

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE



Vybudovanie Kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny ITMS: 26240220071

Zodpovedný riešiteľ:
Prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.



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





Partneri Kompetenčného centra

- **Univerzita Komenského v Bratislave (žiadateľ)**
 - Farmaceutická fakulta
 - Lekárska fakulta
 - Prírodovedecká fakulta
- **Slovenská akadémia vied**
 - Virologický ústav SAV
 - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
 - Ústav molekulárnej biológie SAV
 - Ústav experimentálnej endokrinológie SAV
 - Ústav experimentálnej onkológie SAV
 - Molekulárno-medicínske centrum SAV
- **Slovenská technická univerzita v Bratislave**
 - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie
- **Onkologický ústav sv. Alžbety, s.r.o.**
- **GENETON s.r.o**
- **BioScience Slovakia, s.r.o**
- **Glaston, s.r.o.**

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



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

ITMS: 26240220071



Strategický cieľ projektu

- vybudovanie kompetenčného centra, ktoré spája súkromný a verejný sektor a podpora aplikovaného výskumu a vývoja v oblasti molekulárnej medicíny v tomto centre.

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





Stručná anotácia projektu

- Realizácia projektu umožní zvýšenie efektívnosti a úrovne excelentného výskumu a vývoja v Slovenskej republike v oblasti molekulárnej medicíny a biomedicíny a urýchli transláciu a transfer poznatkov zo základného výskumu do aplikačnej roviny.
- Zároveň podporí úzku spoluprácu medzi výskumnou a priemyselnou sférou a posilní rozvoj biotechnologických subjektov s komerčným potenciálom, ktorý sa v budúcnosti môže pretaviť do pokroku v kvalite zdravia a starostlivosti o zdravie.

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





Dosiahnuté výsledky

- Zriadenie Kompetenčného centra a stavebné práce súvisiace s modernizáciou jeho priestorov - predpokladaný termín ukončenia stavebných úprav je september 2014.
- Definovanie interných pravidiel spolupráce pri ochrane duševného vlastníctva a transferu technológií - pripravený dokument na pripomienkovaní u partnerov projektu
- Napredovanie výskumnej práce v aplikovanom výskume a vývoji v oblasti genomiky, proteomiky, metabolomiky a bioinformatiky.
- Diseminácia výsledkov na zahraničných a domácich konferenciách:
 - FEBS Sevilla 2012
 - FEBS Petrohrad 2013
 - 3rd Biotechnology World Congress Dubaj 2014
 - EMBO Conference Zürich 2014
 - FEBS EMBO Paríž 2014
 - SSIEM Annual Symposium Innsbruck 2014
 - 30th International Symposium on Chromatography Salzburg 2014
 - XXIV. Biochemický zjazd Bratislava 2014

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





Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.1 Výskum a vývoj v oblasti genomiky

- **WP1: Genomická analýza závažných dedičných ochorení v populácii Slovenska**
 - Pokračovalo sa v genetickej analýze génov zodpovedných za cystickú fibrózu, fenylketonúriu, myotonickú dystrofiu, neurofibromatózu typu 1, glykogenózu a diabetu typu 1
 - Získané výsledky sa podrobili softvérovej analýze na identifikáciu variantov. Identifikované varianty sa analyzovali pomocou softvéru a databázy mutácií na určenie, či sa jedná o kauzatívnu mutáciu alebo o neškodné polymorfizmy
 - Uskutočnila sa analýza génu MC4R, zodpovedného za niektoré formy obezity
- **WP2: Využitie genomiky v molekulárnej onkológii a virológii**
 - Pripravili sa vzorky odvodené z nádorových buniek mimikujúce nádorové mikrosprostredie a analyzovali sme ich fosforilačný status u vybraných génov
 - Analyzovali sa výsledky mikroarray génového profilovania, kde sme porovnávali nádorové bunky ovplyvnené s triptolidom (TTL) a neovplyvnenými bunkami
 - Analyzovali sa expresie génov asociovaných s fenotypom kmeňových buniek na subpopuláciách získaných sortovaním pomocou prietokového cytometrického sortera

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





Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.1 Výskum a vývoj v oblasti genomiky

- **WP3: Génová terapia na modulovanie angiogenézy**
 - Zaviedol sa nový model infekčného ochorenia – infekcie močových ciest pomocou uropatogénnych E. coli, na testovanie nami plánovanej génovej terapie
 - Riešila sa in vitro príprava plazmidov vhodných pre baktofekciu a alternatívnu génovú terapiu
- **WP4: Štúdium genomickej variability vybraných druhov patogénnych baktérií a vírusov**
 - Testovala sa genetická variabilita bakteriálnych izolátov Cronobacter z klinického materiálu a z potravín pomocou metódy MLST a PCR-serotypizácie
 - Študoval sa ostrov termorezistencie z viacerých kmeňov rodu Cronobacter, a E. coli a vplyv modifikujúcich génov na hladinu termorezistencie



Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.2 Výskum a vývoj v oblasti proteomiky

- **WP2 – Produkcia, izolácia a purifikácia známych a nových proteínov**
 - *Vývoj nových expresných systémov*
 - realizácia experimentov pri príprave nových expresných systémov - pripravený expresný vektor s duálnou reguláciou heterologickej expresie rekombinantných proteínov, experimentálne overenie heterológnej expresie vybraných génov v tomto systéme
 - príprava expresného vektora s PG doménou CAIX proteínu a jeho expresia v *E. coli* vo fúzii s tioredoxínom
 - *Purifikácia heterologických proteínov*
 - optimalizácia FPLC purifikácie extracelulárnej ekto domény HisTag CAIX proteínu, jeho separácia od tioredoxínu pomocou špecifickej proteázy



Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.2 Výskum a vývoj v oblasti proteomiky

- **WP3 – Molekulárna a biochemická charakterizácia a štruktúrna analýza proteínov**
- *Klonovanie vybraných génov patogénnych mikroorganizmov*
 - naklonovali sme gény *orfI* a *orfJ* z ostrova termotolerancie prítomného u niektorých kmeňov *Cronobacter* a iných enterobaktérií
- *Optimalizácia expresie vybraných génov a ich purifikácia*
 - heterologická expresia uvedených génov v *E. coli* BL21 (DE3) a ich purifikácia (špecificitu proteínov OrfI a OrfJ sme potvrdili metódou Western blotu na základe prítomnosti histidínovej kotvy).
 - optimalizácia heterologickej expresie a purifikácia rekombinantného 2-protrombínu v *E. coli* a jeho in vitro aktivácia pomocou proteáz





Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

- **WP1 – Výskum, vývoj a aplikácia chemických analytických metód a biosenzorov na rýchlu a včasnú diagnostiku vybraných DMP**
 - *Tandem MS pre skríning a diagnostiku DMP na Slovensku*
 - tandemová hmotnostná spektrometria sa v súčasnosti využíva jednak na selektívny skríning, jednak na celopopulačný novorodenecký skríning vybraných dedičných metabolických porúch (DMP)



Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

Novorodeneckým skríningom sa vyhľadávajú v populácii najmä:

- Poruchy metabolizmu aminokyselín a poruchy cyklu močoviny
- Poruchy metabolizmu organických kyselín – organické acidúrie
- Poruchy mitochondriovej oxidácie mastných kyselín a karnitínového cyklu
- Vyšetrenie sa robí po odbere krvi na štandardizovaný odberový papier 72 hod po narodení (novorodenecký skríning) alebo podľa potreby. Odber sa odosiela na diagnostické pracovisko väčšinou poštou



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





Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

V prípade patologického nálezu u novorodenca sa robí "recall":

1. novorodenec sa musí vyšetriť klinicky
 - a) opakovaný odber suchej kvapky krvi,
 - b) odber vzoriek ďalšieho biologického materiálu (potvrdenie alebo vylúčenie DMP a ďalšie diagnostické testy)
2. urgentná cielená terapia (na základe celého komplexu analýz pri potvrdení suponovanej DMP, niekedy aj skôr)
3. pacient sa nelieči, ak išlo pri skríningu o falošne pozitívny
 - **Prietoková tandemová hmotnostná spektrometria (FIA-MS/MS)** je štandardne používaná a nepostrádateľná metóda pre rýchlu profiláciu acylkarnitínov v suchej kvapke krvi.



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja





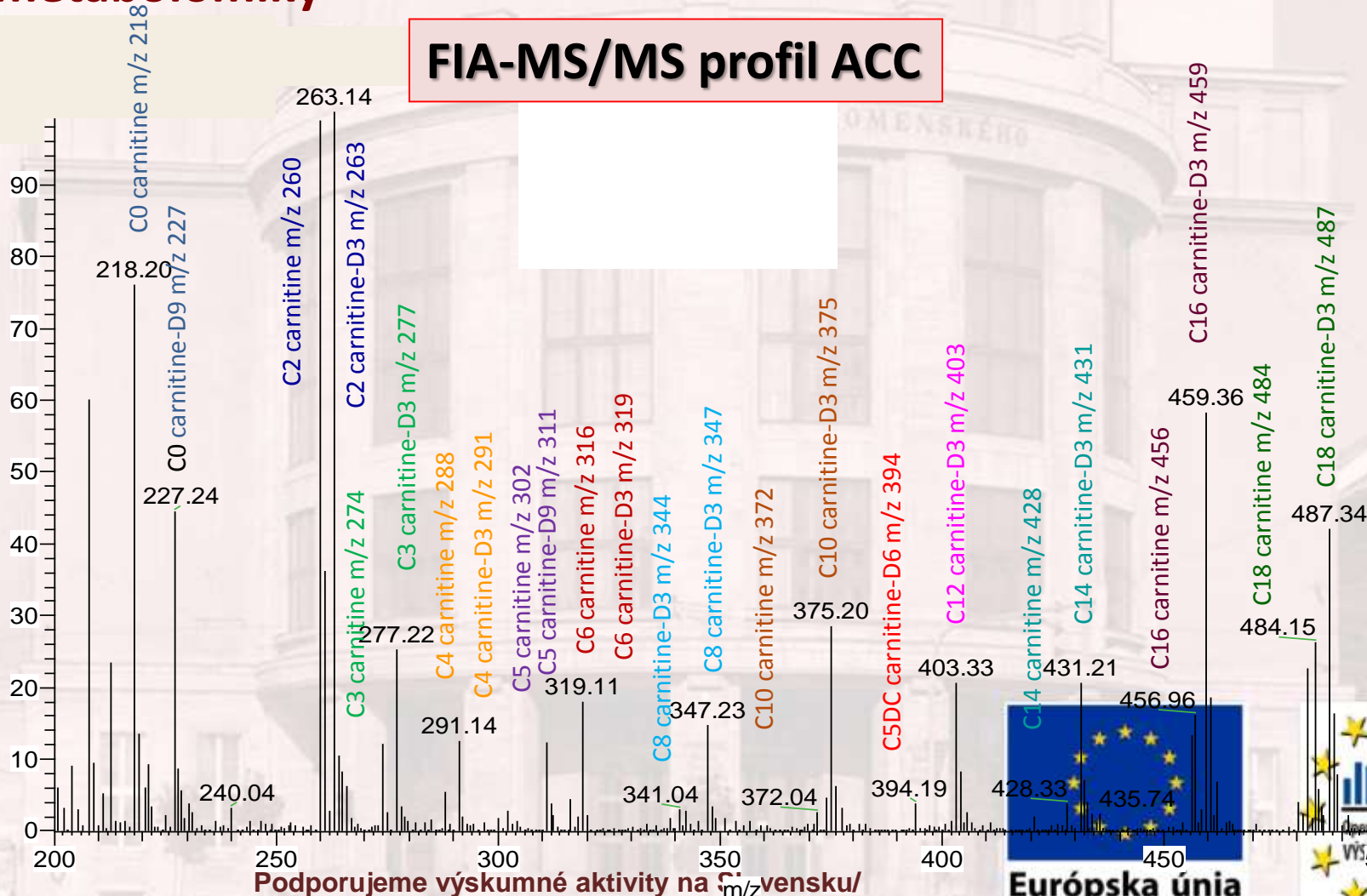
Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

- **PROBLÉM - ŠTANDARDNÝM POSTUPOM NEZISTITEĽNÉ !**
 - Rovnaký markér pre viac porúch
 - Interferencie markérov s inými látkami
- Výsledkom absencie chromatografickej separácie môžu byť významné interferencie, nejednoznačnosť ACC profilu a tým falošne pozitívne výsledky, keďže sa nerozlišujú jednotlivé izoméry ACC markérov, izobary a prípadné kontaminanty.
- **RIEŠENIE** - HPLC-MS/MS metóda umožňuje rozlíšenie jednotlivých izomérov ACC markérov a ostatných interferentov



Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

FIA-MS/MS profil ACC



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





Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

■ C3 karnitín m/z 274

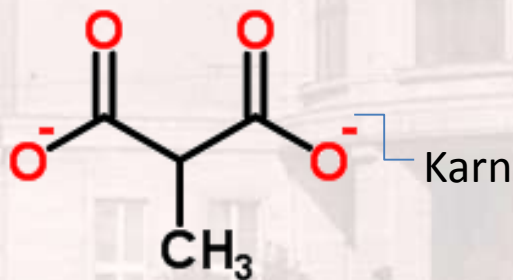
- Marker pre:
- Propionová acidúria
 - Metylmalonová acidúria

Tieto dve ochorenia sa považujú za FIA-MS/MS nerozlišiteľné.

Pri metylmalónovej acidúrii by mal byť zvýšený metylmalonylkarnitín C4DC, m/z 374

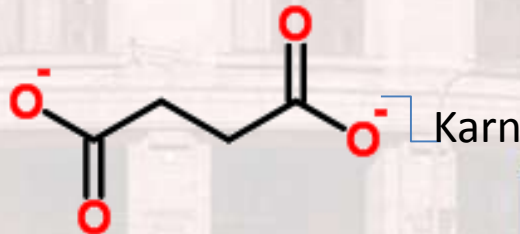
Podľa dostupných údajov nie vždy je u pacientov s MMA hodnota C4DC stanovená FIA-MS/MS zvýšená nad limit.

Metylmalonyl karnitín



m/z 374

Sukcinyl karnitín



m/z 374

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



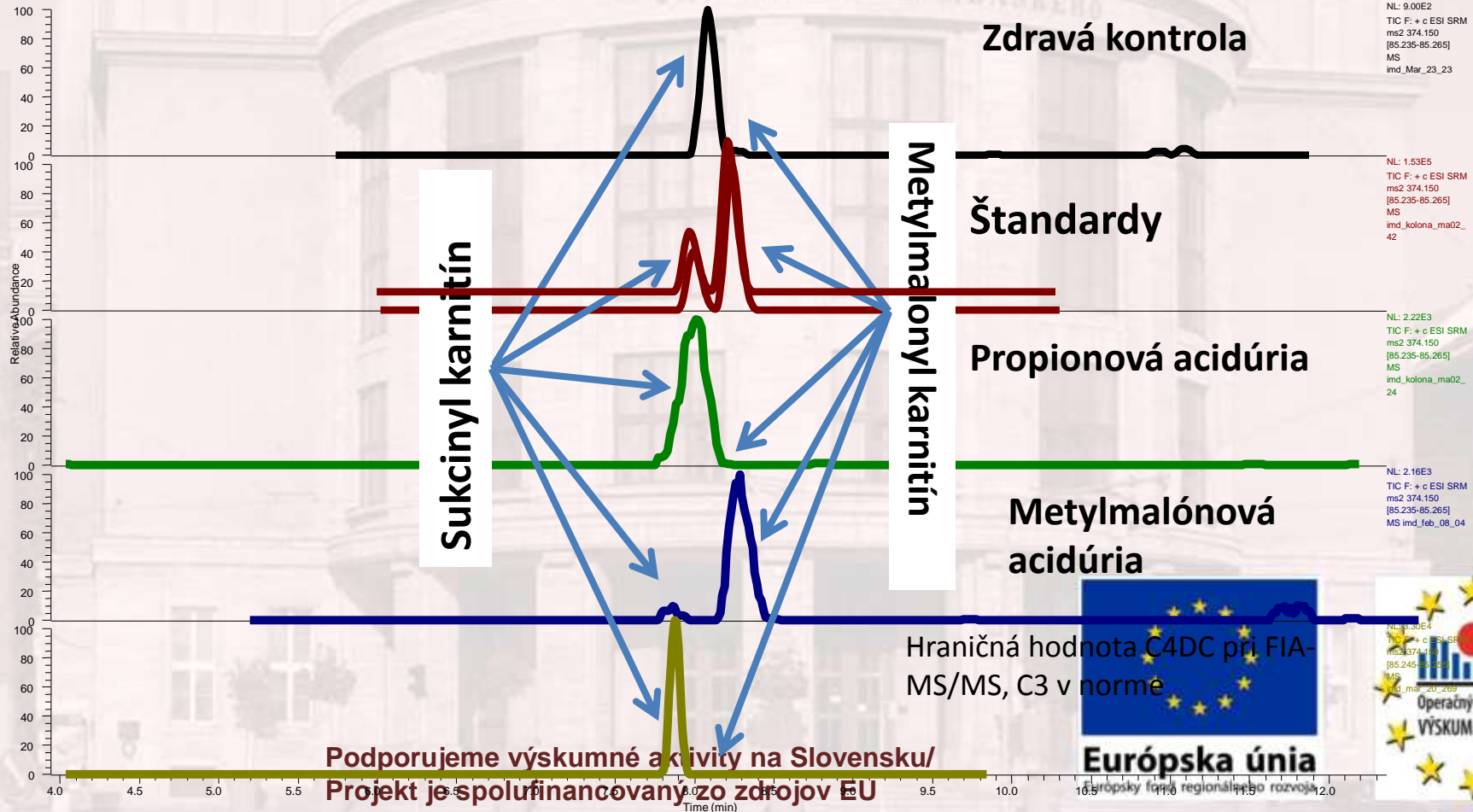


Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.3 Výskum a vývoj v oblasti metabolomiky

Sukcinylkarnitín sa vo vzorkách SKK zdravých kontrol nachádza voči metylmalonyl karnitínu v nadbytku, koncentrácia MMK je u zdravých jedincov veľmi nízka až nedetekovateľná.

HPLC-MS/MS m/z 374

RT: 3.94 - 12.36 SM: 7B



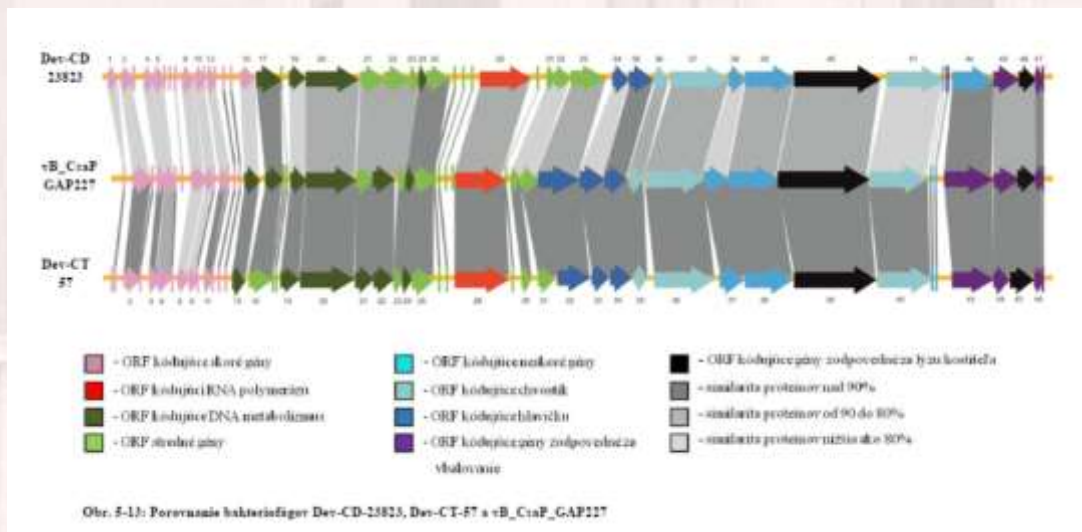
Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.4 Výskum a vývoj v oblasti bioinformatiky

Anotácia bakteriofágových genómov

Bolo sekvenovaných päť bakteriofágov infikujúcich kmene rodu *Cronobacter* a bola určená organizácia genómu.

Bola určená príbuznosť so sekvenciami genómov v databázach na úrovni DNA a proteínov.

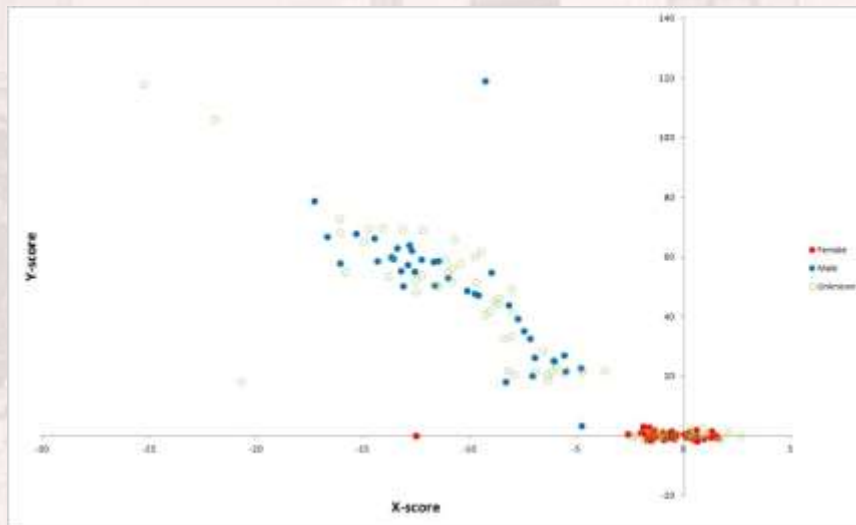
Boli určené gény zodpovedné za hostiteľskú špecificitu.



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

Dosiahnuté výsledky: Aktivita 3.4 Výskum a vývoj v oblasti bioinformatiky

- Optimalizácia neinvazívnej metódy určovania trizómie T21 na základe NGS dát
- Návrh neinvazívnej metódy určovania pohlavia plodu na základ NGS dát



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