

Průběžná výroční zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2115

Název projektu: Zavedení a rozvoj biochemických metod ke studiu rekombinantních enzymů a *in vitro* testování jejich modulátorů

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: RNDr. Lucie Vinklářová, doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: RNDr. Lucie Vinklářová, Mgr. Radomír Jůza

Studenti magisterského studia na PřF UHK: Mgr. Michaela Melíková, Bc. Petr Bzonek, Bc. Nikola Nováková, Bc. Anežka Novotná Bc. Eliška Chaloupková

Další výzkumní pracovníci: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D., Mgr. Monika Schmidt, Ph.D., PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D., RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D., PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 396871 Kč

Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).

Projekt specifického výzkumu se zabýval širokým spektrem metod dle zaměření diplomových a dizertačních prací zúčastněných studentů. Studenti (NMgr., Ph.D.) se zabývali tématy přípravy a testování nových sloučenin modulujících enzymy s potencionálním účinkem na nervovou soustavu.

Projekt navazuje na předchozí projekt SV (2103-2017), kde byly zavedeny metody přípravy, exprese, a purifikace rekombinantních enzymů včetně jejich testování. Tyto metody byly nyní dále rozvíjeny, optimalizovány a použity v přípravě a testování dalších enzymů. V současné době jsou úspěšně připraveny tyto enzymy: 17 β -HSD10 (ABAD), 17 β -HSD1, 17 β -HSD5, 17 β -HSD8, MAO-A a MAO-B pro expresi v prokaryontních expresních systémech (*E. coli*); lidská butyrylcholinesterasa a acetylcholinesterasa pro expresi v savčích expresních systémech (HEK293) a komáří acetylcholinesterasa pro expresi ve hmyzích expresních systémech (SF9). Tyto enzymy byly úspěšně produkovány, purifikovány a stanovena jejich enzymová aktivita. Tyto enzymy jsou dále využívány k testování nových sloučenin modulujících jejich enzymovou aktivitu.

Rekombinantní mitochondriální enzym 17 β -HSD-10, který byl úspěšně připraven a purifikován byl použit k testování nových molekul s inhibičním potenciálem. Vybrané sloučeniny byly podrobně zkoumány a byly změřeny inhibiční konstanty IC₅₀ vybraných molekul a určena kinetika jejich inhibice. Byly provedeny SAR (structure-activity relationship) studie vybraných skupin inhibitorů. Výsledky jsou nyní zpracovávány do publikace, která by měla být odeslána v roce 2019. Dále je dokončován přehledový článek o tomto enzymu, jeho roli v organismu a patogenezi neurodegenerativních onemocnění.

Na začátku roku 2018 byla navázána spolupráce s výzkumným centrem BIOCEV ve Vestci u Prahy, kde byly provedeny experimenty metodou HDX (hydrogen-deuterium exchange) zkoumající interakci enzymu 17 β -HSD10 s vybranými látkami. Získaná data jsou nyní vyhodnocována ve vztahu ke krystalové struktuře enzymu.

Průběžné výsledky práce byly prezentovány formou posteru na mezinárodní konferenci „43rd FEBS Congress“ v Praze a na „XVIII. International meeting of young life scientists“

v Milovech, v lednu 2019 budou prezentovány formou přednášky na konferenci FaF UK V Hradci Králové („9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK“).

Dále je prováděna příprava nových sloučenin cílených na nervovou soustavu s potencionálním duálním účinkem na dopaminergní a serotoninergní receptory a nižším rizikem extrapyramidových a hematologických vedlejších účinků. Tyto látky by mohly mít vhodný terapeutický efekt u schizofrenních onemocnění. Jsou používány metody chemické syntézy, dělení reakčních směsí pomocí sloupcové chromatografie a NMR pro určení chemické struktury a čistoty připravených sloučenin.

Studenti NMgr. studijních programů vypracovávají své DP na různých typech enzymů, které jsou rekombinantně produkovány a jejichž modulátory jsou testovány.

Pro studium a tvorbu homologních modelů orexinového receptoru 2, molekulárně-dynamickou relaxací těchto modelů zanořených do membrány a dynamického dokování do takto získaných struktur se zahrnutím flexibility ligandu a částečně i receptoru byly použity metody výpočetní chemie a *in silico* modelování. Ze získaných dat studentka vypracovala diplomovou práci na téma "Molekulárně dynamické simulace receptorů spřažených s G-proteinem v počítačovém návrhu léčiv", která byla v srpnu 2019 úspěšně obhájena.

Byla stanovena farmakokinetika a farmakodynamika oximu K870 u potkanů. Sledována je koncentrace léčiva a jeho metabolitů v plazmě, moči, játrech, žluči a ledvinách. K řešení této problematiky jsou využívány metody homogenizace biologických tkání, liquid-liquid extrakce a byla vytvořena metoda pro LC-MS/MS stanovení tohoto oximu a jeho metabolitů.

Dále byla provedena inhibiční studie dvou typů enzymu monoaminoxidázy (MAO-A a MAO-B) s nově připravenými látkami s potencionálním inhibičním účinkem. Byl proveden screening těchto látek a u vybraných látek s nejvyšší mírou inhibice byla stanovena hodnota IC_{50} . Využity byly metody stanovení enzymové aktivity a LC-MS analýza vzniklých metabolitů.

Výsledky z práce studentů NMgr. studia budou zpracovány do diplomových prací s předpokládaným datem obhajoby v roce 2019. Tyto výsledky budou i součástí plánovaných publikačních výstupů v rámci projektu.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Cíle projektu byly splněny. Byly optimalizovány již zavedené metody práce s enzymy a tyto metody použity pro přípravu a práci s dalšími typy rekombinantních enzymů. U nově připravených enzymů byly zavedeny metody exprese, purifikace a stanovení enzymové aktivity těchto enzymů, které jsou dále využívány k testování nových inhibitorů.

Získané výsledky jsou nyní zpracovávány do publikačních výstupů.

Abstrakty posterů na konferencích byly publikovány ve sborníku:

- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, M. Hrabínova, K. Musilek; Modulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 activity as a potential target in neurodegenerative disorders; Czech Chem. Soc. Symp. Ser 16, 1-48 (2018)
- L. Vinklarova, M. Schmidt, O. Benek, M. Hrabínova, L. Zemanova, K. Musilek; Study of 17 β -HSD10 inhibitors with implications in neurodegenerative disorders; FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1), 256 (2018), DOI: 10.1002/2211-5463.12453

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uveďte jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán 1. rok	Plán 2. rok	Plán 3. rok	Poznámka
Hodnocené výstupy projektu	2	1		
Jimp (databáze WoS)		3		v přípravě
Jsc (databáze Scopus)				
B (recenzovaná odborná kniha)*				
C (kapitola v recenzované odborné knize)*				
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)				
P (patent)				
Počet výsledků	0	3		
Nehodnocené výstupy projektu				
Počet obhájených dizertačních prací				
Počet obhájených diplomových prací	1	2		Mgr. Melíková obhájila 08/2018
Počet výsledků	1	3		

Výsledek čerpání rozpočtu:

a) **Spotřeba materiálu** (položka dle IS Magion č. 501):

* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

Materiálové náklady (nutno soutěžit v rámci DNS)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Ultrazvuková lázeň	Rozpouštění, míchání, odplyňování a zahřívání roztoků pomocí ultrazvuku	23564
Automatické pipety s nastavitelným objemem	Pipety pro přesné pipetování malých objemů	90178
Malá suchá lázeň s vyměnitelnými bloky	Temperování roztoků pro práci s buněčnými kulturami (eukaryotické expresní vektory)	3231
Termomixer včetně termobloků	Zařízení na ohřev v malých objemech, určeno pro třepání a ohřev vzorků, blok pro termomixer pro ohřev a třepání v malých objemech mikrotitračních destičkách	44540
Laboratorní váhy	Přesné vážení	13262
Pipetovací nástavec včetně příslušenství	Pipetování roztoků pomocí skleněných a plastových pipet	10056
Vortex	Míchání kapalin a roztoků	17276
Podstavná lednice	Uchovávání chemikálií a roztoků v daných podmínkách	3981
Zařízení pro zamrazování buněk	Šetrné zamrazování buněčných kultur	4845

Vakuometr digitální	Měření vakua při laboratorních operacích za sníženého tlaku (destilace, sušení za sníženého tlaku)	15672
Horizontální elektroforéza včetně příslušenství a zdroje	Separace DNA při klonování	16859
Tube Roller	Promíchávání roztoků	7442

Spotřební náklady (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Spotřební materiál	Chemikálie (chemikálie pro přípravu roztoků a pufřů, média pro buněčné kultury, substráty pro enzymy, apod.) a spotřební materiál potřebný pro řešení projektu (plast pro buněčné kultury, laboratorní plast a sklo, ochranné pomůcky, desinfekce, apod.)	93595
kurzové ztráty		650

b) Cestovné (položka dle IS Magion č. 512):
cestovné zaměstnanců a jeho stručné zdůvodnění;

titul, jméno a příjmení zaměstnance	konferenční poplatek (cca Kč)	ubytování (cca Kč)	cestovné (cca Kč)	stravné (cca Kč)	celkem (Kč)	konference (název, místo a datum konání)

- c) **Ostatní služby** (položka dle IS Magion č. 518):
náklady nebo výdaje na služby a jejich stručné zdůvodnění

Typ služby	Stručné zdůvodnění služby	Cena včetně DPH (Kč)
tisk posteru	prezentace výsledků na konferenci	386

- d) **Mzdové náklady** (položka dle IS Magion č. 521):

titul, jméno a příjmení	odměna (Kč)	zdůvodnění	Celkem (Kč)

- e) **Zákonné pojištění** (položka dle IS Magion č. 524):

titul, jméno a příjmení	odvody z odměn 34,52 % (Kč)	Celkem (Kč)

- f) **Jiné ostatní náklady** (položka dle IS Magion č. 549):
zejména **stipendia** a jejich stručné zdůvodnění

Stipendium studentů za práci na řešení projektu

titul, jméno a příjmení studenta/ky	číslo studenta/ky	typ studia (Mgr./PhD.) / ročník studia	obor studia	bankovní spojení	stipendium (Kč)
RNDr. Lucie Vinklářová	S16BI003D P	Ph.D./3.	1501V028		11000
Mgr. Radomír Jůza	S17BI001D P	Ph.D./2.	1501V028		11000
Bc. Michaela Melíková	1407T017	NMgr./2.	1407T017		3000
Bc. Petr Bzonek	1407T017	NMgr./2.	1407T017		3000
Bc. Eliška Chaloupková	1407T017	NMgr./2.	1407T017		3000
Bc. Nikola Nováková	1407T017	NMgr./2.	1407T017		3000
Bc. Anežka Novotná	1407T017	NMgr./2.	1407T017		3000

Cestovní stipendia studentů

titul, jméno a příjmení studenta/tky	konferenční poplatek	ubytování	cestovné	stravné	celkem (Kč)	konference (název, místo a datum konání)
RNDr. Lucie Vinklářová	6480	0	396	705	7581	FEBS, Praha, 7. - 12. 7. 2018
RNDr. Lucie Vinklářová	hrazeno pořadatelem	hrazeno pořadatelem	400	815	1215	XVIII. Interdisciplinary meeting of young life scientist, Milovy, 14. – 17. 5. 2018
RNDr. Lucie Vinklářová		1012	492	796	2300	Kurz základů vědecké práce, Brno, 17. – 21. 9. 2018
RNDr. Lucie Vinklářová			1450	80	1530	měření vzorků na HDX, únor 2018, BIOCEV, Vestec u Prahy
RNDr. Lucie Vinklářová			1450	80	1530	měření vzorků na HDX, březen 2018, BIOCEV, Vestec u Prahy
RNDr. Lucie Vinklářová			1450	80	1530	měření vzorků na HDX, květen 2018, BIOCEV, Vestec u Prahy
RNDr. Lucie Vinklářová			1450	80	1530	„Instruct/CIISB course on fragment

						screening using crystallography laboratory equipment“, 5. 4. 2018, BIOCEV, Vestec u Prahy
--	--	--	--	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------

g) **Další položky** (uved'te čísla dle IS Magion):
další položky a jejich stručné zdůvodnění

Výsledek čerpání finančních prostředků uveďte v jednotné přehledné tabulce 2.

Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka magionu	Položka	Plán Kč	Žádost o změnu	Skutečnost	Poznámka
	Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	0	0	
	Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	7	7	7	
501	Spotřeba materiálu DHIM	342231	342269	342269	
512	Cestovné	17120	17216	17216	
518	Ostatní služby	1500	386	386	
521	Mzdové náklady	0	0	0	
524	Zákonné pojištění	0	0	0	
549	Jiné ostatní náklady (stipendia)	36000	37000	37000	
*					
	Celkové náklady	396871	396871	396871	

Ke zprávě přiložte:

- kopie publikačních výstupů,
- výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem,
- výsledovku z ekonomického informačního systému Magion – vyúčtování dotace.

Datum: 4. 1. 2019

Podpis odpovědného řešitele:



* V případě potřeby přidejte další řádky s položkami dle IS Magion.

Výsledovka s očekávanými náklady
Pohyby za období 01 - 12 / 2018

Pracoviště:	04450	Katedra chemie
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky
Zakázka:	2115	SPEV - katedra chemie
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky

Jčet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
i01 008	Spotřeba materiálu DHIM DU			
	počáteční stav	0,00		
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	15 672,00	0,00 000016535 VAKUOMETR DVR pPro	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	15 839,00	0,00 000016523 PIPETA	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	4 319,00	0,00 000016534 TŘEPAČKA GRANT PV-1, 750-3000 rpm	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	10 056,00	0,00 000016530 NÁSTAVEC PIPET. ACCUJET/ MAGENTA	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	3 332,00	0,00 000016528 STOJÁNEK OTOČNÝ PRO 6 PIPET	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	4 319,00	0,00 000016532 TŘEPAČKA GRANT PV-1, 750-3000 rpm	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	15 839,00	0,00 000016524 PIPETA	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	4 319,00	0,00 000016533 TŘEPAČKA GRANT PV-1, 750-3000 rpm	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	4 845,00	0,00 000016537 ZAŘÍZENÍ PRO ZAMRAŽOVÁNÍ BUNĚK 12	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	6 325,00	0,00 000016527 MIKROPIPETA 1-10 ml	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	3 332,00	0,00 000016529 STOJÁNEK OTOČNÝ PRO 6 PIPET	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	6 325,00	0,00 000016526 MIKROPIPETA 500-5000 ul	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	3 917,00	0,00 000016521 VÁHY 440-43N, 400g/0,1g	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	4 319,00	0,00 000016531 TŘEPAČKA GRANT PV-1, 750-3000 rpm	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	15 839,00	0,00 000016525 PIPETA	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	6 738,00	0,00 000016536 MINI HORIZONTAL, ELEKTROFORÉZA	
MAJ/0407/00019/18	29.06.2018	23 564,00	0,00 000016522 LÁZEŇ ULTRAZVUK. FISHERBRAND1505	
MAJ/0407/00035/18	18.09.2018	3 231,00	0,00 000017324 INKUBÁTOR PRO SUCHOU LÁZEŇ	
MAJ/0407/00035/18	18.09.2018	31 738,00	0,00 000017325 TŘEPAČKA INKUBOVANÁ ,MIKROZKUMA'	
MAJ/0407/00035/18	18.09.2018	6 522,00	0,00 000017327 BLOK PRO 96 JAMKOVOU MIKROTIT.DES	
MAJ/0407/00035/18	18.09.2018	3 981,00	0,00 000017328 LEDNICE ETA 91 L	
MAJ/0407/00035/18	18.09.2018	6 280,00	0,00 000017326 BLOK PRO 24x2ML	
MAJ/0407/00045/18	06.11.2018	7 659,00	0,00 000017552 ELEKTRÁRNA ENDURO 230 V	
MAJ/0407/00045/18	06.11.2018	7 442,00	0,00 000017551 ROLLER ROTATOR MX T6	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	4 162,00	0,00 000017604 PIPETA 0,5-10ul BIOPETTE PLUS	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	9 345,00	0,00 000017601 VÁHY PRECISION BALANCE L423	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	6 697,00	0,00 000017602 PIPETA 10-100ul	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	4 163,00	0,00 000017605 PIPETA 0,5-10ul BIOPETTE PLUS	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	4 162,00	0,00 000017603 PIPETA 0,5-10ul BIOPETTE PLUS	
MAJ/0407/00049/18	20.11.2018	4 163,00	0,00 000017606 PIPETA 0,5-10ul BIOPETTE PLUS	

i01 008 Spotřeba materiálu DHIM DU 248 444,00 0,00 248 444,00

i01 099 Spotřeba materiálu ostatní DU

Jčet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
	počáteční stav	0,00		
AV/0411/00303/18	15.06.2018	1 431,40	0,00 filtry	
AV/0411/00310/18	18.06.2018	2 942,00	0,00 fyziologický roztok	
AV/0411/00483/18	18.09.2018	2 226,20	0,00 chemikálie	
AV/0411/00486/18	19.09.2018	7 523,60	0,00 chemikálie	
AV/0411/00497/18	24.09.2018	632,00	0,00 40159-CP0-G0250-1 Tris(hydroxymethyl) aminomethan	
AV/0411/00506/18	26.09.2018	692,12	0,00 materiál	
AV/0411/00507/18	26.09.2018	14 800,12	0,00 materiál	
AV/0411/00511/18	01.10.2018	8 292,13	0,00 materiál	
AV/0411/00528/18	03.10.2018	5 893,31	0,00 spotřební materiál	
AV/0411/00542/18	05.10.2018	920,00	0,00 materiál	
AV/0411/00551/18	08.10.2018	5 448,63	0,00 materiál	

Výsledovka s očekávanými náklady
Pohyby za období 01 - 12 / 2018

Pracoviště:	04450	Katedra chemie
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky
Zakázka:	2115	SPEV - katedra chemie
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky

Jčet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
i01 099	Spotřeba materiálu ostatní DU			
	počáteční stav	0,00		
	AV/0411/00563/18 10.10.2018	10 747,83	0,00 materiál	
	AV/0414/00019/18 17.04.2018	26 483,79	0,00 chemikálie	
	AV/0414/00019/18 17.04.2018	5 561,60	0,00 chemikálie	
i01 099	Spotřeba materiálu ostatní DU	93 594,73	0,00	93 594,73
i01	Spotřeba materiálu	342 038,73	0,00	342 038,73
i18 009	Služby - tisk, graf.práce DU			
	počáteční stav	0,00		
	AV/0411/00348/18 02.07.2018	385,99	0,00 tisk posteru	
i18 009	Služby - tisk, graf.práce DU	385,99	0,00	385,99
i18	Ostatní služby	385,99	0,00	385,99
i45 001	Kurzové ztráty DU			
	počáteční stav	0,00		
	AV/0414/00019/18 17.04.2018	649,68	0,00 0000000000 chemikálie	
i45 001	Kurzové ztráty DU	649,68	0,00	649,68
i45	Kurzové ztráty	649,68	0,00	649,68
i49 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU			
	počáteční stav	0,00		
	AN/0802/12921/18 04.06.2018	7 335,00	0,00 1 Vinklářová Lucie	
	AN/0802/13041/18 06.06.2018	3 000,00	0,00 1 Melíková Michaela	
	AN/0802/19410/18 03.08.2018	7 581,00	0,00 2	
	AN/0802/23392/18 02.10.2018	2 300,00	0,00 2 Vinklářová Lucie	
	AN/0971/00383/18 09.10.2018	34 000,00	0,00 2 mimořádná stipendia	
i49 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. D	54 216,00	0,00	54 216,00
i49	Jiné ostatní náklady	54 216,00	0,00	54 216,00
	Náklady celkem	397 290,40	0,00	397 290,40

Výsledovka s očekávanými náklady
Pohyby za období 01 - 12 / 2018

Pracoviště: 04450 Katedra chemie
Činnost: **** Všechny vybrané analytiky
Fullcost: ***** Všechny vybrané analytiky
Zakázka: 2115 SPEV - katedra chemie
Podzakázka: *** Všechny podzakázky

Jčet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
091 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický výzkum			
	počáteční stav		0,00	
	MAN/0910/00005/18 05.02.2018	0,00	396 871,00	Specifický výzkum na VŠ
091 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecific	0,00	396 871,00	396 871,00
091	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.slc	0,00	396 871,00	396 871,00
	Výnosy celkem	0,00	396 871,00	396 871,00
	Jčetní hospodářský výsledek:			-419,40
	Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů:			-419,40

Jčetní hospodářský výsledek za vybrané: -419,40

Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů za vybrané: -419,40

Výběrová kritéria (omezení sestavy se řídí právy uživatele herrmma1 (uvedena v závorce))

Pracoviště: 04450 (04[45|90]*[0447*]

Činnost: (***[1210)

Fullcost:

Zakázka: 2115 (*|*)

Podzakázka:

Sshrnuty všechny předpokládané náklady