní diplomových prác pod vedením pracovníkov organizácií Centra. Zároveň sa prístroj využije pri riešení projektov 6. a 7. Rámcového programu EÚ a iných medzinárodných projektov, v ktorých pracoviská centra participujú (konkrétne projektov CELLCHECK, METOXIA). Ďalšími výstupmi budú publikácie v časopisoch a zborníkoch (min 5 v priebehu riešenia projektu).

Naplnenie výstupu:

Prietokový cytometer Guava EasyCyte 6HT je využívaný na :

- *určenie úspešnosti transfekcie rôznych vektorov z cicavčích buniek*

Prietokový cytometer Guava EasyCyte 6HT využil prijímateľ na určenie účinnosti transfekcie epiteliálnych buniek derivovaných z nádoru krčka maternice (bunky HeLa) vektorom pLVET-tTRKRAB obsahujúcim gén kódujúci zelený fluorescenčný proteín (GFP). Bunky HeLa boli transfekované a následne kultivované v prítomnosti doxycyklínu, čím bola zabezpečená indukcia expresie GFP. Po 72 h boli bunky trypsinizované, resuspendované a podrobené analýze. S využitím prietokového cytometra bola zaznamenaná účinnosť transfekcie, ktorá bola 65%-ná.

- *Meranie viability nádorových buniek rastených v monovrstve alebo vo forme sféroidov po opracovaní liečivami*

Bol sledovaný vplyv liečív na viabilitu v 3-D modeloch napodobňujúcich procesy prebiehajúce v nádoroch. Pripravili sa bunkové modely z nádorových línií, či už vo forme monovrstvy alebo sféroidov. Bunkové modely boli opracované liečivami v rôznych variantoch a koncentráciách. Pozbierané a resuspendované bunky boli naznačené fluorescenčným farbivom propidium jodid a analyzovali sa prietokovým cytometrom Guava EasyCyte 6HT. Sledovali sa rozdiely v populáciách nekrotických, apoptotických a nepozmenených buniek.

- *Sledovanie stability väzby potencionalne imunogénnych peptidov odvodených od vírusu LCMV v HLA komplexe na T2 bunkách.*

T2 (TAP deficientné) bunky sa opracovali vybranými peptidmi odvodenými z nukleoproteínu vírusu LCM. Bunky sa označili protilátkou namierenou voči HLA-A2 a pomocou FACSu sa sledovala stabilita väzby peptid+HLA –A2. Zo 16 peptidov boli vybrané 4, ktoré sa budú ďalej využívať na tvorbu MHC tetramérov.

Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:

UK BA 64,00%

ÚMB SAV 0,00%

VÚ SAV 36,00%

Aktivita 2.1 Molekulárna terapia a personalizovaná medicína.

Cieľ aktivity:

Vytvorenie infraštruktúry pre kompetitívny výskum v oblasti molekulárnej terapie závažných ochorení.

Výstup aktivity:

Priamym výstupom tejto aktivity bude zabezpečenie najvýhodnejšej dodatočnej infraštruktúry participujúcich laboratórií a zavedenie príslušných metodík. Prirodzene, nepriamo bude zvýšená kvalita laboratórií viesť k publikáciám v odborných časopisoch a predpokladá sa aj získanie vedeckých grantových projektov. Prístroje i metodiky budú k dispozícii pre ostatných partnerov projektu v spolupráci.

Naplnenie výstupu:

Riešiteľský kolektív realizoval v rámci aktivity projektu viaceré experimenty zamerané na oxidačný stres, jeho biomarkery a analýza expresie génov v súvislosti s oxidačným poškodením tkanív. Pomocou centrifúgy s platničkovým rotorom a termálneho cykléru sa podarilo zaviesť vysoko-priechodnú metodiku na analýzu viacerých markerov oxidačného stresu. Svetovým unikátom je zavedenie týchto metodík aj na analýzu markerov oxidačného stresu v slinách ako diagnostickej tekutiny s neinvazívnym a opakovateľným odberom. Platničková elektroporácia umožňuje rýchlu transformáciu baktérií vo veľkom počte permutácií, čo je dôležité pri výskume interakcie voľných radikálov a baktérií. Vysoko-priechodné analýzy boli aplikované na klinické vzorky slín od pacientov s periodontitídou alebo so syndrómom spánkového apnoe. V tkanivách experimentálnych zvierat boli markery oxidačného stresu analyzované pod vplyvom nutričných a endokrinných faktorov, ako aj v modeloch ľudských ochorení.

Projekt sa realizoval na pracovisku Ústavu

Molekulárnej Biomedicíny (IMBM). Na prístrojoch zakúpených v rámci projektu pracovali zamestnanci Lekárskej fakulty UK, najmä IMBM. Dôležitým aspektom je školenie zapojenie doktorandov a diplomantov, ktorí na prístrojoch realizujú svoje doktorandské a diplomové práce. Prínosom je vytvorenie spolupráce s ústavmi LF UK, ale aj s participujúcimi fakultami UK a ústavmi SAV, čo dokumentujú aj publikácie, kde v autorskom kolektíve sú ako zamestnanci IMBM, tak aj iných fakúlt UK a ústavov SAV. Okrem uvedených publikácií boli pripravené viaceré manuskripty, ktoré sú v recenznom konaní v odborných časopisoch.

Na základné laboratórneho spracovania vzoriek východzieho materiálu (sliny, krv, bakteriálne kultúry), prípravu, izoláciu a purifikáciu nukleových kyselín pre účely genetických analýz s vysokou priepustnosťou boli využité **univerzálne chladené stolové centrifugy Hermle**. Obe centrifugy boli využívané v rámci projektov, ktorých zoznam, stručná charakteristika a rozsah spracovaných vzoriek je uvedený nižšie.

Automatický pipetovací systém Qiaquility bol využitý najmä ako nástroj na presné, reprodukovateľné a rutinné pipetovanie mikrolitrových objemov pre aplikácie typu miešanie PCR, qPCR, prípravu riedení nukleových kyselín pre kalibračné protokoly, príprava ELISA esejí, normalizáciu vzoriek po izolácii a purifikácii, riedenie DNA, príprava vzoriek pre kontrolnú elektroforézu, príprava štiepných reakcií, príprava vzoriek pre fragmentovú analýzu, príprava postPCR čistiacich reakcií, príprava sekvenčných reakcií, príprava postsekvenačných čistiacich reakcií.

Gradientové PCR cykly Eppendorf Mastercycler boli použité na mikrolitrové inkubácie, najmä tie, ktoré vyžadovali krokové zmeny teplôt v definovaných časových intervaloch, teda nielen pre PCR pri optimalizácii jednotlivých PCR profilov či rutinných PCR, ale aj pre špecifické kroky izolačných postupov, pri príprave vzoriek pre stanovenie markerov lipoperoxidácie v slinách a pod.

Platničkový elektroporátor Biorad je mimoriadne cenný pre vysoko-priechodnú transformáciu 96 rôznych bakteriálnych kmeňov, prípadne 96 rôznych plazmidov. V aplikáciách dominuje analýza vplyvu redoxného stavu prostredia na efektivitu transformácie, ale aj vplyv antioxidantných virulencných faktorov na schopnosť prežívania periodontálnych patogénov v podmienkach oxidačného stresu. Podobne ako pri centrifugách, pipetovacom automate a termálnych cykléroch aj elektroporátor bol použitý v rámci projektov uvedených nižšie.

Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:

UK BA 100%

ÚMB SAV 0,00%

VÚ SAV 0,00%

Aktivita 2.2 Nanoterapia

Cieľ aktivity:

Vytvorenie infraštruktúry pre kompetitívny výskum v oblasti nanoterapie nádorových ochorení.

Výstup aktivity:

Priamym výstupom tejto aktivity bude zabezpečenie najvýhodnejšej dodatočnej infraštruktúry participujúcich laboratórií a zavedenie príslušných metodík. Zvýšená kvalita laboratórií bude viesť ku kvalitnejším publikáciám v odborných časopisoch a predpokladá sa aj získanie vedeckých grantových projektov. Prístroje i metodiky budú k dispozícii pre ostatných partnerov projektu v spolupráci.

Naplnenie výstupu:

Práce na **ZETA PLUS** tvorili v prvej etape testovanie a aplikácia softvérového vybavenia prístroja. Druhá etapa práce na ZETA PLUS bola zameraná na meranie zeta-potenciálu a veľkosti lipozómov modifikovaných kalixarénmi a cytochrómom c ako aj dendrimérov modifikovaných s RNA. Získané výsledky boli použité pri prezentáciách na konferenciách [1-2], v publikácii [3] a pri príprave publikácií [7-10].

Práce na **HPLC Premium 20A (Shimadzu)** v prvej etape analyzovali aplikácie softveru pri zapojení absorpčného a tiež fluorescenčného detektora zostavy a testovali možnosti využitia štandardu kofeínu v metanole. Druhá časť práce na HPLC bola zameraná na separáciu a identifikáciu fluoroforov v moči pri rôznych patologických stavoch v porovnaní so zdravými jedincami s cieľom otestovať možnosť rýchleho a neinvazívneho vyšetrovania pacientov. Výstupom je prezentácia na konferencii. Ďalšia časť práce na HPLC je zameraná na monitorovanie natívnych fluoroforov v tkanivách (najmä rôznych foriem kolagénov) a v krvi (porfyríny), čo bolo prezentované na konferencii a použité na prípravu publikácie.

V súlade so zámerom aktivity 2.2. „Nanoterapia“ ako priamy výstup projektu bolo plánované zabezpečenie najvýhodnejšej dodatočnej infraštruktúry participujúcich laboratórií a zavedenie príslušných metodík. Zvýšenie kvality laboratórií by sa malo odraziť na príprave kvalitných publikácií v odborných časopisoch a v získaní nových grantových projektov.

Uvedený zámer sa podarilo zrealizovať. Zrekonštruovalo sa laboratórium (FMFI UK, miestnosť F1-350), vybavili ho novým moderným laboratórnym nábytkom a laboratórnymi pomôckami. Do laboratória boli umiestnené prístroje získané v rámci projektu ITMS: 26240120003 a to Zeta Sizer Nano ZS a HPLC

Premium 20A. Tieto zariadenia boli doplnené prístrojmi na štúdium monovrstiev lipidov (NIMA, Anglicko) ako aj UV-VIS spektrometrom (Shimadzu, Japonsko). Vzniklo tak laboratórium umožňujúce efektívny výskum nanoštruktúr, takých ako nanočastice, unilamelárne vezikuly a pod. Vďaka prístrojovému vybaveniu sa podarilo uskutočniť sériu experimentov zameraných na štúdium interakcie dendrimérov s lipidovými vezikulami a do nich zabudovanými umelými receptormi ako aj experimenty zamerané na štúdium interakcie cytochrómu so špecifickými kalixarénmi. Nadobudnutá prístrojová technika tiež umožňuje vývoj metódy na detekciu natívnych a intrinzických fluorofórov ako perspektívnych onkologických markerov. Získané výsledky boli spracované do rukopisov odborných článkov zaslaných do renomovaných zahraničných časopisov Bioelectrochemistry, Journal of Controlled Release a Journal of Photochemistry and Photobiology B (Elsevier).

Podarilo sa získať grantové prostriedky na ďalšie pokračovanie výskumov a to najmä schválením projektu v rámci agentúry APVV „Mechanizmy interakcie malých molekúl s DNA aptamérami“ (Číslo projektu APVV-0410-10) ako aj projektu financovaného 7 RP EU v rámci priority FP7-PEOPLE-2010-IRSES „Materials Enhancement for Technological Applications“ (Číslo projektu 269182).

Do práce laboratória je v súčasnosti zapojených 5 doktorandov, 5 diplomanti a 3 študenti bakalárskeho štúdia. Bola zahájená úzka spolupráca s pracovníkmi Prírodovedeckej fakulty UK zameraná na vývoj biosenzorov na detekciu onkologických markerov.

Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:

UK BA 100%

ÚMB SAV 0,00%

VÚ SAV 0,00%

Aktivita 3.1 Bioinformatika

Cieľ aktivity:

Vybudovanie infraštruktúry pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej biomedicínskej bioinformatiky, prepojenie spoluriešiteľov virtuálnou privátnou sieťou (VPN) k bioinformatickým zdrojom dát a softvéru.

Výstup aktivity:

Hlavným výstupom bude infraštruktúra pozostávajúca z aplikačného servera, súborového servera inštalovaných balíkov bioinformatického softvéru a virtuálna počítačová sieť spájajúca pracoviská zúčastnených spoluriešiteľov a umožňujúca im prístup k bioinformatickým dátam a aplikačnému softvéru.

Naplnenie výstupu:

Riešenie tejto aktivity bolo podmienené zrealizovaním verejného obstarávania na softvér a hardvér. V čase do termínu dodávky vysúťaženého softvéru sa činnosť riešiteľov zamerala predovšetkým na štúdium dostupných informácií o relevantnom softvéri pre účely samotného obstarávania a následne čo najrýchlejšej implementácie špecializovaného softvéru, ale aj sieťového riešenia, predovšetkým v priestoroch PRIF UK.

Obstaraný softvér **Vektor NTI** bol dodaný 30.6.2010. Vektor NTI je univerzálny balík softvérových nástrojov ovládaných z jednotného užívateľského rozhrania, ktoré sú určené na prakticky všetky metódy využívané v molekulárno-biologickom laboratóriu pri práci s nukleovými kyselinami. Je nenahraditeľným nástrojom pri analýze a spracovaní výsledkov práce nukleovými kyselinami, ich navrhovaní a archivovaní jednotlivých sekvenčných dát pri väčšine prác s rekombinantnými DNA technikami. Jednotlivé kópie boli roz distribuované tak, aby sa dosiahlo ich najefektívnejšie využitie v jednotlivých v laboratóriách. V tomto prípade dodávka predstavuje desať nezávislých inštalácií na pracovné stanice relevantných partnerov projektu.

Softvér **Bionumerics** bol dodaný 30.6.2010 ako licencia chránená hardverovým kľúčom. Softvér je určený predovšetkým na hodnotenie separácie nukleových kyselín elektroforetickými separačnými technikami a na výpočet vzájomnej podobnosti jednotlivých vzoriek. Využíva sa predovšetkým na genotypizáciu jednotlivých kmeňov patogénnych baktérií (predmet aktivít 1.1 a 1.2). Je inštalovaný na vyhradenej pracovnej stanici, ktorá je režimom vzdialeného prístupu dostupná od jednotlivých spoluriešiteľov.

Softvér **Sequence Pilot HG** bol dodaný 30.6.2010. Je špecializovaný nástroj pre analýzu predovšetkým humánnych sekvencií získaných sekvenovaním. Je inštalovaný na vyhradenej pracovnej stanici, ktorá je dostupná širokému riešiteľskému kolektívu.

Ostatné IKT komponenty vzhľadom na požadované prevádzkové podmienky sú inštalované v klimatizovaných podmienkach v priestoroch Centrálného výpočtového strediska Prírodovedeckej fakulty (konkrétne server pre aplikačný softvér a server- súborový server a časť inteligentne sieťové prepínače, súčasťou sú aj inštalácie príslušného softvéru – operačného systému, antivírusovej ochrany a zabezpečenia privátnej siete). Ostatné manažovateľné sieťové prepínače, a inteligentne sieťové prepínače sú v príslušných priestoroch sieťovej infraštruktúry v pavilóne CH1, B2 a B1 Prírodovedeckej fakulty UK. Celé riešenie ako funkčný

| | |
|--|--|
| | <p>celok bolo uvedené do činnosti 31.2.2011. Bioinformatická infraštruktúra je predovšetkým servisnou podporou pre aktivity 1.1, 1.2, 1.3.</p> <p><i>Percentuálny podiel partnera na rozpočte aktivity:</i> UK BA 100% ÚMB SAV 0,00% VÚ SAV 0,00%</p> |
| <p>Výdavky projektu rozdelené na prijímateľa a partnera</p> | <p>Výdavky projektu rozdelené na prijímateľa a partnera</p> <p><i>Výdavky projektu v EUR za prijímateľa UK:</i> celkové oprávnené výdavky: 1 251 901,40 EUR NFP: 1 189 306,33 EUR vlastné zdroje: 62 595,07 EUR</p> <p><i>Výdavky projektu v EUR za partnera UMB SAV:</i> celkové oprávnené výdavky: 69 707,25 EUR NFP: 66 221,89 EUR vlastné zdroje: 3 485,36 EUR</p> <p><i>Výdavky projektu v EUR za partnera VÚ SAV:</i> celkové oprávnené výdavky: 69 707,17 EUR NFP: 66 221,82 EUR vlastné zdroje: 3 485,36 EUR</p> |
| | |

FOTOGRAFIE Z MIESTA REALIZÁCIE PROJEKTU

Fotodokumentácia po ukončení realizácie aktivít projektu:



