

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárova 2, 041 80 Košice

Štruktúra údajov pre výskumno-vývojovú infraštruktúru národného významu

1. Názov výskumnej infraštruktúry: **Špecializované laboratórium proteomiky**
2. Akronym: -
3. Webstránka: <http://www.upjs.sk/lekarska-fakulta/ustav/lekarska-a-klinicka-biofyzika/vyskum/>
4. Základné údaje o výskumnej infraštruktúre:
 - Doba budovania: **2009 - 2015**
 - Typ: **sústredené na jednom mieste**
 - Kontaktná osoba: **doc. RNDr. Ján Sabo, CSc., jan.sabo@upjs.sk**
 - Priemerný počet užívateľov za rok – slovenskí vedeckí pracovníci - **25**
 - Priemerný počet užívateľov za rok – zahraniční vedeckí pracovníci z iných štátov EÚ - **2**
 - Priemerný počet užívateľov za rok – zahraniční vedeckí pracovníci mimo členských štátov EÚ - **0**
 - Zoznam projektov z Operačného programu Výskum a vývoj, ktoré prispeli k vytvoreniu, resp. modernizácii výskumnej infraštruktúry:
 1. **Centrum excelentnosti pre výskum faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na skupinu marginalizovaných a imunokompromitovaných osôb (CEMIO) / 26220120058 / 748 476,00 EUR**
 2. **Budovanie infraštruktúry v centre excelentnosti (SEPO II) / 26220120039 / 849 828,00 EUR**
 3. **Centrum excelentnosti pre elektromagnetické polia v medicíne (CEEPM) / 26220120067 / 1 926 771,00 EUR**
 4. **Centrum výskumu inovatívnych terapeutických postupov molekulárnej medicíny (MOLMED) / 26220220163 / 401 976,00 EUR**
 5. **Sieť excelentných pracovísk pre onkológiu (SEPO I) / 26220120024 / 15 925,00 EUR**
 6. **Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky (BIODIAG) / 26220220143 / 290 295,00 EUR**
 7. **Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení (DIGONKO) / 26220220153 / 87 973,00 EUR**
 8. **Probiotické mikroorganizmy a bioaktívne látky prírodného pôvodu pre zdravšiu populáciu Slovenska (PROBIO) / 26220220104 / 26 398,00 EUR**
5. Podrobnejšie údaje o oblasti činnosti:
 - **Opis a predmetu činnosti**

Vedecká činnosť v špecializovanom laboratóriu proteomiky je zameraná na kompletný proteomický výskum vzoriek laboratórnych línií ľudských buniek, primárnych kultúr z tkanív pacientov, telových tekutín a tkanív pacientov. Ústav je kompletne vybavený prístrojmi pre prípravu vzoriek bunkových línií (počínajúc kultiváciou, sledovaním buniek v reálnom čase – kontrola rastu a morfológie, magnetickou separáciou buniek), rôznych telových tekutín (krv, moč, mozgovomiechový mok, sliny) ako aj tkanív (s možnosťou digitalizácie obrazov preparátov). Pri

získavaní exozómov zo vzoriek moču je využívaná ultracentrifugácia s hustotným gradientom. V súčasnosti v špecializovanom laboratóriu proteomiky sa uskutočňujú proteomické analýzy leukocytov pacientiek v štvrtom štádiu karcinómu prsníka pred chemoterapiou a po jednotlivých chemoterapeutických cykloch, ako aj ich nádorových tkanív (vzorky pochádzajú z Východoslovenského onkologického ústavu), mezenchymálnych kmeňových buniek (MKB) izolovaných z choriónovej membrány (vzorky pochádzajú z Gynekologickej kliniky LF UPJŠ), MKB izolovaných z kostnej drene pacientov s ischemickou chorobou končatín (vzorky pochádzajú z Kliniky popálenín a rekonštrukčnej chirurgie, Nemocnica Šaca a.s.), slín (vzorky pochádzajú z I Stomatologickej kliniky LF UPJŠ), trombocytov a mozgovomiechového moku suicidálnych pacientov (vzorky pochádzajú z Psychiatrickej klinika UNLP), moču pacientov infikovaných papiloma vírusom (HPV) (vzorky pochádzajú z gynekologickej kliniky UNLP), plazmy a leukocytov pacientov s reumatoidnou artritídou (vzorky pochádzajú z I. Internej kliniky UNLP) a juvenilnou artritídou (vzorky pochádzajú z Kliniky detí a dorastu LF UPJŠ). V špecializovanom laboratóriu proteomiky sa okrem klinických vzoriek súčasne sledujú aj vplyvy cytostatík a ich rôznych kombinácií na laboratórnu líniu karcinómu prsníka MCF7. Proteomická analýza získaných vzoriek je vykonávaná bottom up prístupom avšak je možný aj prístup top down pomocou MALDI TOF/TOF. Súbežne sú využívané postupy zahrňujúce dvojrozmernú gélovú elektroforézu (prípadne diferenciálnu gélovú elektroforézu) alebo viacrozmerné nanoHPLC prípadne separácie peptidov podľa ich izoelektrického bodu v roztoku a ich následná separácia pomocou nanoHPLC. Po gélovej separácii sú rozseparované proteíny zdetegované a spoty automaticky vyrezané. Identifikácia rozseparovaných proteínov je po digescii v gély vykonaná pomocou MALDI TOF/TOF MS. Druhý prístup využíva nanoHPLC separáciu prípadne 2D nanoHPLC separáciu zmesi peptidov a ich následnú detekciu pomocou MALDI TOF (online spojenie so spoterom) alebo ESI MS na hmotnostnom spektrometri iónová pasca (s možnosťou ETD fragmentácie – využívanej pri detekcii post-translačných modifikácií). Najúčinnjším využívaným proteomickým nástrojom je spojenie separačnej techniky - offgel fokusácie peptidov v roztoku (12 až 24 frakcií z jednej vzorky) nasledované separáciou na čipe (C18) a detekciou pomocou hmotnostného spektrometra s vysokým rozlíšením QTOF MS. Všetky namerané dáta sú spracované a následne archivované pomocou kompletného proteomického softvéru Proteinscape spojeného s vyhľadávacím algoritmom MASCOT (in house server). Špecializované laboratórium proteomiky sídliace na Ústav lekárskej a klinickej biofyziky LF UPJŠ taktiež spolupracuje s Technickou univerzitou v Košiciach, konkrétne s Katedrou počítačov a informatiky na Fakulte elektrotechniky a informatiky na vývoji vlastných softvérov používaných pri label free kvantifikácií proteínov a následnej vizualizácií nameraných dát.

- **Kľúčové slová charakterizujúce výskumnú oblasť**

proteomika, metabolomika, hmotnostná spektrometria, proteíny, peptidy, bunkové línie, elektromagnetické polia

- **Zdôvodnenie unikátnosti/strategickej dôležitosti pre Slovenskú republiku**

Špecializované laboratórium proteomiky je vybavené najmodernejšou prístrojovou technikou so skúseným personálom v oblasti proteomických analýz. Zberom a vyhodnotením proteomických dát zosumarizovaných analýzou krvi, moču, mozgovomiechového moku ako aj slín jednotlivých pacientov je možné vyčleniť skupinu proteínov, ktoré môžu slúžiť ako indikátory zmien organizmu v súvislosti so začínajúcim ochorením v čase, kým ešte nie sú zreteľné klinické prejavy ochorenia. Táto analýza je vhodná aj na sledovanie účinku terapie nasadenej na ochorenie na molekulárnej úrovni, čo poskytuje možnosť nastavenia liečby priamo na imunitnú odpoveď pacienta (personalizovaná medicína). Takáto liečba minimalizuje negatívne vedľajšie účinky a tým znižuje náklady na celkovú terapiu.

- **Priradenie výskumnej infraštruktúry k jednej, alebo viacerým oblastiam špecializácie z pohľadu dostupných vedeckých a výskumných kapacít RIS3 SK:**
 1. biotechnológie a biomedicína (primárna oblasť)
 2. informačno-komunikačné technológie (sekundárna oblasť)
- **Schopnosť realizovať aktivity, priradené k jednej, alebo viacerým rozvojovým tendenciám špecializácie z pohľadu dostupných VaV kapacít RIS3 SK:**
 1. technológie so zameraním na špeciálne chemické a farmaceutické substancie

6. Údaje o činnosti a o otvorenom a nediskriminačnom (open access) prístupe k jej službám

- **Zoznam a stručný popis výskumných služieb, ktoré môže poskytovať výskumná infraštruktúra:**
 - názov výskumnej služby: **Kultivácia buniek v kontrolovanej atmosfére s možnosťou kultivácie priamo pod fluorescenčným mikroskopom**
 - popis výskumnej služby:
Kultivácia buniek v kontrolovanej atmosfére s možnosťou kultivácie priamo pod fluorescenčným mikroskopom - umožňuje kultiváciu buniek a ich manipuláciu v kontrolovaných atmosférach (simulácia in vivo), typizácia buniek pomocou fluorescenčných farbív a ich online monitoring.
 - názov výskumnej služby: **Sledovanie buniek v reálnom čase**
 - popis výskumnej služby:
Sledovanie buniek v reálnom čase - umožňuje analýzu bunkovej proliferácie, kontrolu rastu buniek a zmien morfológie, pozorovanie adhézie buniek a zmien ich tvaru a analýzu cytotoxicity sprostredkovanej látkami v reálnom čase. Systém taktiež umožňuje kontinuálne sledovanie reakcií buniek na rôzne podnety meraním elektrickej impedancie.
 - názov výskumnej služby: **Systém na magnetickú separáciu**
 - popis výskumnej služby:
Systém na magnetickú separáciu - umožňuje magnetickú separáciu buniek, ideálny na separáciu buniek, bunkových organel, a molekúl mRNA rôzneho pôvodu ako animálneho, tak aj rastlinného, výnimkou nie sú ani rôzne baktérie a vírusy. Bunkový separátor je určený na separáciu buniek s vysokou čistotou.
 - názov výskumnej služby: **Multidimenzionálna (prípadne diferenciálna) gélová elektroforéza**
 - popis výskumnej služby:

Multidimenzionálna (prípadne diferenciálna) gélová elektroforéza – umožňuje separáciu proteínov v dvoch dimenziách (podľa hmotnosti a ich izoelektrického bodu) a ich izoláciu pre následnú detekciu (s možnosťou semikvantifikácie pomocou optickej hustoty).

- názov výskumnej služby: **Ultracentrifugácia**
 - popis výskumnej služby:
Ultracentrifugácia – umožňuje čistenie vzoriek, získanie exozómov z moču a zónovú centrifugáciu pomocou hmotnostných gradientov.
 - názov výskumnej služby: **Multidimenzionálna separácia pomocou kvapalinovej chromatografie s možnosťou frakcionácie vzorky**
 - popis výskumnej služby:
Multidimenzionálna separácia pomocou kvapalinovej chromatografie s možnosťou frakcionácie vzorky – umožňuje separáciu peptidov (aj proteínov) na základe rozličných interakcií v kolóne s možnosťou zakoncentrovania vzorky, jej frakcionácie a následnej online detekcie pomocou hmotnostnej spektrometrie.
 - názov výskumnej služby: **LC – MS analýza vzoriek s ESI resp. MALDI ionizáciou**
 - popis výskumnej služby:
LC – MS analýza vzoriek s ESI resp. MALDI ionizáciou – umožňuje identifikáciu izolovaných proteínov (prípadne malých molekúl – metabolitov) na základe získaných hmotnostných spektier.
 - názov výskumnej služby: **Bioinformatické spracovanie dát**
 - popis výskumnej služby:
Bioinformatické spracovanie dát – umožňuje spracovanie nameraných proteomických dát a ich vyhodnotenie, identifikácia proteínov – MASCOT, EASYPROT ako aj sledovanie vplyvu na úrovni signálnych dráh.
- **Zoznam unikátnych zariadení/funkčných celkov s kúpnu jednotkovou cenou nad 150 tisíc EUR bez DPH, ktoré sú súčasťou výskumnej infraštruktúry:**

Výskumná infraštruktúra Špecializovaného laboratória proteomiky:

- **Hmotnostný spektrometer** MALDI TOF/TOF Ultraflex extreme, Bruker, 2010 spojený so spotterom Proteiner FC II, Bruker, 2010 a nanoHPLC RSLC nano, ThermoFischer, 2005 – Prístroj umožňuje bottom up ako aj top down proteomickú analýzu ako aj MS imaging
- **Hmotnostný spektrometer** Amazon Speed ETD, Bruker, 2012 spojený s nanoHPLC RSLC nano, ThermoFischer, 2012 – Možnosť identifikácie posttranslačných modifikácií pomocou ETD fragmentácie, možnosť MSn analýzy
- **Hmotnostný spektrometer** 6538 Ultra High Definition Accurate Mass, Agilent, 2012 spojený s nanoHPLC Agilent 1260, Agilent, 2012 – Možnosť separácie peptidov na čipe a ich MS identifikáciu s vysokým rozlíšením (40 000)
- **Hmotnostný spektrometer** QQQ 6460, Agilent, 2012 spojený s HPLC Agilent 1290, Agilent, 2012 – prístroj využíva Jet Stream technológiu ionizácie, vhodný pre ultrastopové kvantitatívne analýzy

- **Invertovaný fluorescenčný mikroskop** Nikon Eclipse Ti-E, Nikon, 2014 - Prístroj disponuje fluorescenčnými filrami v rozsahu 390 - 590 nm s 1 farebnou digitálnou kamerou 5 Mpix a systémom pre získanie a spracovanie obrazu z mikroskopu, 1 monochromatickou chladenou kamerou s rozlíšením minimálne 1,5 Mpix pre pozorovanie fluorescencie, s inkubačnou komorou s definovanou atmosférou a riadiacou jednotkou.
- **Laboratórium ultracentrifugácie** – umožňuje zónovú gradientovú ultracentrifugáciu využívanú na rozdelenie analytov do frakcií na základe ich hmotnosti. Sada ultracentrifúg: stolová ultracentrifúga OPTIMA MAX-XP, Beckman Coulter, 2013 sálová ultracentrifúga OPTIMA L-100 K, Beckman Coulter, 2013, vysokorýchlostná sálová centrifúga Avanti J30L, Beckman Coulter, 2013, stolová ultracentrifúga Allegra 64R, Beckman Coulter, 2013
- **Laboratórium kultivácie buniek** – umožňuje kultiváciu a prácu s bunkami – CO2 inkubátory, HERAcell 150i, Thermo,2014, HERAcell Heraeus, 2007,laminárne boxy Telstar Cytostar 2006, Telstar Bioultra 2014, Thermo Herasafe KSP,2014, systém magnetickej separácie buniek MACs cell separation, Miltenyi Biotec, 2014, počítač buniek MUSE, Merck, 2014, systém sledovania buniek v reálnom čase xCelligence RTCA DP, ACEA Biosciences, Inc., 2014, čistič vzduch PlasmaAir T2006, Airinspace, 2014, zariadenie na digitalizáciu preparátov Panoramic desk scanner, 3dHistech, 2014,
- **Laboratórium gélovej elektroforézy** – umožňuje separáciu proteínov/peptidov na základe ich molekulovej hmotnosti a ich pI – Spotcutter EXQuest, Biorad, 2012, Laser Scanner Pharos FX, Biorad 2012, Mini PROTEAN cell, Biorad 2010, Agilent 3100 offgel fractionator, Agilent Technologies, 2014, densitometer GS-800, Biorad, 2007