

Triplet



Kwartalnik Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ Numer specjalny 1 /2011

Wydanie specjalne poświęcone projektowi „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”

„Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”

„Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” (BMZ) jest projektem realizowanym na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego finansowanym ze środków Unii Europejskiej (Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013). Przyznana kwota dofinansowania wynosi 28 197 842 zł. Projekt trwa od września 2008 r.

Na przedsięwzięcie składa się siedem zadań inwestycyjno-badawczych koordynowanych przez pracowników naukowych WBBiB. W ramach projektu powstaną następujące pracownie:

- Zwierzętarnia,
- Pracownia Cytometrii Obrazowej,
- Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki,
- Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkanekowej,
- Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej,
- Pracownia Biotechnologii Roślin,
- Bank Komórek.

Dzięki realizacji projektu ulepszana jest infrastruktura badawcza Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii. Światowej klasy urządzenia umożliwią wprowadzenie nowoczesnych metod badawczych, w tym:

- Opracowanie i zastosowanie nowych zwierzęcych modeli do testowania rozwoju chorób i terapii eksperymentalnych,
- Opracowanie nowych metod analizy struktury komórek i interakcji badanych substancji z komórkami,
- Stworzenie kompleksowego systemu analizy ekspresji genów na poziomie transkryptomu i proteomu,
- Rozwój metod hodowli tkankowej skóry

w celu ich zastosowania w warunkach klinicznych,

- Opracowanie i rozwój metod pozwalających na identyfikację i kwantyfikację wirusów ludzkich i zwierzęcych pod kątem ich zastosowania w warunkach klinicznych i badawczych,
- Opracowanie i badanie pochodnych metabolitów roślinnych oraz pochodnych barwników fotosyntetycznych, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

W niniejszym specjalnym numerze biuletynu „Triplet” prof. Alicja Józkowicz oraz prof. Halina Gabrys piszą o zadaniach, które koordynują w ramach BMZ – organizację nowoczesnej zwierzętarni oraz pracowni biotechnologii roślin. W ostatnim kwartale to te pracownie najbardziej zaangażowały zespół zarządzający projektem. Koordynatorzy pozostałych zadań opowiadają o tym, co aktualnie odbywa się w ich pracowniach. Piszemy również o grantach, które obecnie realizują pracownicy Wydziału z użyciem aparatury badawczej zakupionej w ramach BMZ.

Zapraszamy do lektury biuletynu, a także odwiedzenia strony internetowej projektu: <http://bmz.wbbib.uj.edu.pl/>

Magdalena Jagła

SPIS TREŚCI

Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia

Zwierzętarnia

Pracownia Biotechnologii Roślin

Pracownia Cytometrii Obrazowej

Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki

Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkanekowej

Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej

Bank Komórek

Granty badawcze

Podsumowanie kosztów projektu

Zespół koordynujący projekt

Kontakt



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

Projekt Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia (POIG.02.01.00-12-064/08) jest współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



ZWIERZĘTARNIA



Pomieszczenia zwierzętarni przed rozpoczęciem prac



Korytarz w zwierzętarni



Pomieszczenia do hodowli zwierząt – strefa hodowlana



Pomieszczenia do hodowli zwierząt – strefa doświadczalna

W kwietniu zakończyły się prace budowlane w zwierzętarni. Dostarczono również ostatnie elementy konstrukcyjne – sterylizatory przelotowe, myjnię automatyczną i laminar z oknem podawczym. Na początku maja odbył się odbiór techniczny, powiązany z uzyskaniem pozytywnej opinii Sanepidu i wszystkich wymaganych organów kontrolnych. Ostatnim etapem będzie zakup klatek, przewidziany na trzeci kwartał 2011 r. Pierwsze zwierzęta zostaną wprowadzone jesienią.

Zwierzętarnia docelowo ma pozwolić na jednoczesne utrzymywanie około 8000 myszy i 250 szczurów. Zapewni również możliwość hodowli około 20 królików oraz około 100 gerbili i chomików. Zwierzęta muszą pochodzić z certyfikowanych hodowli i posiadać świadectwa zdrowia. Szczepy komercyjnie niedostępne przed wprowadzeniem do zwierzętarni będą musiały być odnowione poprzez transfer embrionów. Jest to warunek niezbędny do utrzymania reżimu sanitarnego, pozwalającego na uzyskiwanie powtarzalnych wyników, zwłaszcza w badaniach układu odpornościowego. Doświadczenia będą prowadzone przez naukowców i doktorantów odpowiedzialnych za realizację poszczególnych projektów, natomiast utrzymanie zwierząt i codzienna opieka nad nimi będzie należeć do obowiązków pracowników zwierzętarni.

Zwierzętarnia będzie obejmować 3 strefy:

- strefę hodowlaną, do której dostęp będą mieli jedynie uprawnieni pracownicy i gdzie hodowane będą unikatowe szczepy myszy i szczurów,
- strefę doświadczalną, do której możliwy będzie szerszy dostęp i w której utrzymywane będą zwierzęta do eksperymentów oraz wykonywane będą zabiegi operacyjne i analizy przyżyciowe,
- strefę techniczną obejmującą magazyn paszy i ściółki oraz zmywalnię i sterylizatornię.

Cała zwierzętarnia prowadzona będzie w systemie IVC (*Individually Ventilated Cages* – klatek indywidualnie wentylowanych), zapewniającym sterylne warunki utrzymania zwierząt, w tym także szczepów z niedoborami odporności. Wyposażona będzie również w stację wymiany klatek, stację usuwania ściółki i komory laminarne, pozwalające na prowadzenie wszystkich prac związanych z hodowlą i utrzymaniem zwierząt w warunkach sterylnych, zapewniających bezpieczeństwo zarówno zwierzętom jak i pracownikom.

Jedynie pomieszczenia, w których zwierzęta będą opuszczały sterylne klatki to pokój zabiego-

wy i analityczny. Oba pokoje zaopatrzone są w lampy UV oraz wysokowydajne filtry HEPA na kanałach wentylacyjnych zarówno doprowadzających jak i odprowadzających, co zapewnia utrzymanie sterylnych warunków. W zwierzętarni przygotowane będą także stanowiska do anestezji i eutanazji zwierząt oraz do perfuzji narządów, zaopatrzone w pochłaniacze szkodliwych oparów. Będzie to jak dotąd jedyna w Polsce zwierzętarnia doświadczalna o tak wysokim standardzie.

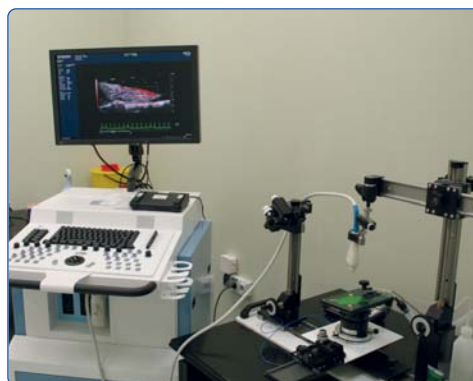
Pokój zabiegowy zaopatrzony będzie w zestaw do anestezji, stół operacyjny i stoliki o podgrzewanej powierzchni, mikroskop operacyjny, narzędzia chirurgiczne, weterynaryjny analizator hematologiczny i biochemiczny, komorę laminarną, inkubator CO₂, mikroskop i urządzenia niezbędne do izolacji tkanek i zakładania hodowli komórkowych. Znajdować się w nim będzie również system Langendorffa do badań na izolowanym sercu gryzoni. Możliwe będzie więc monitorowanie stanu zdrowia zwierząt, przeprowadzanie dowolnych operacji mikrochirurgicznych u myszy lub szczurów oraz pobieranie tkanek i zakładanie hodowli komórek pierwotnych. Hodowle będą mogły być kontynuowane w zwierzętarni lub przenoszone do laboratoriów do dalszych analiz.

Pokój analityczny wyposażony będzie w unikatowy ultrasonograf Vevo-2100 o wysokiej rozdzielczości, system do przyżyciowej detekcji luminescencji i fluorescencji oraz przepływomierz dopplerowski. Sprzęt ten przeznaczony jest do różnorodnych zastosowań, w tym do badań wzrostu i przerzutowania nowotworów, monitorowania funkcji serca i dużych naczyń krwionośnych, rozwoju miażdżycy, poziomu perfuzji tkanek, struktury narządów, rozwoju embrionów, badań nad komórkami macierzystymi etc. Pozwoli to na wykonywanie doświadczeń zespołom Wydziału pracującym na modelach zwierzęcych oraz na podejmowanie współpracy z innymi jednostkami badawczymi i firmami farmaceutycznymi lub biotechnologicznymi. Serdecznie zapraszamy!

Prof. dr hab. Alicja Józkowicz



Autoklaw



Ultrasonograf Vevo-2100



Odbiór techniczny zwierzętarni

Zespół biorący udział w realizacji inwestycji



PRACOWNIA BIOTECHNOLOGII ROŚLIN



Pracownia Biotechnologii Roślin



Chromatograf gazowy



System do obrazowania żeli



Detektor radioaktywności

Dzięki funduszom przyznanych na realizację projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” zespół Zakładu Biotechnologii Roślin utworzył dwie profesjonalnie wyposażone pracownie do badań molekularnych kwasów nukleinowych i białek roślinnych. Oprócz podstawowego sprzętu umożliwiającego pracę technikami biologii molekularnej zakupiono strzelbę genową (Helios Gene Gun System BioRad) oraz system do dokumentacji obrazu (BioSpectrum, UVP). Strzelbę genową zespół wykorzystuje głównie do transformacji przejściowej metodą biolistyczną, system BioSpectrum do dokumentacji wyników doświadczalnych wykonywanych technikami wykorzystującymi chemiluminescencję oraz fluorescencję barwników i białek markerowych. W szczególności używany jest do analizy żeli poliakrylamidowych, na których rozdzielane są białka roślinne metodą elektroforezy dwukierunkowej, oraz do wszelkiego typu analiz metodą *Western blotting*.

Badania zespołu pracującego w Zakładzie Biotechnologii Roślin prowadzone są w dwóch głównych kierunkach. Pierwszym są mechanizmy przekazywania sygnałów świetlnych i wzajemne oddziaływania ścieżek przekazu sygnału pochodzących od różnych bodźców w roślinach wyższych, drugim – mechanizmy naprawy i replikacji DNA ze szczególnym uwzględnieniem roli w tym procesie białka PCNA.

PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, jądrowy antygen dzielących się komórek) jest podstawowym białkiem każdego żywego organizmu eukariotycznego, którego brak w początkowych etapach rozwoju powoduje śmierć organizmu. Białko to jest zaangażowane między innymi w regulację cyklu komórkowego, replikację genomowego DNA oraz w procesy jego naprawy. Choć PCNA jest białkiem o dużym znaczeniu dla organizmów eukariotycznych, wciąż niewiele wiadomo na temat jego funkcji w roślinach, w szczególności nie wiadomo jaką rolę pełni ono w regulacji cyklu komórkowego. Jednym z celów wykonywanych badań jest udzielenie odpowiedzi na pytanie, które z białek roślinnych regulujących cykl komórkowy oddziałują z PCNA. W tym celu zespół stosuje metodę BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) z wykorzystaniem transformacji przejściowej. Do transformacji roślin stosuje się konstrukty, w których badane geny są sfuzjowane z genami kodującymi połowę białka reporterowego, GFP. Pojawienie się fluorescencji oznacza, że doszło do oddziaływań pomiędzy białkami.

Obecnie zakończono badania nad wpływem warunków świetlnych i wieku roślin na ekspresję genów kodujących fotoreceptory światła niebieskiego. Celem tych badań było określenie wpływu innych fotoreceptorów aktywnych w roślinach, fitochromów i kryptochromów oraz samych fototropin na poziom ich mRNA. W eksperymentach tych stosowano m.in. metodę ilościowego RT-PCR w czasie rzeczywistym. Podobny cykl badań wykonano dla genów kodujących dwie chlorofilazy roślinne, enzymy zaangażowane w katabolizm chlorofilu działające zwłaszcza w warunkach stresowych i podczas starzenia się roślin. Po raz pierwszy wykazano, że poziom mRNA tych genów regulowany jest przez światło.

Innym zadaniem badawczym jest określenie udziału fototropin w regulacji kwitnienia u *Arabidopsis*. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują na pełnienie przez fototropinę1 nowej roli w fotoperiodycznej kontroli kwitnienia. Używana jest także metoda transformacji przejściowej do badań aktywności białek sygnałowych w komórkach roślinnych poddanych działaniu światła o różnym składzie spektralnym. W szczególności monitorowana jest aktywność fosfolipazy C, enzymu działającego w fosfoinozytydowym szlaku sygnałowym przy zastosowaniu jako biosensor GFP-PH (domena $\delta 1$ fosfolipazy C wiążąca PIP2 (4, 5-difosforan fosfatydyloinozytolu) sfuzjowana z GFP). Obserwacje fluorescencji GFP pojawiającej się w komórkach liści *Nicotiana benthamiana* na skutek przejściowej ekspresji biosensora w mikroskopie konfokalnym dostarczają informacji o zmianach aktywności enzymu.

Zespół prowadzi także nowatorskie badania dotyczące sumoilacji PCNA oraz fototropin. SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modifiers*) są białkami podobnymi do ubikwityny, które mogą potranslacyjnie i odwracalnie modyfikować różne białka docelowe. Stosowany model doświadczalny to szlak sumoilacji *Arabidopsis* zrekonstruowany w *E. coli*. Celem eksperymentów jest ustalenie, które izoformy SUMO są odpowiedzialne za modyfikacje badanych białek. Ponadto identyfikowane są miejsca sumoilacji przy zastosowaniu m.in. mutagenyzy ukierunkowanej w obrębie miejsc potencjalnie rozpoznawanych przez SUMO. Planowane są również doświadczenia mające na celu ustalenie fizjologicznej roli tej modyfikacji w funkcjonowaniu badanych białek.

Powyższe badania były/są finansowane z kilku grantów krajowych i europejskich:

- zakończonych w 2010 r. grantów MNiSW „Wpływ światła na układ aktomiozyny aktywny w ruchach chloroplastów” i „Czynniki warunkujące ekspresję i aktywność chlorofilazy”;
- projektów realizowanych obecnie: i) ITN 7 Programu Ramowego UE „Chloroplast Signals” (COSI) oraz grantu towarzyszącego „Sygnały z chloroplastów” – rola wapnia i szlaku fosfatydyloinozytydowego w odpowiedzi chloroplastów na sygnał świetlny, ii) grantu MNiSW „Analiza molekularna PCNA *Arabidopsis thaliana*” – charakterystyka modyfikacji potranslacyjnych białek AtPCNA (m.in. sumoilacja i ubikwitynacja), analiza wpływu czynników mutagennych na ekspresję tych genów, ocena wpływu wyłączenia genów AtPCNA na procesy naprawy i replikacji DNA, iii) Luventus Plus (MNiSW) „Analiza sieci oddziaływań pomiędzy roślinnym białkiem PCNA a wybranymi białkami zaangażowanymi w regulację cyklu komórkowego u roślin” – z wykorzystaniem metody BiFC,
- rozpoczynającego się w listopadzie programu LIDER z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju – poszukiwanie inhibitorów białka oddziałujących z PCNA, mogących mieć potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Prof. dr hab. Halina Gabryś



Spektrofotometr



Transformacja roślin za pomocą strzelby genowej



Spektrofotometr



Autoklaw poziomy

PRACOWNIA CYTOMETRII OBRAZOWEJ

W Pracowni Cytometrii Obrazowej prowadzone są badania struktury i funkcji jądra komórkowego oraz badania struktury macierzy zewnątrzkomórkowej, z wykorzystaniem mikroskopów konfokalnych Leica SP5/STED oraz Leica SMD (FLIM/FCS).

Trwają prace nad optymalizacją metody wywoływania lokalnych uszkodzeń chromatyny, z wykorzystaniem wiązki światła widzialnego, bez użycia fotouczulaczy. Metoda ta posłuży do badania rekrutacji białek naprawczych, zaangażowanych w procesach naprawy uszkodzeń oksydacyjnych i pęknięć nici DNA. Prowadzone są badania fotokonwersji barwników wykazujących powinowactwo do DNA. Ich celem jest wykorzystanie fotokonwersji barwników do opracowania nowej techniki wizualizacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA z wykorzystaniem nowych metod mikroskopii fluorescencyjnej.

Kontynuowane są badania mechanizmu powstawania uszkodzeń DNA wywoływanych przez leki, jak kamptotecyna, topotekan i mitoksantron oraz promieniowanie UV oraz nadtlenek wodoru. Eksperymenty skupiają się na badaniu uszkodzeń, które powstają w rejonie widełek replikacyjnych. Po za tym trwają badania roli heterochromatynowego białka 1 (HP1) w procesie naprawy różnych typów uszkodzeń chromatyny, w tym uszkodzeń oksydacyjnych oraz pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA. Zakończono badania nad mechanizmem wiązania pyroniny Y do DNA i RNA, w tym badania zjawiska wygaszania fluorescencji pyroniny Y związanej z RNA w jąderkach utrwalonych komórek.

Trwają również badania oddziaływania między lekami, które wykazują powinowactwo do DNA, a chromatyną żywych komórek. Badany jest mechanizm molekularny zmian struktury chromatyny wywołanych czynnikami wiążącymi się w małym rowku DNA i interkalującymi pomiędzy zasady azotowe. W tym projekcie badawczym znajdzie również zastosowanie technika detekcji i wizualizacji położenia pojedynczych fluoryzujących molekuł.

Rozpoczęto badania dynamiki histonu łącznikowego H1 w różnych fazach cyklu podziałowego i w komórkach traktowanych lekami. Trwają również badania struktury macierzy zewnątrzkomórkowej z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Col-F, w tym badania kolagenu w ścianach naczyń krwionośnych.

Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki

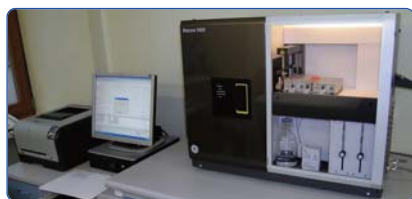


Mikroskop konfokalny Leica SMD (FLIM, FCS)

PRACOWNIA PROTEOMIKI I TRANSKRYPTOMIKI

W Pracowni Proteomiki i Transkryptomiki do czerwca 2011 r. prowadzone były następujące główne rodzaje badań.

Metodą pomiarów rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) za pomocą urządzenia Biacore 3000, przy współpracy Zakładu Biochemii Analitycznej z Zakładem Biotechnologii Roślin (dr Wojciech Strzałka) uzupełniono porównawczą charakterystykę oddziaływania białka AtPCNA (*Arabidopsis thaliana Proliferating Cell Nuclear Antygen*) i jego mutantu z fragmentem At-SCE (*a SUMO conjugating enzyme*), warunkującym funkcjonalność procesu sumoilacji białka. Maszynopis zawierający wyniki tych badań wysłany został do druku. We współpracy z Zakładem Mikrobiologii (dr Grzegorz Dubin) podjęto próbę charakterystyki wiązania peptydów centrum wiążącego białka p53 i jego analogów z białkiem Mdm – dzikim i mutantem. W sposób ciągły prowadzone są badania nad makromolekularnymi oddziaływaniami w układzie generacji bioaktywnych peptydów prozapalnych – kinin, stanowiące jeden z głównych nurtów zainteresowań badawczych Zakładu Biochemii Analitycznej (dr Maria Rapała-Kozik, mgr Marta Kujda). Ostatnie z tych analiz polegały na wyznaczeniu stałych kinetycznych i termodynamicznych dla oddziaływania białka



Urządzenie do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym BIACORE 3000

łek układu kontaktu: wielkocząsteczkowego kininogenu (HK) i prekalikreiny oraz identyfikacji i wstępnej charakterystyce wiązania mieloperoksydazy przez HK. Najnowszym nurtem zastosowań tej metody są prowadzone we współpracy z Zakładem Biochemii Fizycznej (dr Andrzej Górecki, mgr Filip Gołębiowski) badania wpływu sekwencji aktywatorowych, represorowych i inicjatorowych DNA na strukturalne zmiany w wybranych domenach czynnika transkrypcyjnego Yin Yang 1.

Spektrometr masowy HCT ultra (Bruker), ze źródłem jonów typu ESI i pułapką jonową jako analizatorem używany jest w podstawowych analizach z zakresu chemii białek i peptydów w głównych nurtach badawczych Zakładu Biochemii Analitycznej. Ostatnie z tych analiz dotyczyły fragmentacji kininogenów i generacji kinin przez główną proteinazę sekrecyjną Sap2 patogennych drożdży *Candida albicans* (mgr Oliwia Bocheńska, mgr Grażyna Braś). Obecnie przygotowujemy maszynopis publikacji zawierający wyniki tych badań. Metodę tę zastosowano również w celach identyfikacji peptydów antybakteryjnych (dr hab. Paweł Mak, Zakład Biochemii Analitycznej) oraz jako część podstawowej charakterystyki pochodnych chlorofilu, syntetyzowanych w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin (dr hab. Leszek Fiedor). Kontynuowana jest ponadto współpraca z Zakładem Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin (dr Dariusz Dziga) w zakresie charakterystyki toksyn sinicowych oraz z Zakładem Mikrobiologii (dr Tomasz Kantyka) w zakresie analizy procesu cytrulinyacji peptydów antybakteryjnych.

Zestaw do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej (Laser Microdissection System, LMD 7000, Leica) jest wykorzystywany do analizy struktur komórkowych z preparatów mrożeniowych i parafinowych. Jednym z realizowanych obecnie projektów jest próba określenia fenotypu transplątowanych komórek macierzystych w obrębie mięśnia sercowego po zawale u świni (badania te prowadzą prof. dr hab. Józef Dulak, prof. dr hab. Alicja Józkowicz, mgr Krzysztof Szade z Zakładu Biotechnologii Medycznej we współpracy z prof. Michałem Tenderą i dr hab. Wojciechem Wójcikiem ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego). Ponadto, dr Agnieszka Łoboda we współpracy z prof. Elżbietą Pyzą i mgr Mileną Damulewicz z Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi zajmuje się izolacją odpowiednich struktur z płatu wzrokowego *Drosophila melanogaster* – badania te mają na celu m.in. analizę ekspresji genów regulujących rytm okołodobowy.

Prof. dr hab. Andrzej Kozik, Dr Agnieszka Łoboda



Ultrawirówka Sorvall WX Ultra Series, Thermo Scientific



Zestaw do mikroskopowej mikropreparatyki laserowej

PRACOWNIA INŻYNIERII KOMÓRKOWEJ I TKANKOWEJ

Obecnie w Pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej ZBK WBBiB UJ realizowane są cztery projekty badawcze. Grant z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nosi nazwę „Aplikacja kliniczna autologicznych komórek skóry ludzkiej w leczeniu oparzeń z wykorzystaniem matrycy skóry właściwej *Integra DRT* – analiza procesów regeneracyjnych z wykorzystaniem modelu *in vitro*”. Następnie, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka zespół realizuje projekty pn. „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie – Zbadanie roli i właściwości biologicznych komórek VSEL w regeneracji skóry” oraz „Zastosowanie pochodnych poliiizoprenoidów jako nośników leków i regulatorów metabolizmu”.

W pracowni realizowany jest również grant międzynarodowy finansowany przez MNiSW: „Białko MCPIP w regulacji różnicowania i procesów zapalnych keratynocytów”. W projektach tych wykorzystywane są hodowle komórek izolowanych ze skóry ludzkiej zarówno do badań podstawowych, a także do przewidzianych w tych projektach prób klinicznych.

Dr Justyna Drukała



Pomieszczenie pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej



Inkubator CO₂

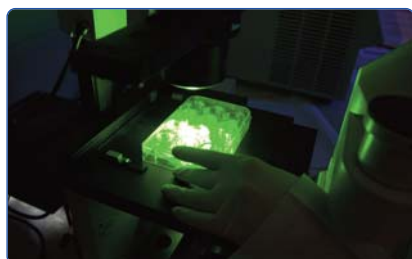
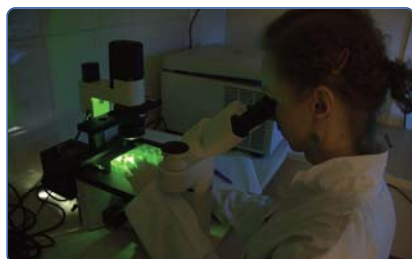
PRACOWNIA WIRUSOLOGICZNEJ DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

Realizacja projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” pozwoliła na utworzenie w pełni wyposażonej pracowni wirusologicznej, której prace dotyczą zakażeń dróg oddechowych u ludzi, jak również opracowania nowych testów diagnostycznych. Prowadzone obecnie badania koncentrują się na różnych aspektach mechanizmu i patogenezы zakażeń wirusowych.

Infekcja wirusowa w kontekście zakażeń bakteryjnych. Badania skupiają się na wpływie zakażenia wirusowego na późniejszą infekcję bakteryjną (m.in. w kontekście adhezji bakterii, produkcji czynników pro- i antyzapalnych, modyfikacji profilu ekspresji białek powierzchniowych na zakażonych komórkach), jak również wpływu zakażenia bakteryjnego na późniejszą infekcję wirusową (m.in. proteolityczna aktywacja białek fuzyjnych). Badania prowadzone są z wykorzystaniem hodowli w pełni zróżnicowanego nabłonka dróg oddechowych. Model ten jest unikatowy, ponieważ pozwala na analizę patogenów w kontekście środowiska naturalnego. Obecnie jesteśmy jedyną grupą w Polsce dysponującą takim modelem, jak również jedną z nielicznych grup na świecie.



Szalka do hodowli komórkowych



Mikroskopia fluorescencyjna w analizie zakażeń wirusowych

Opracowanie nowych metod diagnostyki zakażeń wirusowych. Badania te mają na celu opracowanie nowych metod identyfikacji znanych patogenów wirusowych, związanych z zakażeniami układu oddechowego u ludzi, w oparciu m.in. o PCR, real-time PCR, jak również PCR w warunkach izotermicznych z wykorzystaniem polimerazy o aktywności helikazy. Ponadto, we współpracy z licznymi grupami badawczymi z kraju i zagranicy, trwają ciągłe badania mające na celu identyfikację nowych patogenów wirusowych. W tym przypadku wykorzystywane są autorskie metody, takie jak VIDISCA czy HexaPrime.

Mechanizm zakażenia ludzkimi koronawirusami. Badania dotyczą identyfikacji mechanizmu wejścia wirusów do komórek eukariotycznych. Trwają prace nad systemem ekspresji białek wirusowych odpowiedzialnych za rozpoznanie receptora oraz fuzję z błoną komórkową, co pozwoli na identyfikację białek odpowiedzialnych za kolejne etapy zakażenia, jak również na identyfikację receptorów komórkowych dla ludzkich koronawirusów.

Stworzenie nowego wektora onkolitycznego. W ramach programu LIDER z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju rozpoczynają się prace, których celem będzie stworzenie wektora w oparciu o genom wirusowy, który pozwoli na opracowanie skutecznej i bezpiecznej terapii przeciwnowotworowej.

Ponadto, w ramach pracowni realizowane są dwa projekty finansowane ze środków MNiSW (program Luventus Plus pn.: „Mechanizm zakażenia wirusami HCoV-NL63 oraz HCoV-HKU1” i grant własny „HexaPrime: Nowa metoda identyfikacji wirusów RNA”) oraz projekt realizowany ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (program HOMING pn.: „Wpływ zewnątrzkomórkowych proteaz bakteryjnych na infekcję wirusową”).

Dr Krzysztof Pyrc

BANK KOMÓREK

Bank komórek



W ramach projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” został utworzony nowoczesny bank komórek. Będą w nim przechowywane komórki skóry pacjentów, które następnie zostaną wykorzystane w trakcie leczenia oparzeń. Komórki ludzkie są hodowane w Pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej WBBiB. Wykorzystuje się je w badaniach podstawowych i zastosowaniach klinicznych.

GRANTY BADAWCZE REALIZOWANE Z UŻYCIEM APARATURY ZAKUPIONEJ W RAMACH PROJEKTU „BIOTECHNOLOGIA MOLEKULARNA DLA ZDROWIA”

Dr Agnieszka Łoboda z Zakładu Biotechnologii Medycznej otrzymała grant z konkursu POMOST z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na realizację projektu zatytułowanego „Significance of apolipoprotein E polymorphism in regenerative medicine”. Projekt będzie realizowany przez 3 lata, a wysokość finansowania wynosi 560 000 zł. W ramach projektu dr Łoboda z grupą badawczą zajmą się określeniem roli polimorfizmu genu apolipoproteiny E (ApoE) w gojeniu ran, ze szczególnym uwzględnieniem roli miRNA oraz progenitorowych komórek śródbłonna.

Realizacja projektu będzie możliwa dzięki wykorzystaniu wielu metod (np. izolacji progenitorowych komórek śródbłonna, tzw. EPCs i pierwotnych keratynocytów czy identyfikacji specyficznych miRNA w ranie) oraz nowoczesnej aparatury, zakupionej m.in. ze środków projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. Jednym z nich będzie system do mikrodysekcji laserowej (Laser Microdissection LMD7000 Leica), który posłuży do analizy preparatów ze skóry (zdrowej i zranionej), do wycinania komórek z wybranych obszarów skóry i do określania w nich ekspresji genów.

Projekt będzie realizowany przy współudziale dwóch ośrodków zagranicznych. Optymalizacja wykorzystania systemu do mikrodysekcji laserowej będzie wykonywana w kooperacji z prof. Grietje Molema (Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen, Holandia), natomiast charakterystyka komórek EPCs w warunkach niedotlenienia będzie możliwa dzięki współpracy z prof. Lorenzem Poellingerem (Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institut, Sztokholm, Szwecja).



Dr Aneta Kasza z Zakładu Biochemii Komórki otrzymała grant z konkursu POMOST z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na wykonanie projektu zatytułowanego „Regulacja aktywności proteolitycznej w ośrodkowym układzie nerwowym”. Projekt będzie realizowany przez 3 lata. Wysokość finansowania wynosi 686 000 zł. Celem projektu jest wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw regulacji czasu półtrwania transkryptów białek zaangażowanych w regu-

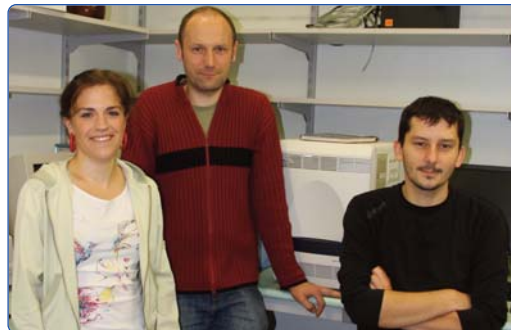
lację aktywności proteolitycznej w ośrodkowym układzie nerwowym.

Realizacja projektu będzie możliwa dzięki wykorzystaniu między innymi aparatu do PCR w czasie rzeczywistym firmy Applied Biosystem 7500 oraz banku komórek (zakupione ze środków projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”).

Projekt będzie realizowany przy współudziale grupy prof. Tomasza Korduli z Virginia Commonwealth University, School of Medicine, USA.



Dr Grzegorz Dubin z Zakładu Mikrobiologii otrzymał w 2010 r. grant w ramach programu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt obejmuje realizację przedsięwzięcia pt. „Terapia przeciwnowotworowa przyszłości – poszukiwanie niskocząsteczkowych aktywatorów szlaku białka p53”. NCBiR w ramach projektu finansuje koszty badań i zatrudnienia pracowników naukowych w okresie trzech lat na łączną kwotę miliona złotych. W ramach projektu poszukiwane są aktywatory szlaku białka p53 zdolne do wiązania i hamowania funkcji jego głównych negatywnych regulatorów, których nadekspresja jest udokumentowana w szeregu komórek nowotworowych.



Dr Grzegorz Dubin (w środku) z zespołem

Z uwagi na duże zróżnicowanie grupy chorób proliferacyjnych, jaką stanowią nowotwory najcenniejszymi celami dla rozwoju nowych terapii są elementy wspólne dla szeregu nowotworów. Taki właśnie uniwersalny cel molekularny stanowi szlak białka p53. W większości komórek nowotworowych obserwujemy inaktywację szlaku p53. W modelach zwierzęcych i wstępnych badaniach klinicznych wykazano,



Dr Agnieszka Łoboda

że przywrócenie funkcjonalności tego szlaku powoduje regresję nowotworów. Dlatego w projekcie są wykorzystywane nowoczesne metody wysokoprzepustowej selekcji ligandów celem identyfikacji molekuł zdolnych do reaktywacji szlaku p53 w komórkach nowotworowych. Aktywność wyselekcjonowanych cząsteczek jest testowana w różnorodnych modelach laboratoryjnych celem wyboru najlepszych kandydatów do dalszego rozwoju. Wydatną pomoc w realizacji projektu zapewnia m.in. dostęp do nowoczesnej aparatury zakupionej w ramach projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. Obecnie w projekcie szeroko wykorzystywane jest urządzenie do real-time PCR oraz termocyklery pozyskane z funduszy BMZ. Ponadto w niedalekiej przyszłości planowane jest wykorzystanie systemu Biacore, który posłuży do szczegółowej charakterystyki oddziaływania opracowywanych w projekcie związków z białkami docelowymi.



Sorter komórek

Dzięki projektowi „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” został zakupiony automatyczny sorter magnetyczny AUTOMACS do **Zakładu Immunologii** Wydziału BBiB UJ. Urządzenie to jest wykorzystywane między innymi do izolacji plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (pDC) z ludzkiej krwi obwodowej. Pomimo tego, że pDC stanowią mniej niż 1% we frakcji jednojądrzastych komórek krążących, sugeruje się, że pełnią kluczową rolę w odpowiedzi przeciw-wirusowej oraz chorobach autoimmunizacyjnych. Analiza pDC jest przedmiotem projektu TEAM/2010-5 sponsorowanego przez FNP ze środków europejskich. Grant jest kierowany przez dr hab. J. Cichy z Zakładu Immunologii. Więcej informacji o projekcie TEAM można znaleźć na stronie:

<http://chemeryna.wbbib.uj.edu.pl/>



Tematyka, która od kilku lat jest przedmiotem zainteresowania **dr Wojciecha Strzałki** związana jest z roślinnym białkiem PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Początkowo badania prowadzone przez zespół dr Strzałki dotyczyły poszukiwania genów PCNA-podobnych, analizy właściwości białek kodowanych przez te geny oraz wyjaśniania ich roli. Dzięki stypendium Europejskiej Fundacji Canona we współpracy z Uniwersytetem w Osace po raz pierwszy zespół rozwiązał strukturę przestrzenną białek PCNA1 oraz PCNA2 z *Arabidopsis thaliana*. Poznanie struktury białek AtPCNA jest podstawą



Dr Wojciech Strzałka

do poszukiwania przyczyn ich odmiennej roli w naprawie DNA, która została wykazana w ostatnich latach.

Oprócz badań koncentrujących się na roli PCNA w komórkach roślinnych, zainteresowania dr Strzałki skierowane są również na praktyczne wykorzystanie białka PCNA do walki z nowotworami. Dzięki przyznanemu grantowi w ramach programu LIDER finansowanemu przez narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) zostanie utworzona grupa badawcza, która będzie próbowała uzyskać niskocząsteczkowe inhibitory ludzkiego białka PCNA oraz ocenić możliwości ich wykorzystania jako uniwersalnego i skutecznego leku przeciwnowotworowego. Udział PCNA m.in.: w procesach replikacji DNA, naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego, powoduje, że białko to jest niezbędne dla każdej komórki ulegającej podziałom, a więc także każdej komórki rakowej. Z uwagi na funkcje pełnione przez PCNA, białko to wydaje się być atrakcyjnym i uniwersalnym celem terapii przeciwnowotworowej.

Planowanym efektem końcowym projektu będzie wyselekcjonowany zestaw inhibitorów o wysokim powinowactwie do określonych regionów białka PCNA, odpowiedzialnych za oddziaływanie z czynnikami promującymi replikację DNA, naprawę DNA oraz postęp cyklu komórkowego. Projekt będzie realizowany w Zakładzie Biotechnologii Roślin z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury zakupionej z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej przyznanych w ramach projektu Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia. Uzyskane wyniki będą podstawą do przeprowadzenia dalszych badań, które w przyszłości mogą doprowadzić do praktycznego wykorzystania inhibitorów PCNA w walce z nowotworami.



Dr Krzysztof Pyrc z Zakładu Mikrobiologii otrzymał grant w ramach programu LIDER z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju na reali-

zaczę projektu „Terapia przeciwnowotworowa: otrzymanie nowego onkolitycznego wektora wirusowego”. Projekt będzie realizowany przez 3 lata, a wysokość finansowania wynosi milion zł.

Terapia onkolityczna opiera się na wykorzystaniu odpowiednio zmodyfikowanych wirusów, zdolnych do replikacji wyłącznie w komórkach nowotworowych, co prowadzi do ich zniszczenia i regresji choroby. Efektem realizacji projektu będzie stworzenie nowego wektora wirusowego, który będzie mógł być wykorzystany w leczeniu nowotworów u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem niedrobnokomórkowego raka płuca.

Realizacja projektu jest możliwa dzięki utworzeniu pracowni wirusologii oraz zakupionej aparaturze (cytometr przepływowy, aparat real-time PCR, komora laminarna II klasy bezpieczeństwa biologicznego, cieplarka CO₂, mikroskop odwrócony z opcją fluorescencji, wirówka laboratoryjna do wirowania małych objętości, wirówka laboratoryjna do wirowania średnich objętości, 4 niezależne termocyklery PCR, zestaw do elektroforezy, 2 komory do pracy z kwasami nukleinowymi, 2 chłodziarko-zamrażarki dwukomorowe (+4/-20°C), termomikser, mieszadło magnetyczne, komputer z urządzeniem wielofunkcyjnym) w ramach projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. Nowoczesne wyposażenie pracowni pozwoli na szybkie przeprowadzenie badań, uzyskanie wiarygodnych wyników oraz pracę w bezpiecznych warunkach.

W realizacji projektu ważną rolę odgrywać będą również partnerzy zagraniczni, m.in. grupa z Uniwersytetu w Północnej Karolinie (Prof. Ralph Baric oraz dr Amy Sims), których doświadczenie jest niezbędne dla realizacji planowanych badań.



Prof. Halina Gabryś, kierownik Zakładu Biotechnologii Roślin, otrzymała grant ze środków unijnych w ramach FP 7, Marie Curie Initial Training Network na realizację części projektu koordynowanego przez Uniwersytet w Wiedniu „Chloroplast Signals” (COSI) (<http://www.univie.ac.at/cosi/>). Projekt ma na celu identyfikację sieci regulatorowych kontrolujących funkcje chloroplastów w komórkach roślin wyższych, glonów i okrzemek. Zadanie badawcze zespołu prof. Gabryś poświęcone jest charakterystyce sieci sygnałów indukowanych światłem, sterujących kierunkowymi ruchami chloroplastów w komórkach liści roślin lądowych, ze



Dr Krzysztof Pyrc

szczególnym uwzględnieniem roli jonów wapniowych i szlaku fosfoinozytydów.

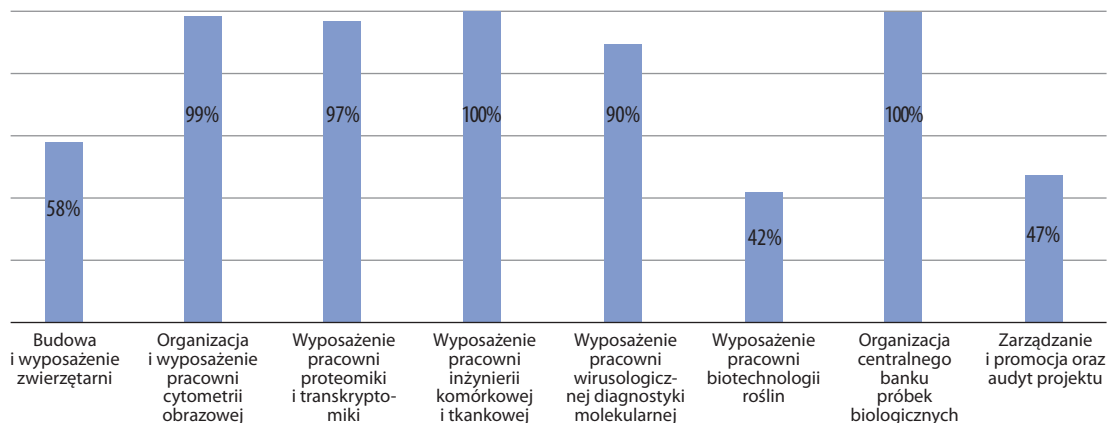
Realizacja czteroletniego projektu rozpoczęła się w lipcu 2008 r. Zespół otrzymał dofinansowanie w wysokości 162 000 euro oraz 534 000 zł (przyznane przez MNiSW). Środki otrzymane w ramach projektu „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” posłużyły do kompletnego wyposażenia dwóch pracowni roślinnych badań molekularnych: białek i kwasów nukleinowych. Dzięki temu możliwe jest prowadzenie prac z użyciem roślin transgeniczných, niezbędnego narzędzia pozwalającego na wyjaśnienie mechanizmów przekazywania sygnałów w komórkach. W tym zakresie istotnym urządzeniem zakupionym w ramach projektu jest system do analizy i dokumentacji żeli. Umożliwia on obrazowanie żeli 1- i 2-wymiarowych, barwionych zarówno barwnikami obserwowalnymi w zakresie widzialnym, jak i różnorodnymi barwnikami fluorescencyjnymi, a także rejestrację sygnałów chemiluminescencyjnych, przydatną zwłaszcza w technikach blottingu. Ponadto, zakupiono działo genowe niezbędne do przeprowadzania transformacji przejściowej, która wielokrotnie przyspiesza uzyskanie wyników w stosunku do transformacji stałej, wymagającej długotrwałych zabiegów selekcyjnych i hodowlanych. Badania prowadzone są w ramach konsorcjum, w skład którego wchodzi dziesięciu partnerów europejskich. W szczególności zespół współpracuje z grupami prof. Ute Vothknecht z Uniwersytetu w Monachium, doc. Markusa Teige z Biocentrum Uniwersytetu Wiedeńskiego, prof. Evy-Mari Aro z Uniwersytetu w Turku, oraz dr Matthew Hannah z Bayer BioScience w Gent. Przedmiotem wspólnie prowadzonych prac są badania przejściowych zmian stężenia jonów wapnia w komórce z wykorzystaniem transgenicznych roślin *Arabidopsis* z ekworyną, markerem wapnia wprowadzonym do różnych przedziałów komórkowych. Planowane są także badania z użyciem fosfoproteomiki.



Działo genowe

Podsumowanie kosztów

Do lipca 2011 r. w ramach projektu wydano 21 625 612 zł, tj. 75% całości przyznanej dotacji. Procent wykorzystanych środków według zadań przedstawiono na wykresie.



Nr zadania	Nazwa zadania	Kwota zaplanowana (PLN)	Kwota wydana (PLN)
1	Budowa i wyposażenie zwierzętarni	7 109 984,00	4 136 611,33
2	Organizacja i wyposażenie pracowni cytometrii obrazowej	7 104 829,00	7 003 296,00
3	Wyposażenie pracowni proteomiki i transkryptomiki	5 344 666,00	5 174 276,59
4	Wyposażenie pracowni inżynierii komórkowej i tkankowej	858 304,00	860 003,87
5	Wyposażenie pracowni wirusologicznej diagnostyki molekularnej	1 038 259,00	931 266,45
6	Wyposażenie pracowni biotechnologii roślin	5 013 189,00	2 127 036,15
7	Organizacja centralnego banku przechowywania próbek biologicznych	562 298,00	550 920,96
8	Zarządzanie i promocja oraz audyt projektu	1 799 228,00	842 201,31
	RAZEM	28 830 757,00	21 625 612,66

W tabeli przedstawiono stopień realizacji zadań z uwzględnieniem zaplanowanych i wydanych kwot.

Redakcja:

Martyna Elas
Józef Dulak
Magdalena Jagła
Magdalena
Tworzydło

Kontakt:

magda.jagla@uj.edu.pl

Redakcja zastrzega sobie prawo skracania i adiuścacji tekstów.

Logo:

Sebastian Szytuła

Projekt graficzny:

Klemens Knap

Skład i druk:

Quartis

Nakład: 200 egz.
egz. bezpłatny

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet
Jagielloński
Ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

Biuletyn finansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007-2013

Zespół koordynujący

prof. dr hab. **Józef Dulak** – kierownik projektu

prof. dr hab. **Alicja Józkowicz** – koordynator ds. naukowych oraz budowy i wyposażenia zwierzętarni

dr **Krzysztof Pyrc** – koordynator ds. naukowych

mgr **Piotr Widerski** – koordynator ds. finansowych

mgr **Magdalena Jagła** – specjalista ds. administracyjnych (od lutego 2011)

mgr **Aneta Pazik** – specjalista ds. administracyjnych (do lutego 2011)

dr hab. **Ryszard Gurbiel** – pełnomocnik Dziekana WBBiB UJ ds. inwestycji

Zapraszamy do odwiedzenia strony internetowej:

<http://bmz.wbbib.uj.edu.pl/>

Kontakt: Prof. dr hab. Józef Dulak

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

Tel. 012 664 63 75

E-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

