INSTYTUT

BiolMed

INSTYTUT BIOLOGII MEDYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
93-232 Łódź, ul. Lodowa 106

R A P O R T

Z DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ

INSTYTUTU BIOLOGII MEDYCZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

w 2010 roku

Łódź, 2010r.

S P I S T R E Ś C I

		Strona
1.	**Ogólne informacje o działalności Instytucie Biologii Medycznej PAN w 2010 r.**	**3**
	Sieci naukowe	10
	Centrum Doskonałości w Dziedzinie Biologii Medycznej	12
	Członkowstwo w Konsorcjach Naukowych	13
	Miniinkubator przedsiębiorczości dla firm biotechnologicznych	15
	Zatrudnienie w Instytucie Biologii Medycznej PAN	16
2.	**Finanse Instytutu Biologii Medycznej PAN w 2010 r.**	**18**
3.	**Informacja o prowadzonych w Instytucie Biologii Medycznej PAN badaniach** – wybrane wyniki	**19**
4.	**Sprawozdania z realizacji zadań statutowych**	**20**
5.	**Sprawozdania z realizowanych projektów badawczych**	**31**
	Projekty badawcze finansowane przez podmioty/instytucje zagraniczne	32
	Projekty badawcze własne	48
	Projekty badawcze zamawiane	68
	Projekty badawcze rozwojowe	71
	Inne projekty badawcze	73
	Umowy zawarte z innymi podmiotami o stałe lub wieloletnie świadczenie na ich rzecz badań naukowych i prac rozwojowych lub usług.	75
6.	**Współpraca naukowa Instytutu z placówkami zagranicznymi**	**76**
7.	**Publikacje, cytowania, doniesienia zjazdowe i konferencyjne w 2010 r.**	**85**
	Wykaz publikacji	86
	Cytowania	90
	Doniesienia zjazdowe i konferencyjne	91
8.	**Informacje o pozostałej aktywności naukowej pracowników Instytutu Biologii Medycznej PAN w 2010 r.**	**97**
	Nagrody krajowe	98
	Działalność o charakterze innowacyjnym	99
	Rozwój kadr naukowych	100
	Działalność ekspercka, przygotowywanie opinii, recenzji, udział w konsultacjach, itp.	103
	Członkostwo z wyboru w organizacjach naukowych	104
	Seminaria naukowe przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej PAN	107

OGÓLNE INFORMACJE
O DZIAŁALNOŚCI JEDNOSTKI w 2010 r.

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź
Tel.: (042) 27 23 633, fax.: (042) 27 23 630
e-mail: zlesnikowski@cbm.pan.pl; jdziadek@cbm.pan.pl
sekretariat: aobidowska@cbm.pan.pl
http// www.ibmpan.pl

Dyrektor: **prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski**
Zastępca Dyrektora: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**
Przewodniczący Rady Naukowej: **prof. dr hab. Maria J. Olszewska, czł. rzecz. PAN**
Zastępca Przew. Rady Naukowej: **prof. dr hab. Antoni Różalski**

Instytut Biologii Medycznej PAN został utworzony Decyzją Prezesa PAN Nr 4 z 27 lutego 2008r. Wpisany do rejestru instytutów Polskiej Akademii Nauk pod numerem RIN-VI-64/08. Na podstawie Decyzji nr 64/08 Prezesa PAN z dnia 29 kwietnia 2008 roku uzyskał osobowość prawną.

Instytut stał się następcą prawnym w zakresie praw i obowiązków zlikwidowanego z dniem 28 kwietnia 2008 na podstawie Uchwały nr 49/2007 Prezydium PAN Centrum Biologii Medycznej PAN (Centrum Biologii Medycznej PAN zostało powołane do życia z dniem 1 lipca 2003 r. Uchwałą Nr 26/03 Prezydium PAN z dnia 11 czerwca 2003 w wyniku połączenia dwóch łódzkich placówek Polskiej Akademii Nauk, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii (1987 - 2003) oraz Zakładu Amin Biogennych (1959 - 2003). Działalność podjęło z dniem 01 stycznia 2004 r.)

Decyzją z dnia 28 maja 2007 roku Centralna Komisja Do Spraw Stopni i Tytułów przyznała Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi uprawnienia do nadawania stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.

W roku 2010 Instytut Biologii Medycznej PAN w wyniku oceny parametrycznej uzyskał **kategorię „A”** na podstawie art. 32 ust. 5 Ustawy z dnia 30.04.2010 - Przepisy wprowadzające ustawy reformujące system nauki (Dz. U.2010 r. Nr 96 poz.620) wg załącznika - 8 N7b Jednostki naukowe niekliniczne poz. 7 (z końcowym wskaźnikiem efektywności 80,49) do Komunikatu nr 19 MNiSW z dnia 30 września 2010 o ustalonych kategoriach jednostek naukowych.

Instytut Biologii Medycznej PAN będąc partnerem w projekcie EU-OPENSCREEN „Europejska infrastruktura otwartych platform screeningowych w biologii chemicznej” realizowanym w ramach 7 Programu Ramowego (SP4 Capacities, Theme INFRA -2010-2.2.6, Combination of CP & CSA Construction of New Research Infrastructures – Preparatory Phase, numer kontraktu 261281) i koordynatorem polskiego konsorcjum POL-OPENSCREEN wchodzącego w skład konsorcjum międzynarodowego EU-OPENSCREEN **został umieszczony**

na liście projektów Polskiej Mapy Drogowej Infrastruktury Badawczej, uszeregowanej wg strategicznych obszarów badań, zatwierdzonej przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.
Obszar badań dotyczący Instytutu Biologii Medycznej PAN to „**Wydajna ochrona zdrowia i wzrost efektywności działań prozdrowotnych**" (badania mechanizmów powstawania, rozwój profilaktyki i diagnostyki oraz metod leczenia chorób cywilizacyjnych oraz szczególnie groźnych; rozwój farmakoterapii i badania nad lekoodpornością; rozwój technologii dla bezpiecznej i prozdrowotnej żywności; rozwój i zastosowanie technologii informatycznych w naukach biomedycznych).

Przedmiotem działalności Instytutu jest prowadzenie badań naukowych w zakresie nauk biomedycznych skupionych na wyjaśnieniu podstawowych mechanizmów molekularnych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych oraz biotechnologii medycznej. Placówka działa na rzecz rozwoju w/w dziedzin nauki, a szczególnie zajmuje się prowadzeniem nowoczesnych badań podstawowych i aplikacyjnych.
Do zadań placówki należy w szczególności:
prowadzenie prac badawczych w zakresie: biologii i biotechnologii medycznej badań relacji organizm-środowisko oraz badań na styku patogen-gospodarz na poziomie molekularnym, komórkowym i na poziomie organizmu, a także nauk farmaceutycznych.

Uprawiane specjalności: biologia medyczna, farmakologia, mikrobiologia, wirusologia molekularna, biologia molekularna, genetyka i fizjologia drobnoustrojów, immunologia, immunobiologia zakażeń, chemia biologiczna, struktura i funkcja DNA, struktury komórkowe bakterii.

Prace badawcze Instytutu w 2010r. prowadzone były w 9 pracowniach (stan zatrudnienia na dzień 31.12.2010 r.):

Pracownia Chronobiologii (5 osób)

prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska	**- Profesor - Kierownik Pracowni**
dr Paulina Sokołowska	- Adiunkt
dr Magdalena Namiecińska 2/3 etatu	- Adiunkt
mgr Anna Urbańska	- Asystent
mgr Kaja Biegańska 2/3 etatu	- Asystent

Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* (12 osób)

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek	**- Profesor – Zastępca Dyrektora/Kierownik Pracowni**
Dr Liliana Serwecińska	- Adiunkt
Dr Marta Popławska	- Adiunkt

Dr Anna Brzostek - Asystent
Dr Małgorzata Korycka-Machała - Asystent
Dr Anna Rumijowska-Galewicz - Asystent
Mgr Jakub Pawełczyk - Asystent
Mgr Kuroń Aneta - Asystent
Mgr Alina Górna ¾ etatu - Asystent
Mgr Małgorzata Ziółkiewicz ¾ etatu- Asystent
Mgr Karolina Treppa - Asystent
Mgr Nowosielski Marcin - Asystent

Pracownia Genetyki Molekularnej (4 osoby)

dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN - Profesor nadzw. - Kierownik Pracowni
dr inż. Marta Majchrzak - Asystent
mgr Anna Krzyżanowska - Asystent
mgr Anna Bogumiła Kubiak - Asystent
dr Arkadiusz Wojtasik - Asystent (urlop bezpłatny od 15.12.2009 do 30.05.2011)

Pracownia Immunobiologii Zakażeń (5 osób)

dr hab. Maciej Cedzyński, prof. IBM PAN - Profesor nadzw. - Kierownik Pracowni
dr hab. Anna Świerzko, prof. IBM PAN - Profesor nadzw.
mgr Agnieszka Szala - Asystent
mgr Marcin Bartłomiejczyk - Asystent
mgr Sokołowska Anna - Asystent

Pracownia Immunologii Doświadczalnej (7 osób)

dr hab. Zofia Sułowska, prof. IBM PAN - Profesor nadzw.- Kierownik Pracowni
dr hab. Magdalena Klink, prof. IBM PAN - Profesor nadzwyczajny
dr Katarzyna Bednarska - Asystent
mgr Michał Kiełbik - Asystent
mgr Rychlińska Marta - Asystent
mgr Edyta Blus ½ etatu - Asystent
mgr Izabela Szulc - Asystent

Pracownia Immunologii Komórkowej (7 osób)

dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN- Profesor nadzw. – Kierownik Pracowni
dr Aurelia Walczak-Drzewiecka - Adiunkt
dr Waldemar Wagner - Adiunkt
dr Ewa Kuchowicz - Adiunkt
mgr Wojciech Ciszewski - Asystent

mgr Sałkowska Anna	- Asystent
mgr Magdalena Łukasiak 1/3 etatu	- Asystent

Pracownia Proteomiki Komórkowej (6 osób)

prof. dr hab. Czesław Cierniewski	**- Profesor - Kierownik Pracowni**
dr hab. Maria Anna Kowalska	- Adiunkt – urlop bezpł. (um. o pracę płatna z grantu własnego)
dr Joanna Boncela	- Adiunkt
dr Patrycja Przygodzka	- Adiunkt
dr Tomasz Cieślikowski	- Adiunkt
dr Maria de la Paz Mena Jaramillo	- Adiunkt
dr Anna Kozaczuk	- Asystent
dr Mariusz Malinowski	- Asystent (urlop bezpłatny od 26.10.2009 do 25.10.2011)

Pracownia Regulacji Transkrypcyjnej (5 osób)

dr hab. Łukasz Pułaski	**- Adiunkt - Kierownik Pracowni**
dr Katarzyna Kania	- Adiunkt
dr Dorota Jaros	- Adiunkt
dr Marcin Ratajewski	- Asystent
mgr Iwona Sachrajda	- Asystent

Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej (12 osób)

prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski	**- Profesor – Dyrektor / Kierownik Pracowni**
dr Agnieszka Olejniczak	- Adiunkt
dr Edyta Paradowska	- Asystent
mgr Agnieszka Piskała	- Asystent
mgr inż. Błażej Wojtczak	- Asystent
mgr Arkadiusz Laskowski	- Asystent
mgr inż. Anna Adamska	- Asystent
mgr Patrycja Suski	- Asystent
mgr Agnieszka Jabłońska	- Asystent
mgr Magdalena Białek Pietras	- Asystent
mgr Wioletta Wujcicka	- Asystent
mgr Mirosława Studzińska	- Biolog

Dr Małgorzata Berezińska - **asystent naukowy- sprawujący opiekę merytoryczną nad zwierzętami laboratoryjnymi i nadzór nad przechowalnią zwierząt w budynku IBM PAN przy ul. Tylnej 3a w Łodzi** a także zgodnie z Ustawa z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33 poz. 289) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. (Dz. U. Nr 153 poz. 1273) **sprawuje nadzoru nad doświadczeniami na zwierzętach przeprowadzanymi w Instytucie Biologii Medycznej PAN.**

Biblioteka naukowa

Instytut Biologii Medycznej PAN posiada bibliotekę naukową znajdującą się w budynku przy ul. Tylnej 3 (o powierzchni 124,15 m^2 z ogólnej powierzchni 470,5 m^2 przeznaczonej na funkcjonowanie Centralnej Biblioteki Placówek PAN w Łodzi) oraz przy ul. Lodowej 106 (pow. 67 m^2). Gromadzi literaturę fachową, głównie w języku angielskim z następujących dziedzin: biochemia; alergologia; immunologia; farmakologia; neurologia; fizjologia i dziedziny pokrewne oraz biotechnologia; genetyka; wirusologia; mikrobiologia i chemia organiczna. Według stanu na dzień 31 grudnia 2010 roku zbiory obejmują 3 211 woluminów książek oraz 5403 woluminów czasopism. W ramach konsorcjum Elsevier B.V. biblioteka posiada dostęp do elektronicznej wersji ponad 1400 bieżących tytułów czasopism naukowych. Biblioteka Instytutu Biologii Medycznej PAN służy nie tylko pracownikom naukowym macierzystej instytucji. Z jej zbiorów korzystają również studenci i pracownicy łódzkich uczelni i placówek naukowych. W ramach zamówień międzybibliotecznych, wiele unikatowych tytułów czasopism zagranicznych udostępnianych jest bibliotekom i zainteresowanym osobom z całej Polski.

W 2010 roku udostępniono 178 woluminów książek, 131 woluminów czasopism oraz wykonano 429 kserokopii publikacji z czasopism naukowych.
Opiekunem billioteki jest mgr Katarzyna Robowska.

Archiwum Zakładowe

W Instytucie Biologii Medycznej PAN działa Archiwum Zakładowe gromadzące także dokumentację zlikwidowanych placówek: Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN oraz Zakładu Amin Biogennych PAN. Opiekunem Archiwum jest mgr Katarzyna Robowska.

Pracownia Izotopowa

Instytut Biologii Medycznej PAN posiada Pracownię Izotopową klasy III znajdująca się w pomieszczeniach nr 14A i 14B przeznaczoną do przeprowadzania testów na komórkach hodowanych *in vitro* z użyciem materiału radioaktywnego. W pracowni tej znajduje się licznik scyntylacyjny do mikropłytek model 1450-023. Zezwolenie nr D-16803 na pracę z materiałem radioaktywnym w tej pracowni Instytut otrzymał w 07.04.2008 r.
Nadzór nad pracownią sprawuje mgr inż. Barbara Krzemieniewska, mająca uprawnienia inspektora ochrony przed promieniowaniem typu IOR- 1(zaświadczenie nr 624//2005).

Hodowle komórkowe, kolekcje szczepów bakteryjnych i wirusowych oraz plazmidów

W pracowniach badawczych Instytutu Biologii Medycznej PAN prowadzone są w sposób ciągły hodowle unikatowych linii komórkowych, kolekcje szczepów bakteryjnych i wirusowych oraz plazmidów niezbędnych w badaniach nad mechanizmami przekazywania sygnału w komórkach tucznych oraz w badaniach, które mają na celu wyjaśnianie mechanizmów różnych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych na poziomie molekularnym, a także identyfikację nowych tarcz terapeutycznych i podejść diagnostycznych.

W badaniach prowadzonych w Instytucie Biologii Medycznej PAN wykorzystywane są następujące kolekcje szczepów bakteryjnych i wirusowych, plazmidów oraz linie i hodowle komórkowe:

1. Kolekcje szczepów i plazmidów

- **Szczepy bakteryjne**

Escherichia coli: ATCC 13706, *E. coli* Top10, *E. coli* DH5α, *E. coli* JM109, *E. coli* XlBlue, *E. coli* Bl21, *E. coli* ER252. szczepy kliniczne UPEC, kolekcja łódzka z lat 2005-2007, kliniczne szczepy *E. coli* wyizolowane z kału, kolekcja łódzka z lat 2008-2009

Szczepy Mycobacterium tuberculosis: *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra-ΔchoD, *M. tuberculosis* H37Ra-ΔhsdD *M. tuberculosis* szczepy kliniczne, kolekcja łódzka - 150 szczepów z lat 1999-2000**,**

Szczepy Mycobacterium kansasii, kolekcja IGiChP

Szybkorosnące szczepy Mycobacterium: *M. smegmatis* mc^2 155, *M. smegmatis* mc^2 155 oraz jego mutanty pozbawione jednego lub więcej z wymienionych genów (ksdD; choD; accD6; ligC1; ligC2; prim3; ligD; ku i in.), *M. vaccae* B3805, *M. fortuitum*,

Szczepy (bakterie i grzyby) z kolekcji ATCC: *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger, Staphylococcus aureus* ,

Szczepy Salmonnela enterica ser. Anatum, Cottbus, Thompson, Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Hadar, Virchow, Manchester, Stanley, Chester, Anatum, Newport

Szczepy *Klebsiella pneumoniae* O3, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, **Escherichia coli** ATCC 25922, ***Klebsiella oxytoca*** ATCC 43086, ***Klebsiella pneumoniae*** ATCC 10031, ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932, ***Neisseria gonorrhoeae*** ATCC 19424, ***Neisseria meningitidis*** (Group A) ATCC 13077, ***Neisseria meningitidis*** (Group B) ATCC 13090, ***Neisseria meningitidis*** (Group C) ATCC 13102, ***Proteus mirabilis*** ATCC 12453, ***Proteus vulgaris*** ATCC 33420, ***Salmonella enteritidis*** (Group D) ATCC 13076, ***Salmonella paratyphi*** (Group A) ATCC 9150, ***Salmonella typhimurium*** ATCC 13311, ***Shigella flexneri*** (Serotype 1a) ATCC 9199, ***Shigella flexneri*** (Serotype 2b) ATCC 12022, ***Shigella sonnei*** ATCC 25931, ***Yersinia enterocolitica*** ATCC 23715**,** ***Pseudomonas aeruginosa*** ATCC 10145, ***Pseudomonas putida*** ATCC 49128.

Szczepy wirusowe

- **Szczepy wirusowe**

HCMV (*Cytomegalovirus*) – ludzki wirus cytomegalii, szczep AD169, Towne i Davis, **HSV-1** (*Herpes Simplex Virus type 1*)- wirus opryszczki typu 1, **VSV** (*Vesicular Stomatitis Virus*)- wirus pęcherzykowatego zapalenia błony śluzowej jamy ustnej bydła, **EMCV** (*Encephalomyocarditis*

Virus) - wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego, szczep Col MM, **NDV** (*Newcastle Disease Virus*)- wirus rzekomego pomoru drobiu, **HPIV-3** (*Human Parainfluenza virus type 3*) – wirus ludzki paragrypy typu 3, **HHV-3** (*Human Herpesvirus 3,* VZV- *Varicella-zoster virus*)-wirus ospy wietrznej i półpaśca.

2. Hodowle linii komórek:

EA.hy926 - linia endotelialna, **HepG2** – hepatoma, **U937** - linia monocytarno-makrofagowa, linie komórek tucznych mysich (**C57, MCP5/L, CFTL15, MC9)** i ludzkich (**HMC-1**), mysich fibroblastów (**NIH 3T3/L1**), keratynocytów (**HEL30**), makrofagów (**J477**) oraz limfocytów (EL-**4**). Część komórek z tych linii komórkowych została poddana transfekcji białkiem GFP (green fluorescence protein) i drogą klonowania utworzono odpowiednie podlinie. Linie komórkowe: mysie **IgE anty-DNP hybrydoma** (unieśmiertelnione komórki produkujące monoklonalne IgE anty DNP), mysie komórki śródbłonkowe (**linia HECa10**), hodowle komórek tucznych ze szpiku kostnego myszy. **Linie nowotworowe raka jajnika: ES-2, SW626, SK-OV-3, OAW-42, OVCAR-3, makrofagowa linia mysia J7.DEF.3, ludzka linia monocytarna THP1, mysie i ludzkie komórki otrzewnowe** oraz **komórki glejaka C6** szczura, **MRC-5** ludzka fibroblastopodobna, **L929** mysia fibroblastopodobna, **A549** ludzka nabłonkopodobna, **P 388D$_1$** mysia monocytarno-makrofagowa, **Vero** małpia nabłonkopodobna, **7 TD1** hybrydoma mysio-szczurza, **CTLL-2** ludzka limfocytarna, **LLC–MK2** małpia nabłonkopodobna, **RPMI 2650** ludzka nabłonkopodobna.

Posiadanie hodowli w/w linii komórkowych i wyspecjalizowanych komórek sensoryczno-neuroendokrynnych, kolekcji szczepów bakterii i wirusów oraz plazmidów umożliwia prowadzenie badań na wysokim poziomie, pozwala na partnerską współpracę z uznanymi zagranicznymi ośrodkami badawczymi oraz na publikowanie wyników naszych badań w liczących się w świecie, recenzowanych czasopismach naukowych jak również w komunikatach i doniesieniach zjazdowych.

SIECI NAUKOWE

Instytut Biologii Medycznej PAN przynależy do n/w sieci naukowych:

1. W rozumieniu art. 2 pkt. 12 ustawy z dnia 8 października 2004 r. o zasadach finansowania nauki

„REGIONALNE CENTRUM BADAŃ CHEMICZNYCH, BIOLOGICZNYCH I MEDYCZNYCH POLSKIEJ AKADEMII NAUK W ŁODZI"

Dyscypliny: nauki chemiczne, nauki biologiczne, biologia medyczna;

Członkowie:
1. Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi,
2. Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi,
3. Międzynarodowe Centrum Ekologii Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Cel Sieci realizowany będzie poprzez:

1. współpracę jednostek naukowych, tworzących Sieć związaną z prowadzonymi przez te jednostki w ramach działalności statutowej badaniami naukowymi lub pracami rozwojowymi;
2. prowadzenie badań naukowych uzupełniających w stosunku do zadań wykonywanych w ramach działalności statutowej jednostek naukowych tworzących sieć naukową, niezbędnych do rozwoju specjalności naukowej Sieci;
3. prowadzenie badań rozwojowych i wdrożeniowych w ścisłej współpracy z użytkownikami tych badań, w tym z uczestnikami Sieci;
4. tworzenie płaszczyzny wymiany doświadczeń i współpracy pomiędzy uczestnikami Sieci poprzez spotkania, wspólne seminaria i konferencje;
5. realizację usług badawczych, technologicznych i laboratoryjnych na rzecz placówek nie wchodzących w skład Sieci oraz małych i średnich przedsiębiorstw;
6. upowszechnianie wyników badań, organizację programu szkoleniowego dla pracowników nauki;
7. powiązanie programu badawczego z założeniami strategii innowacyjnej kraju;
8. doradztwo w dziedzinie transferu innowacji i technologii oraz udziału w europejskich programach badawczych;
9. pozyskiwanie środków finansowych ze źródeł krajowych oraz z zagranicy;
10. tworzenie i upowszechnianie informacji w zakresie działania Sieci naukowej.

2. Inne sieci

POLSKĄ SIEĆ BADAWCZĄ „MOLEKULARNE PODSTAWY ODPORNOŚCI”

Członkowie polskiej sieci badawczej: „Molekularne podstawy odporności”

1. Pracownia Immunobiologii Zakażeń, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi
2. Pracownia Immunologii Doświadczalnej, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi
3. Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
4. Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut-Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
5. Poradnia Zaburzeń Odporności, Instytut-Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
6. Klinika Pediatrii i Gastroenterologii, Instytut-Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi,
7. Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej, Instytut-Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi,
8. Katedra Patofizjologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
9. Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie
10. Zakład Immunopatologii, Państwowy Zakład Higieny w Warszawie
11. Katedra Mikrobiologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
12. Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Matki i Dziecka, w Warszawie
13. Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut Matki i Dziecka, w Warszawie

Partner zagraniczny Sieci:

- Scottish National Blood Transfusion Service, National Science Laboratory, Edinburgh, Wielka Brytania

Cele sieci:

- Opracowanie i realizowanie wspólnych projektów badawczych (w tym finansowanych przez Unię Europejską). W projektach tych mogą uczestniczyć wszyscy lub niektórzy członkowie Sieci.
- Optymalizacja i unifikacja technik badawczych.
- Wzajemne udostępnianie unikalnej aparatury badawczej i materiałów biologicznych oraz wymiana informacji o ich zasobach.
- Organizacja i udział w konferencjach naukowych; inne formy popularyzacji wiedzy i osiągnięć naukowych grupy (wykłady na seminariach, zebraniach towarzystw naukowych).
- Rozwój współpracy między naukowcami o różnych specjalnościach i zainteresowaniach (immunologia, mikrobiologia, genetyka, medycyna, biochemia).
- Tworzenie optymalnych warunków sprzyjających rozwojowi młodych pracowników naukowych, między innymi przez umożliwianie im udziału w realizacji projektów badawczych, kursach i „spotkaniach z ekspertami”.
- Włączanie się i aktywne uczestnictwo w Europejskim Obszarze Badawczym (ERA) przez stworzenie międzynarodowych „sieci doskonałości”.
- Rozwój współpracy międzynarodowej z partnerami spoza Unii Europejskiej.

W skład sieci wchodzą specjaliści w wielu dziedzinach, takich jak: immunologia, medycyna (w tym pediatria, ginekologia, onkologia, gastroenterologia, alergologia), genetyka, mikrobiologia, biochemia, co zapewnia wielokierunkowość badań i właściwą ocenę otrzymanych wyników. Wiodącą tematykę stanowi odporność wrodzona, a zwłaszcza jej czynniki biorące udział w aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej: lektyna wiążąca mannan, fikoliny oraz proteazy serynowe MASP. Prowadzone są badania znaczenia niedoborów ilościowych i funkcjonalnych wymienionych białek w patogenezie chorób o podłożu infekcyjnym, nowotworowym i autoimmunizacyjnym u dzieci dorosłych oraz ich wpływu na przebieg ciąży i status zdrowotny noworodków.

CENTRUM DOSKONAŁOŚCI W DZIEDZINIE BIOLOGII MEDYCZNEJ

W ramach Centrum Doskonałości w Dziedzinie Biologii Medycznej, któremu Ministerstwo Nauki i Informatyzacji nadało status Centrum Doskonałości uchwałą KBN nr 47/2004 z dnia 16.09.2004r. (Dz. U. Nr 10, poz. 65) działają następujące laboratoria:

1. **LABORATORIUM TRANSDUKCJI SYGNAŁU I HOMEOSTAZY ŚRODOWISKOWEJ**
   prof. dr hab. Jolanta Barbara Zawilska
2. **LABORATORIUM HODOWLI KOMÓRKOWYCH I TKANKOWYCH**
   dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN, dr hab. Łukasz Pułaski
3. **LABORATORIUM DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ**
   prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski, prof. dr hab. Jarosław Dziadek, prof. dr hab. Czesław Cierniewski, dr hab. Paweł Parniewski prof. IBM PAN, dr hab. Zofia Sułowska prof. IBM PAN, dr hab. Maciej Cedzyński prof. IBM PAN

Powołanie CENTRUM DOSKONAŁOŚCI W DZIEDZINIE BIOLOGII MEDYCZNEJ umożliwi wspieranie i koordynację badań na trzech niezbędnych poziomach: badań aplikacyjnych, bezpośrednio związanych z zastosowaniem odkryć naukowych w medycynie, także w sektorze przemysłowym; badań podstawowych, czyli odkrywania prawidłowości przyrodniczych na poziomie molekularnym, komórkowym i organizmalnym; oraz badań technologicznych, pozwalających na opracowanie coraz lepszych narzędzi i technik badawczych.

Instytut Biologii Medycznej PAN jest właścicielem nowoczesnej aparatury naukowo-badawczej oraz urządzeń umożliwiających prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych albo świadczenie usług na rzecz tych badań lub prac na poziomie światowym.

Dzięki utworzeniu Centrum Doskonałości możliwe było powołanie i uzyskanie finansowania *Laboratorium Testów Przesiewowych i Alternatywnych na rzecz Biotechnologii, Farmacji i Kosmetologii"* w ramach projekt WKP_1/1.4.3./2/2005/8/127/316. Aparatura i urządzenia, które zakupiono w ramach tego projektu mogą być udostępniane użytkownikom zewnętrznym, tj. osobom niezatrudnionym w IBM PAN i innym podmiotom, na zasadach określonych w regulaminach obowiązujących w IBM PAN.

W roku 2010 w ramach działalności Laboratorium Testów Przesiewowych i Alternatywnych na rzecz Biotechnologii, Farmacji i Kosmetologii pracownicy Pracowni Regulacji Transkrypcyjnej IBM PAN zrealizowali dwie umowy o wykonanie usługowych badań naukowych na rzecz firmy farmaceutycznej ADAMED W roku 2010 Laboratorium Testów Przesiewowych i Alternatywnych wykonało jedną serię zleconych badań naukowych w ramach umowy z firmą „ADAMED" Sp. z o.o. z siedzibą w Pieńkowie 149, 05-152 Czosnów: pt. „Opracowanie metodyki oznaczania pozytywnych modulatorów allosterycznych receptora mGluR2". w ramach umowy cywilno-prawnej o wykonanie badań naukowych (wycena wartości przekazanych wyników badań 28000 PLN, opis efektów praktycznych, gospodarczych lub społecznych, uzyskanych poza jednostką - poufne na żądanie wdrażającego).
Usługi zostały zrealizowane zgodnie z założeniami umów i rozliczone w terminie.

CZŁONKOSTWO W KONSORCJACH NAUKOWYCH

MIĘDZYNARODOWE KONSORCJUM

EU-OPENSCREEN, ***European Infrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology***

Celem Konsorcjum międzynarodowego jest przygotowanie bazy, konstrukcja i eksploatacja pan-europejskiej infrastruktury umożliwiającej tworzenie kolekcji związków chemicznych (przewidywana wielkość centralnej kolekcji 0.5 miliona związków), wysoko-przepustkowe badania przesiewowe, chemiczna synteza i optymalizacja metod otrzymywania związków-kandydatów na nowe leki oraz bioprofilowanie i badania *in vivo* tych związków. Przyjmuje się, że stworzona baza będzie otwarta i dostępna dla wszystkich zainteresowanych placówek naukowych, uczelni, jaki i przemysłu farmaceutycznego na ustalonych zasadach.

Dalekosiężnym celem Konsorcjum i możliwości stworzonych w ramach infrastruktury EU-OPENSCREEN jest zapewnienie Europie i uczestniczącym w projekcie krajom czołowej pozycji w obszarze nauk biologicznych i medycznych oraz stymulowanie badań przemysłowych i komercyjnego wykorzystania europejskiego potencjału w obszarze poszukiwań i wprowadzania nowych leków.

Specjalność naukowa: chemia biologiczna

Jednostki tworzące:

1. Helmholtz-Zentrum Fuer Infektionsforschung Gmbh; Universitetet I Oslo;
2. Fundacio Priv Ada P Arc Cientific De Barcelona;
3. Umea Universitet;
4. Ustav Molekularni Genetiky Akademie Ved Ceske Republiky· Verejna , Vyskumna Instituce;
5. European Molecular Biology Laboratory, Established In Meyerhofstrasse 1, Heidelberg;
6. Helsingin Yliopisto;
7. Cemm -Forschungszentrum Fuer Molekulare Medizin Gmbh;
8. Danmarks Tekniske Universitet;
9. **Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk**;
10. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut;
11. Centre National De La Recherche Scientifique ;
12. Hundesministerium Fuer Bildung Und Forschung;
13. Wissenschaftsgemeinschaft Gottfried Wilhelm Leibniz E.V.;
14. Hermann Von Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentrum Ev

KRAJOWE KONSORCJA

POL-OPENSCREEN (Polish Infrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology)

Konsorcjum POL-OPENSCREEN koordynowane jest przez Instytut Biologii Medycznej PAN i wchodzi w skład Konsorcjum EU-OPENSCREEN.

Celem Konsorcjum jest przygotowanie bazy, konstrukcja i eksploatacja pan-europejskiej infrastruktury umożliwiającej tworzenie kolekcji związków chemicznych (przewidywana wielkość centralnej kolekcji 0.5 miliona związków), wysoko-przepustkowe badania przesiewowe, chemiczna synteza i optymalizacja metod otrzymywania związków-kandydatów na nowe leki oraz bioprofilowanie i badania *in vivo* tych związków. Przyjmuje się, że stworzona baza będzie otwarta i dostępna dla wszystkich zainteresowanych placówek naukowych, uczelni jaki i przemysłu farmaceutycznego na ustalonych zasadach.

Specjalność naukowa: chemia biologiczna

Jednostki tworzące:

1. Instytut Biologii Medycznej PAN
2. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
3. Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
4. Instytut Farmakologii PAN
5. Instytut Farmaceutyczny
6. Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

CENTRUM ZAAWANSOWANYCH TECHNOLOGII „BioTechMed"

Instytut Biologii Medycznej PAN jest członkiem **Konsorcjum,** które uzyskało status **CENTRUM ZAAWANSOWANYCH TECHNOLOGII „BioTechMed" (koordynatorem jest Politechnika Łódzka).**

Celem Konsorcjum jest prowadzenie prac badawczo-rozwojowych i badawczo wdrożeniowych ukierunkowanych na opracowanie nowych technologii usług służących ochronie i poprawie zdrowia ludzi i ochronie środowiska.

Jednostki tworzące CZT BioTechMed:

a. naukowe

1. Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN,
2. Instytut Biologii Medycznej PAN,

3. Instytut Medycyny Pracy im Prof. Dr J. Nofera
4. Politechnika Łódzka,
5. Uniwersytet Łódzki,
6. Uniwersytet Medyczny,

b. pozostałe

7. Spółka „Polfarmex" S.A, Kutno
8. Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Wdrożeniowe „Ifotam" Sp. z o.o. Łódź,
9. "Pharmena" Sp. z o.o. Łódź,
10. Ośrodek Badawczo-Produkcyjny Politechniki Łódzkiej „Ichem" Sp. z o.o., Łódź,
11. Hurtownia Farmaceutyczna „Hurtap" S.A, Łęczyca,
12. Zakład Enzymów i Peptonów „BTL" Sp. z o.o., Łódź,
13. Wojewódzki Ośrodek Medycyny Pracy w Łodzi,
14. Niepubliczny Zakład Opieki Zdrowotnej Centrum Alergologii, Łódź,
15. Zakład Opieki Zdrowotnej Poradnia Konsultacyjna „Gastro", Łódź.

MINIINKUBATOR DLA FIRM BIOTECHNOLOGICZNYCH

Na podstawie porozumienia o współpracy podpisanego 19 listopada 2007 roku pomiędzy Miastem Łódź, Bio-Tech Consulting sp.z o.o. z siedzibą w Łodzi a Instytutem Biologii Medycznej PAN, Instytut uczestniczy w projekcie pilotażowym „Miniinkubator dla firm biotechnologicznych", który został wpisany w założenia programu pt.. "Strategia rozwoju klastra w Łodzi na lata 2007-2015 (Uchwała Rady Miejskiej w Łodzi nr IX/155/07 z dnia 11 kwietnia 2007 roku) w zakresie pozyskiwania inwestorów w branży biotechnologicznej wspierającej rozwój klastra.

Celem „Miniinkubatora dla firm biotechnologicznych" jest wspomaganie nowoutworzonych podmiotów gospodarczych z branży biotechnologicznej.

Na terenie Instytutu w ramach projektu pilotażowego działa firma biotechnologiczna:

- Spółka z o.o. „Proteon Pharmaceuticals", która działa w obszarze prac badawczych i wdrożeniowych w zakresie biotechnologii.

Zatrudnienie w Instytucie Biologii Medycznej PAN

Instytut Biologii Medycznej PAN (IBM PAN) wg stanu na dzień 31.12.2010 r. zatrudniał **ogółem: 80 osób** (w tym: 4 osoby dla których IBM PAN było drugim miejscem pracy) **w tym 62 pracowników naukowych.**
W Instytucie Biologii Medycznej PAN jako głównym miejscu pracy były zatrudnione 76 osoby, w tym 59 pracowników naukowych.

Pracownicy naukowi Instytutu:

- **4 osoby z tytułem profesora**: Czesław Cierniewski, czł. koresp. PAN
  Jarosław Dziadek,
  Zbigniew J. Leśnikowski,
  Jolanta B. Zawilska.

- **6 osób ze stopniem naukowym doktora habilitowanego na stanowisku profesora nadzwyczajnego – profesora IBM PAN**:
  Maciej Cedzyński,
  Jarosław Dastych,
  Magdalena Klink,
  Paweł Parniewski,
  Zofia Sułowska,
  Anna St. Świerzko.
- **1 osoba ze stopniem naukowym doktora habilitowanego na stanowisku adiunkta:**
  Łukasz Pułaski

- **23 osoby ze stopniem naukowym doktora,**
  28 osób ze stopniem magistra na etacie **asystenta**
- **1 osoba ze stopniem magistra na etacie biologa – z otwartym przewodem doktorskim (**w Uniwersytecie Łódzkim)

- **1 osoba – pracownik biblioteczny (archiwista),**
- **12 osób – pracownicy organizacyjno-finansowi i administracyjni**
- **4 osoby – pracownicy zatrudnieni na stanowisku robotnika**

  3 osoby na dzień 31.12.2010 rok przebywały na urlopach bezpłatnych
  1 osoba na dzień 31.12.2010 rok przebywały na urlopie wychowawczym

Zatrudnienie ogółem średnioroczne w przeliczeniu na pełne etaty wynosi ogółem **68,74** w tym **54,53** naukowych.

ZATRUDNIENIE wg tytułów i stopni – PRACOWNICY NAUKOWI na dzień 31.XII.2010

Stanowisko	Liczba OSÓB	Liczba etatów	Etaty			
			M		K	
			osoby	etaty	osoby	etaty
PROFESOR w tym 2 osoby – IBM II-gie miejsce pracy	4	4	3	3	1	1
DOKTOR HABILITOWANY	7	7	4	4	3	3
DOKTOR w tym 1 osoba – IBM II-gie miejsce pracy	23	21,91	3	3	20	18,91
MAGISTER	28	26,66	7	7	21	19,66
RAZEM NAUKOWI na dzień 31.XII.2010	**62**	**59,57**	**17**	**17**	**45**	**42,57**
Magister -Biolog	1	1	0	0	1	1
RAZEM B+R na dzień 31.XII.2010	**63**	**60,57**	**17**	**17**	**46**	**43,57**

ZATRUDNIENIE wg stanowisk - PRACOWNICY NAUKOWI na dzień 31.XII.2010

Stanowisko	Liczba OSÓB	Liczba etatów	Etaty			
			M		K	
			osoby	etaty	osoby	etaty
PROFESOR w tym 2 osoby – IBM II-gie miejsce pracy	4	4	3	3	1	1
PROFESOR IBM PAN (profesor nadzwyczajny)	6	6	3	3	3	3
ADIUNKT	15	14,66	3	3	12	11,66
ASYSTENT w tym 2 osoby – IBM II-gie miejsce pracy	37	34,91	8	8	29	26,91
RAZEM NAUKOWI na dzień 31.XII.2010	**62**	**59,57**	**17**	**17**	**45**	**42,57**
Biolog	1	1	0	0	1	1
RAZEM B+R na dzień 31.XII.2010	**63**	**60,57**	**17**	**15**	**46**	**43,57**

OGÓŁEM ZATRUDNIENIE na dzień 31.XII.2010

Stanowiska	Liczba OSÓB	Liczba etatów	Etaty			
			M		K	
			osoby	etaty	osoby	etaty
PROFESOR w tym 2 osoby – IBM II-gie miejsce pracy	4	4	3	3	1	1
PROFESOR IBM PAN (profesor nadzwyczajny)	6	6	3	3	3	3
ADIUNKT	15	14,66	3	3	12	11,66
ASYSTENT w tym 2 osoby – IBM II-gie miejsce pracy	37	34,91	8	8	29	26,91
RAZEM NAUKOWI na dzień 31.XII.2010	**62**	**59,57**	**17**	**17**	**45**	**42,57**
Magister -Biolog	1	1	0	0	1	1
RAZEM B+R na dzień 31.XII.2010	**63**	**60,57**	**17**	**17**	**46**	**43,57**
PRACOWNICY ORGANIZACYJNO-FINANSOWI, ADMINISTRACYJNI	**13**	**12,13**	**2**	**1,55**	**11**	**11,08**
PRACOWNICY OBSŁUGI	4	3,5	1	1	3	2,5
RAZEM NIENAUKOWI na dzień 31.XII.2010	**17**	**15,63**	**3**	**2,55**	**14**	**13,58**
OGÓŁEM ZATRUDNIENIE na dzień 31.XII.2010	**80**	**76,2**	**20**	**19,55**	**60**	**57,15**

FINANSE
Instytutu Biologii Medycznej PAN w 2010 r.

Przychody ogółem	**12 786 661,98**
Działalność statutowa	2 928 688,36
Projekty badawcze krajowe i zagraniczne	5 173 432,03
Dotacje na sfinansowanie odpisów amortyzacyjnych	1 517 145,97
Przychody z działalności usługowej	279 708,84
Przychody finansowe	81,37
Pozostałe przychody (zmiana stanu produktów, pozostałe przychody operacyjne)	2 887 605,41
Koszty poniesione	**12 708 416,17**
Amortyzacja ogółem	2 344 660,92
Zużycie materiałów i energii	2 837 078,66
Wynagrodzenia	5 002 895,78
Ubezpieczenie społeczne i inne świadczenia	828 273,85
Podatki i opłaty	689 692,20
Usługi obce	773 054,15
Koszty finansowe	34 710,62
Pozostałe koszty	198 049,99
Wynik finansowy brutto zysk:	**78 245,81**
Podatek dochodowy	**6 812,00**
Wynik finansowy netto zysk:	**71 433,81**

Stan środków pieniężnych na koncie oraz w kasie Instytutu Biologii Medycznej PAN wg stanu na dzień 31.12.2010 r.

1.	Stan środków w kasie IBM PAN	13 827,80
2.	Stan środków na kontach bankowych IBM PAN	1 270 105,37
	Razem: w tym: - projekty badawcze krajowe i zagraniczne 1 283 933,17 zł	**1 283 933,17**

Wysokość dotacji na finansowanie podstawowej działalności statutowej, przyznana Instytutowi Biologii Medycznej PAN na rok 2010 decyzją MNiSW Nr 3498/E-621/S/2010-1, wyniosła 3 038 072,00 zł.

Informacja o prowadzonych badaniach w Instytucie Biologii Medycznej PAN w 2010 roku

Wybrane ważniejsze wyniki badań

projektów zrealizowanych i rozliczonych w roku sprawozdawczym - 2010 (opis maks. 500 znaków ze spacjami)

- W badaniach prowadzonych we współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu wykryto nowe, naturalne (pochodzenia bakteryjnego) ligandy dla fikoliny H. Wykazano, że w postaci koniugowanej z albuminą mogą one służyć do oznaczania stężenia i aktywności fikoliny H oraz pozyskiwania i oczyszczania tego białka z płynów ustrojowych, co jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. (MC)

- Po raz pierwszy wykazaliśmy, że w komórkach PAI-1 jest w kompleksie ze strukturą 20S proteasomu, co więcej moduluje jego właściwości proteolityczne. Prawdopodobnie PAI-1 poprzez formowanie ,"agresomów"(agregatów białkowych) blokuje zdolność degradacyjną proteasomu, co może mieć szczególne znaczenie np., w procesie apoptozy komórek śródbłonka, zachodzącej podczas wielu zjawisk biologicznych, zarówno fizjologicznych (gojenie ran, angiogeneza), jak i patologicznych (miażdżyca tętnic).(CC)

- Opracowano ogólną metodę syntezy bibliotek nukleozydów modyfikowanych klasterami boru, do badan biologicznych, z wykorzystaniem reakcji ligacji chemicznej („click hemistry").(ZJL)

- W neuronach i astrocytach kory mózgowej szczura wykazano ekspresję receptorów hipokretynowych Hcrtr-1 i Hcrtr-2. W pierwotnych hodowlach neuronalnych kory mózgowej szczura hipokretyna-1, agonista receptorów Hcrtr-1 i Hcrtr-2, i [Ala^{11}-*D*-Leu^{15}]-hipokretyna-2, selektywny agonista receptorów Hcrtr-2, hamowały w sposób zależny od stężenia wzrost syntezy cAMP wywołany forskolinę, neuropeptydy - PACAP i VIP. Działanie hipokretyn znosiła toksyna krztuśca oraz związek TCS OX2 29, selektywny antagonista receptorów Hcrtr-2 oraz. SB 408124, selektywny antagonista receptorów Hcrtr-1, był nieaktywny. Hipokretyna-1 stymulowała syntezę inozytolo-(1,4,5)-trisfosforanu w hodowlach neuronalnych. (JBZ)

- U osób z zaawansowanym rakiem jajnika (FIGOIII/IV) wzmożona aktywność biologiczna neutrofilów krwi obwodowej jest spowodowana preaktywacją neutrofilów przez komórki nowotworowe po ich przeniknięciu do krwioobiegu podczas przerzutu. Pobudzenie neutrofilów zależy od interakcji Hsp72 produkowanego przez komórki nowotworowe z receptorami TLR2 i TLR4 obecnymi na powierzchni neutrofilów. Poznanie biologicznej roli cząsteczek obecnych na komórkach nowotworowych modyfikujących swoiste funkcje leukocytów może w przyszłości przyczynić się do uzupełnienia terapii stosowanej w leczeniu raku jajnika. (ZS)

Sprawozdania

z realizacji zadań statutowych

Tematy badawcze realizowane w ramach działalności statutowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w roku 2010 w

Zadanie badawcze realizowane w ramach działalności statutowej w 2010 roku

	Tytuł tematu badawczego	Kierownik projektu	Okres realizacji	Koszt projektu[1)]
	KONTYNUOWANE			
1.	**Wpływ hipoksji na proces aktywacji komórek tucznych in vitro.**	dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN	01.01.2010 31.12.2010	238 027,90
2.	**Opracowanie nowej metody analizy epidemiologicznej groźnych patogenów bakteryjnych w tym prątków gruźlicy oraz uropatogennych szczepów E. Coli z zastosowaniem technologii TRS-PCR oraz multiplex-PCR.**	dr hab. Paweł Parniewski prof. IBM PAN	01.01.2010 31.12.2010	213 317,48
3.	**Aktywność biologiczna leukocytów krwi obwodowej w odpowiedzi na kontakt z komórkami nowotworowymi w badaniach** *in vitro*.	dr hab. Zofia Sułowska prof. IBM PAN	01.01.2010 31.12.2010	348 081,90
4.	**Wpływ hipokretyn (oreksyn) na syntezę cAMP i inne szlaki transdukcji sygnału w hodowlach neuronów i komórek glejowych z mózgu szczura.**	prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska	01.01.2010 31.12.2010	251 716,51
	NOWE			
5.	**Badanie znaczenia polimorfizmów genów *TLR2* i *TLR4* w nawracających zakażeniach u dzieci.**	dr hab. Maciej Cedzyński prof. IBM PAN	01.01.2010 31.12.2010	339 756,93
6.	**Wpływ matryny-3 na fenotyp komórkowy**.	prof. dr hab. Czesław Cierniewski	01.01.2010 31.12.2010	461 458,91
7.	**Niezwykłe struktury DNA jako wewnętrzne mutageny w genomie mykobakterii**.	prof. dr hab. Jarosław Dziadek.	01.01.2010 31.12.2010	396 409,17
8.	**Badania zależności struktura-właściwości fizykochemiczne i biologiczne nukleozydów modyfikowanych klasterami boru**	prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski	01.01.2010 31.12.2010	277 671,32
9.	**Opracowanie testu ilościowego do wykrywania wirusa paragrypy typu 3 metodą PCR w czasie rzeczywistym.**	prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski	01.01.2010 31.12.2010	186 091,73
10	**Charakterystyka mechanizmów transkrypcyjnej regulacji genów związanych z rzadkimi chorobami genetycznymi jako sposób wyjaśniania funkcji tych genów.**	dr hab. Łukasz Pułaski	01.01.2010 31.12.2010	210 077,16
			Razem	**2 922 609,01**

[1)] na okres realizacji przewidywany przez MNiSW

Sprawozdanie z realizacji poszczególnych zadań badawczych

K O N T Y N U O W A N E tematy badawcze realizowane w 2010

TEMAT 1
Tytuł: Wpływ hipoksji na proces aktywacji komórek tucznych in vitro.
Kierownik: dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN

W roku 2010 w badaniach nad tym tematem przeprowadzono analizę ekspresji receptorów z rodziny TLR na powierzchni komórek tucznych linii HMC-1. Badanie przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że w spoczynkowych komórkach HMC-1 poziom ekspresji receptorów TLR-2 i TLR-4 jest bardzo niski i w większości przeprowadzonych doświadczeń nie przekracza poziomu detekcji. Po inkubacji komórek tucznych HMC-1 z estrem forbolu (PMA) lub lipopolisacharydem (LPS) dochodziło do znaczącego wzrostu ekspresji powierzchniowej obydwu badanych receptorów. Narażenie komórek tucznych na hipoksję nie pobudzało ekspresji powierzchniowej receptorów TLR ani nie modulowało pobudzającego efektu PMA i LPS na poziom ekspresji TLR. Badania są kontynuowane.

TEMAT 2
Tytuł: Opracowanie nowej metody analizy epidemiologicznej groźnych patogenów bakteryjnych w tym prątków gruźlicy oraz uropatogennych szczepów E. coli z zastosowaniem technologii TRS-PCR oraz multiplex-PCR.
Kierownik: dr hab. Paweł Parniewski prof. IBM PAN

W ramach kontynuacji prowadzonych badań statutowych enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* (EPEC) wykonano pełną analizę ERIC-PCR i CGG-PCR dla ponad 100 szczepów w posiadanej kolekcji. Zastosowana procedura ERIC-PCR pozwoliła wykazać, że uzyskiwane profile prążkowe grupują się w postaci dwóch klastrów. W pierwszym, najbardziej licznym, przeważają szczepy należące do grupy filogenetycznej B2, w drugim szczepy z podgrupy D. Pozostałe szczepy z badanej kolekcji grupują się w małoliczne klastry lub pozostaje niesklastrowana.
Natomiast analiza CGG-PCR pozwoliła wykazać, że badane szczepy wyraźnie grupują się w postaci trzech klastrów. Pierwszy klaster - 55 szczepów należących głownie do grupy B2, drugi klaster - 28 szczepów należących głównie do grupy D oraz grupa 18 szczepów należących do grup filogenetycznych A, B1 i D. Uzyskane wyniki pozwoliły wstępnie stwierdzić, że analiza CGG-PCR pozwala na dokładniejszą i bardziej specyficzną charakterystykę epidemiologiczną zgromadzonych szczepów w porównaniu do analogicznych badań z wykorzystaniem techniki ERIC-PCR.

Zgromadzoną wcześniej kolekcję szczepów Mycobacterium kansasii zanalizowano z wykorzystaniem techniki TRS-PCR. W tym celu przeprowadzono 8 odrębnych testów stosując startery oligonukleotydowe zawierające GC-bogate sekwencje TRS. Dla wszystkich testów przeprowadzono kompleksowe analizy podobieństwa uzyskanych wzorów prążkowych. Pozwoliło to wykazać, że niezależnie od użytego startera badane szczepy charakteryzują się dużym

podobieństwem profili produktów TRS-PCR. Z drugiej strony, wykonane analizy dały podstawy do zakwestionowania przynależności kilku szczepów do gatunku M. kansasii.

TEMAT 3

Tytuł: Aktywność biologiczna leukocytów krwi obwodowej w odpowiedzi na kontakt z komórkami nowotworowymi w badaniach *in vitro*.

Kierownik: dr hab. Zofia Sułowska prof. IBM PAN

Prowadzone badania są kontynuacją badań nad wyjaśnieniem mechanizmów oddziaływania komórek nowotworowych izolowanych z guza jajnika z neutrofilami krwi obwodowej. Celem badań jest poznanie biologicznej roli cząsteczek obecnych na komórkach nowotworowych w regulacji swoistych funkcji neutrofilów – komórek, które mogą aktywnie uczestniczyć nie tylko w reakcjach przeciwnowotworowych, ale być może również w progresji nowotworu. W toku prowadzonych badaniach stworzono w Pracowni Immunologii Doświadczalnej własną kolekcję komórek nowotworowych izolowanych z guzów jajnika.

Badania te w szczególności dotyczyły:

- udziału białek szoku termicznego Hsp72 obecnych i produkowanych przez komórki nowotworowe w pobudzeniu i/lub regulacji aktywności biologicznej neutrofilów krwi obwodowej po ich bezpośrednim wzajemnym kontakcie oraz w odpowiedzi na pobudzenie znanymi stymulatorami (PMA lub fMLP),
- roli receptorów TLR2 i TLR4 we wzajemnych oddziaływaniach komórka nowotworowa/neutrofil.
- oceny adhezji neutrofilów izolowanych z krwi chorych do komórek nowotworowych izolowanych z guza jajnika
- oceny adhezji neutrofilów zdrowych dawców do komórek raka jajnika

Miarą aktywności biologicznej neutrofilów była ich zdolność do produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) oraz ich zdolność do adhezji do komórek nowotworowych. Stwierdzono, że komórki nowotworowe pre-aktywują neutrofile to wzmożonej produkcji RFT po pobudzeniu ich przez fMLP i PMA. Zablokowanie ekspresji TLR2 i TLR4 na neutrofilach jak również zablokowanie ekspresji Hsp72 na komórkach nowotworowych znosi zdolność komórek nowotworowych do preaktywacji neutrofilów. Zjawiska tego nie obserwowano, gdy ekspresja Hsp72 na komórkach nowotworowych nie była blokowana swoistymi przeciwciałami. Wykazano ponadto, że inkubacja neutrofilów z ludzkim rekombinantowym białkiem Hsp72 (hrHsp72), po zablokowaniu ekspresji TLR2 i TLR4, przyczynia się do wzmożenia produkcji RFT w neutrofilach na poziomie podobnym do tego uzyskiwanego po inkubacji z komórkami nowotworowymi. Potwierdza to, że preaktywacja neutrofilów przez komórki nowotworowe, zależy od interakcji Hsp72 produkowanego przez komórki nowotworowe z receptorami TLR2 i TLR4 obecnymi na powierzchni neutrofilów.

Adhezję komórek oceniano metodą obrazowania fluorescencji przy użyciu mikroskopu Nikon ECLIPSE TE 2000-U. Adhezję komórek oznaczano przy użyciu programu do dokumentacji i analizy obrazu mikroskopowego NIS Elements 3.0. Świecące komórki (odpowiadające w obrazie mikroskopowym adherującym, znakowanym CFSE neutrofilom), są liczone, a dane z poszczególnych pól sumowane i uśredniane przez program. W celu identyfikacji komórek

nowotworowych wykonywano zdjęcia w świetle kontrastowym, które następnie łączono komputerowo z odpowiadającymi im obrazami neutrofilów znakowanych CSFE. W ten sposób odróżniano adhezję neutrofilów do komórek nowotworowych od ich adhezji do wolnych miejsc między komórkami. Wykorzystane w badaniach komórki w 99% wykazywały obecność antygenu EpCAM oraz wysoką ekspresję cząsteczki ICAM-1, utrzymującą się podczas hodowli.
Przeprowadzone badania pokazały, że preinkubacja neutrofilów (izolowanych od chorych) z przeciwciałami monoklonalnymi wiążącymi się, odpowiednio: z cząsteczkami adhezyjnymi CD11b, CD11a, selektyną L (CD62L), ligandem dla selektyny P (PSGL-1) wpływa na oddziaływanie pomiędzy neutrofilami i komórkami izolowanych z guza jajnika, czego efektem jest zahamowanie adhezji neutrofilów do komórek nowotworowych. Należy zaznaczyć, że na powierzchni komórek nowotworowych nie stwierdzono obecności cząsteczki PSGL-1, dlatego udział tej cząsteczki w oddziaływaniu neutrofil/komórka nowotworowa wymaga jeszcze wyjaśnienia w kontekście stwierdzonego zahamowania adhezji neutrofilów do komórek nowotworowych po inkubacji z przeciwciałami wiążącymi się z PSGL-1.

Uzyskane w toku realizacji zadań statutowych wyniki badań, stały się punktem wyjścia zgłoszonego do MNiSW projektu, wniosku grantowego pt. 'Donory tlenku azotu, jako czynnik wspomagający działanie przeciwnowotworowe związków stosowanych w terapii raka jajnika" zakwalifikowanego w grudniu 2010 roku do finansowania; N N407 095840 kierownik Dr hab. Magdaleny Klink.

TEMAT 4

Tytuł: Wpływ hipokretyn (oreksyn) na syntezę cAMP i inne szlaki transdukcji sygnału w hodowlach neuronów i komórek glejowych z mózgu szczura.
Kierownik: prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska

Analizowano wpływ hipokretyn na komórki glejaka C6. W hodowlach glejaka C6 hipokretyna-1 i [Ala^{11}-*D*-Leu^{15}]-hipokretyna-2 hamowały syntezę cAMP. Hipokretyna-1 zmniejszała przeżywalność komórek glejaka, zmiany wywołane prze hipokretynę-2 były niezamienne statystycznie. Oba peptydy nie wpływały na proliferację komórek C6.

N O W E tematy badawcze realizowane w 2010

TEMAT 5

Tytuł: Badanie znaczenia polimorfizmów genów *TLR2* i *TLR4* w nawracających zakażeniach u dzieci.
Kierownik: doc. dr hab. Maciej Cedzyński prof. IBM PAN

Zakażenia układu oddechowego są najczęstszą przyczyną zgłoszeń dzieci do lekarzy w opiece otwartej oraz jedną z głównych przyczyn hospitalizacji. Wśród czynników sprzyjających

zapaleniom układu oddechowego oprócz niedojrzałego układu odpornościowego dziecka i łatwego kontaktu z czynnikami infekcyjnymi należy zaliczyć czynniki środowiskowe, predyspozycje genetyczne, współistniejące choroby alergiczne, niedobory enzymatyczne, choroby metaboliczne (np. mukowiscydoza), wady anatomiczne, niektóre choroby laryngologiczne i układu krążenia. Choroby alergiczne związane z zaburzeniami funkcjonowania układu oddechowego, to przede wszystkim alergiczny nieżyt nosa i astma oskrzelowa. Wcześniejsze badania autorów udowodniły, że w patogenezie nawracających zakażeń układu oddechowego u dzieci ważną rolę mogą odgrywać niedobory lektyny wiążącej mannan (MBL) oraz fikoliny L. Realizacja zadania stanowiła rozszerzenie programu badawczego Pracowni Immunobiologii Zakażeń, dotyczącego wpływu niedoborów czynników odporności wrodzonej na podatność dzieci na zakażenia układu oddechowego. Receptory Toll-podobne należą do grupy PRR (pattern recognition receptors). Cząsteczki typu TLR4 zlokalizowane są między innymi na powierzchni leukocytów. Rozpoznają takie cząsteczki, jak lipopolisacharydy, peptydoglikan, wielocukry otoczkowe, białka fimbrii, kwasy lipotejchojowe, białka szoku termicznego, osłonek wirusowych i dwuniciowe RNA. Umożliwiają rozpoznanie wielu chorobotwórczych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz wirusów. Udział receptorów TLR4 w aktywacji komórek układu odpornościowego ma znaczenie w rozwoju reakcji zapalnej. Receptor TLR2 zlokalizowany jest na powierzchni komórek mieloidalnych, tucznych, dendrytycznych, NK, limfocytów T oraz fagolizosomów. Może tworzyć heterodimery z cząsteczkami TLR6, TLR1 oraz CD36. Jego swoistość jest bardzo szeroka: rozpoznaje kwasy lipotejchojowe, peptydoglikan, lipopolisacharyd, lipoarabinomannan i lipomannan mikobakterii, zymozan oraz liczne glikolipidy, lipoproteiny, glikoproteiny i fosfolipidy bakterii grzybów, pierwotniaków i wirusów. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphisms, SNP) genów odpowiedzialnych za syntezę receptorów Toll-podobnych, jako pierwotne niedobory odporności, mogą przyczyniać się do nasilenia podatności na infekcje. Mutacje genu *TLR4* powodujące substytucję aminokwasów w pozycjach 299 i 399 (Asp299Gly i Thr399Ile), występujące w sprzężeniu, wpływają na ryzyko zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi. Sugeruje się, że mogą przyczyniać się do rozwoju sepsy lub cięższego jej przebiegu (łącznie z wystąpieniem wstrząsu), nie tylko w zakażeniach bakteryjnych, ale też kandydozach. Polimorfizm Arg753Gln genu *TLR2* może nasilać ryzyko wystąpienia wstrząsu septycznego, w następstwie zakażenia bakteriami Gram-dodatnimi.

Polimorfizm genu *TLR4* (pozycja 299) badano u 93 dzieci z nawracającymi zakażeniami układu oddechowego (w tym 49 dzieci bez towarzyszących chorób alergicznych – grupa 1, 30 z astmą/alergicznym nieżytem nosa – grupa 1-A i 14 z innymi typami alergii – grupa 1-I) oraz 122 dzieci, u których nie występowały nawracające infekcje (w tym 37 zdrowych, stanowiących grupę kontrolną - K, 35 z astmą/alergicznym nieżytem nosa - grupa 2-A i 50 z innymi typami alergii – grupa 2-I) (łącznie przebadano 215 prób). Polimorfizm genu *TLR2* (pozycja 753) badano u 103 dzieci z nawracającymi zakażeniami układu oddechowego (w tym 56 dzieci bez towarzyszących chorób alergicznych, 33 z astmą/alergicznym nieżytem nosa i 14 z innymi typami alergii) oraz 138 dzieci, u których nie występowały nawracające infekcje (w tym 41 zdrowych, stanowiących grupę kontrolną, 41 z astmą/alergicznym nieżytem nosa i 56 z innymi typami alergii) (łącznie przebadano 241 prób).

W żadnej z badanych prób nie stwierdzono mutacji obu alleli genu *TLR4*. W grupie kontrolnej nie zaobserwowano także heterozygot względem polimorfizmu Asp299Gly. Mutacje takie wykryto u 14% dzieci z nawracającymi zakażeniami ($p=0.02$). Po uwzględnieniu podziału na wspomniane

wyżej podgrupy, odsetek heterozygot wynosił odpowiednio: 1 – 8.2% (p=0.13); 1-A – 16.7% (p=0.01); 1-I – 28.6% (p=0.004). Wśród dzieci z chorobami alergicznymi, u których nie dochodziło do nawracania zakażeń wykryto 23.5% heterozygot (p<0.0001), w tym 28.6% w grupie 2-A (p=0.0003) oraz 20% w grupie 2-I (p=0.004). Ponadto, zaobserwowano istotnie wyższą częstość występowania badanej mutacji wśród dzieci z chorobami alergicznymi (niezależnie od nawracania zakażeń, połączone grupy 1-A, 1-I, 2A, 2-I) niż w grupie kontrolnej (p=0.0004).

Żadne z badanych dzieci nie było homozygotą z mutacją genu *TLR2* powodującą zamianę reszty Arg na Gln w pozycji 753. W grupie kontrolnej wykryto 9.8% heterozygot. Porównanie częstości występowania badanego polimorfizmu nie wykazało istotnych różnic pomiędzy dziećmi zdrowymi (K) i poszczególnymi grupami pacjentów. Odsetek heterozygot w grupach tych wynosił: 10.7% (grupa 1; p=1); 3.0% (1-A, p=0.37); 14.3% (1-I, p=0.63); 2.4%, (2-A, p=0.36); 7.1% (2-I, p=0.72).

Uzyskane wyniki sugerują, że badana mutacja genu *TLR4* może mieć związek z występowaniem chorób alergicznych. Heterozygoty z mutacjami *TLR2* lub *TLR4* wydają się nie być bardziej podatne na zakażenia układu oddechowego niż homozygoty bez mutacji.

TEMAT 6

Tytuł: Wpływ matryny-3 na fenotyp komórkowy.

Kierownik: prof. dr hab. Czesław Cierniewski

Białko jądrowe, matryna 3, zawiera dwie domeny wiążące DNA typu C2H2 oraz dwa tandemowe motywy wiążące RNA. Jedną z podstawowych funkcji tego białka jest udział w przetwarzaniu RNA do różnych form dojrzałych, a także regulacja retencji edytowanego RNA w obrębie jądra. Matryna 3 posiada również motyw NLS umożliwiający jej lokalizację w jądrze oraz kilka reszt tyrozynowych i serynowych lub treoninowych, które ulegają fosforylacji. Co więcej wydaje się, że matryna 3 pełni funkcję białka adaptorowego i oddziałuje z licznymi jądrowymi białkami ułatwiając ich działanie. Wśród nich są białka, które biorą udział w metabolizmie RNA, reorganizacji chromatyny, translacji białek, replikacji i naprawie DNA, a także w apoptozie. Aby ocenić w jakim stopniu matryna 3 uczestniczy w kontrolowaniu pro- i anty-apoptotycznych reakcji w komórkach śródbłonka, oceniliśmy wpływ zmiany ekspresji matryny 3 na zachowanie się markerów apoptozy. W tym celu komórki EAhy.926 transfekowane były siRNA dla matryny 3 i komórki apoptotyczne identyfikowane były za pomocą testu wykrywającego Aneksynę V. Ponieważ barwienie aneksyny V za pomocą odpowiednich przeciwciał nie pozwala rozróżnić komórek apoptotycznych i nekrotycznych, te ostatnie były barwione równolegle jodkiem propidyny. Transfekcja komórek $siRNA_{Mtr3}$ tylko w niewielkim stopniu (z 0,9% do 1.8%) zwiększała liczbę komórek apoptotycznych, podczas gdy ilość komórek nekrotycznych wzrastała w znacznie większym stopniu (z 5,2% do 11.6%). Cechą charakterystyczną apoptozy jest towarzyszący jej rozkład polimerazy poliADP-rybozy (PARP) katalizowany przez kaspazy. Taki rozkład PARP obserwowaliśmy wówczas, gdy komórki śródbłonka były inkubowane w obecności staurosporyny lub camptotecyny. W odróżnieniu od tych pro-apoptotycznych czynników, transfekcja komórek śródbłonka $siRNA_{Matr3}$ nie aktywowała

kaspazy 3, tak więc samo obniżenie ekspresji matryny 3 było wystarczające do tego, aby zahamować proliferację komórek i wywołać ich nekrozę.

TEMAT 7

Tytuł: Niezwykłe struktury DNA jako wewnętrzne mutageny w genomie mykobakterii.
Kierownik: prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Doniesienia literaturowe ostatnich lat wskazują, że sekwencje DNA przyjmujące in vivo struktury inne niż B-DNA mogą stanowić bardzo istotny endogenny czynnik wpływający na niestabilności genomu. Niestabilności te mogą się objawiać ekspansją lub delecją fragmentów łańcuchów DNA, do których dochodzi podczas procesów komórkowych: replikacji, rekombinacji jak i naprawy uszkodzeń DNA.
Realizując zadanie badawcze poszukiwano sekwencji potencjalnie tworzących niezwykłe struktury DNA, naturalnie występujących w genomach Mycobacterium oraz badano wpływ obecności konkretnych egzogennych sekwencji tworzących niezwykłe struktury na niestabilność genomu mykobakterii, analizując udział poszczególnych systemów naprawy DNA w przezwyciężaniu tych niestabilności.
W badaniach in silico zidentyfikowano w genomach *E. coli*, *M. smegmatis* oraz M. *tuberculosis* sekwencje powtórzone tandemowo, powtórzenia bezpośrednie, powtórzenia odwrócone, sekwencje potencjalnie tworzące tetrapleksy. Do badań eksperymentalnych wybrano sekwencje nadreprezentowane w genomie badanych gatunków bakterii – proste i odwrócone powtórzenia.
Konstrukcja plazmidów noszących sekwencje mogące tworzyć niezwykłe struktury DNA polegała na wklonowaniu oligonukleotydowych sekwencji w pojedyncze miejsce rozpoznawane przez endonukleazę EcoRI, znajdujące się w genie hph, kodującym oporność na Hyg (HygR), uprzednio wklonowanym do wyjściowych plazmidów pMV206Km i pMV306Km. Oligonukleotydowe sekwencje wklonowane zostały w orientacji umożliwiającej utworzenie:

- powtórzeń odwróconych IR, bądź
- powtórzeń bezpośrednich DR

z sekwencjami otaczającymi miejsce cięcia przez enzym EcoRI znajdujące się wewnątrz genu hph (HygR).
Dodatkowo, sekwencje tworzące dwa powtórzenia bezpośrednie bądź dwa moduły powtórzeń odwróconych, rozdzielone zostały genem aacC1, kodującym oporność na Gm (GmR), wklonowanym w orientacjacji A i B, a z obu stron zinaktywowanego genu hph (HygR) otoczone sąsiedztwem genów markerowych: lacZ i aph (KmR). Konstruowanie mykobakteryjnych plamidów samoreplikujących noszących analizowane sekwencje przebiegało wieloetapowo. Rekombinowanymi plazmidami transformowano komórki kompetentne E. coli Top10, a otrzymane kolonie przesiano równolegle na podłoża zawierające dodatek Km i na podłoża zawierające dodatek Hyg celem sprawdzenia utraty oporności na Hyg. Z wybranych transformantów KmR HygS wyizolowano plazmidowy DNA, który sprawdzono w żelu poliakryloamidowym. Analiza restrykcyjna z zastosowaniem enzymu EcoRI wykazała obecność włączonych do plazmidu pEW1 syntetycznych oligonukleotydów. Sekwencje i orientację wklonowanych syntetycznych oligonukleotydów zweryfikowano sekwencjonowaniem DNA uzyskanych plazmidów, wykorzystując odpowiednie startery.

Otrzymane plazmidy nazwano odpowiednio pEW5 (plazmid pEW1 noszący sekwencje zdolne do tworzenia struktury krzyżowej, wklonowane wewnątrz genu hph, warunkującego oporność na Hyg) i pEW7 (plazmid pEW1 noszący sekwencje zdolne do tworzenia struktury poślizgowej, wklonowane wewnątrz genu hph).
Następnie, plazmidy pEW5 i pEW7 poddano trawieniu z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego ScaI w celu wklonowania genu aacC1 warunkującego oporność na Gm (GmR). Miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez ten enzym znajduje się wewnątrz wklonowanej syntetycznej sekwencji i rozdziela oligosekwencje tworzące powtórzenia, odpowiednio dwa powtórzenia bezpośrednie bądź układ dwóch powtórzeń odwróconych. W celu pozyskania genu aacC1 (~1100 pz), wektor pINT3 strawiono endonukleazą SmaI. Uzyskany gen aacC1 zligowano z DNA plazmidów pEW5 i pEW7, uprzednio zliniowanych i wtransformowano do komórek kompetentnych E. coli Top10, a następnie wysiano na podłoża selekcyjne zawierające dodatek Km i Gm. Z wybranych kolonii opornych na Km i Gm wyizolowano plazmidowy DNA. Preparaty plazmidowego DNA rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym oraz strawiono restrykcyjnie enzymami ClaI i PmeI, co pozwoliło na potwierdzenie obecności wklonowanego genu aacC1 (GmR) oraz enzymem EcoRV, co pozwoliło na sprawdzenie jego orientacji.
Uzyskane w ten sposób plazmidy pEW5 i pEW7 z genem aacC1 (GmR) wklonowanym w orientacji A i B pomiędzy oligosekwencje tworzące powtórzenia nazwano odpowiednio pEW9, pEW11, pEW13 i pEW15.

W kolejnym etapie, plazmid pGOAL17 strawiono przy użyciu endonukleaz restrykcyjnych BamHI i XbaI, w celu wycięcia z niego sekwencji zawierającej promotor genu lacZ (Pag85, ~250 pz). Sekwencję tę wklonowano następnie do plazmidów pEW9, pEW11, pEW13 i pEW15 strawionych tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Mieszaninę ligacyjną wtransformowano do komórek kompetentnych E. coli Top10, a selekcję transformantów przeprowadzono na podłożach stałych z dodatkiem Km i Gm. Z wybranych kolonii wyizolowano plazmidowy DNA, który następnie poddano analizie w żelu agarozowym. Obecność promotora Pag85 w plazmidach pEW9, pEW11, pEW13 i pEW15 potwierdzono trawieniem restrykcyjnym enzymami BamHI i XbaI. Uzyskane plazmidy nazwano pEW17, pEW19, pEW21 i pEW23.

Otrzymane plazmidy pEW17, pEW19, pEW21 i pEW23 zliniowano enzymem restrykcyjnym BamHI. Tym samym enzymem wycięto gen lacZ (~3000 pz) z plazmidu pGOAL17 i poddano procesowi ligacji z każdym ze zliniowanych plazmidów: pEW17, pEW19, pEW21 i pEW23. Mieszaninę ligacyjną wtransformowano do komórek kompetentnych E. coli Top10, które wysiano na stałe podłoża selekcyjne zawierające dodatek Km, Gm i Xgal. Pozwoliło to wyodrębnić kolonie charakteryzujące się ekspresją genów markerowych (genu aph, genu aacC1, genu lac Z). Następnie, z wybranych niebieskich kolonii KmR wyizolowano plazmidowy DNA. Formę superskręconą plazmidu, a następnie produkt trawienia restrykcyjnego enzymem BamHI, poddano analizie w żelu agarozowym.
Uzyskane rekombinowane plazmidy nazwano pEW25, pEW27, pEW29.
Tak przygotowane rekombinowane plazmidy zostaną wykorzystane w badaniach niestabilności prostych i odwróconych powtórzeń w genomie mykobakterii.

TEMAT 8

Tytuł: Badania zależności struktura-właściwości fizykochemiczne i biologiczne nukleozydów modyfikowanych klasterami boru.

Kierownik: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Badanie lipofilowości koniukatów nukleozydów i metalokarboranu zawierającego w swojej strukturze jon renu, metodą RP-TLC. Do badań lipofilowości wykorzystano pochodną urydyny i tymidyny modyfikowane metalokarboranem zawierajacym w swojej strukturze jon renu oraz ligandy karbonylowe. W przypadku pochodnej urydyny grupa metalokarboranylowa przyłączona została w pozycji 2' reszty cukrowej nukleozydu. Natomiast tymidyna posiadała grupę metalokarboranylową przyłączoną, za pomocą łącznika propylowego, do atomu azotu 3 zasady nukleinowej. Badania lipofilowości przeprowadzono również dla nukleozydów niemodyfikowanych: urydyny i tymidyny. Do badania lipofilowości wykorzystano chromatografię cienkowarstwową z odwróconym układem faz (**RP-TLC**), w układzie rozwijającym acetonitryl/woda w różnym zakresie stężeń obu składników. Z otrzymanych danych eksperymentalnych wyznaczono parametr chromatograficzny R_{M0} będący względną miarą lipofilowości. **Wykorzystanie koniugatu 2'-deoksyadenozyny i metalokarboranu zawierającego w swojej strukturze jon żelaza do detekcji elektrochemicznej hybrydyzacji DNA.** Koniugat 2'-deoksyadenozyny i metalokarboranu zawierającego jon żelaza zastosowano do syntezy modyfikowanego oligonukleotydu, wykorzystanego następnie w detekcji elektrochemicznej hybrydyzacji DNA. Badania elektrochemiczne przeprowadzono metodami woltamperometrycznymi, z elektrodą złotą jako elektrodą pracującą. Oligonukleotyd wykrywany stanowiło DNA komplementarne do znakowanego grupą metalokarboranylową oligonukleotydu, z grupą tiolową na końcu 3' lub 5' tego oligonukleotydu (grupa tiolowa służyła do zakotwiczania wykrywanego oligonukleotydu na warstwie złota-elektrodzie). Przeprowadzone analizy elektrochemiczne wykazały, że sygnał elektrochemiczny, pochodzący od wprowadzonej modyfikacji, był łatwomierzalny dla układu, w którym znacznik metalokarboranylowy był odsunięty od powierzchni elektrody na odległość fragmentu niemodyfikowanego znakowanego oligonukleotydu, w wyniku przeprowadzonej wcześniej reakcji hybrydyzacji między oligonukleotydem wykrywanym a oligonukleotydem znakowanym. W przypadku kiedy modyfikacja metalokarboranylowa znajdowała się blisko powierzchni elektrody pracującej, nie był obserwowany przepływ prądu związany z reakcją ultenienia-redukcji zachodzącej z udziałem grupy metalokarboranylowej.

TEMAT 9

Tytuł: Opracowanie testu ilościowego do wykrywania wirusa paragrypy typu 3 metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Kierownik: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Wirus paragrypy typu 3 (HPIV-3) należy do rodzaju paramyxowirusów i stanowi częstą przyczynę zakażeń układu oddechowego u noworodków i małych dzieci. Celem zadania badawczego było opracowanie metody umożliwiającej ocenę ilości kopii HPIV-3 w badanych materiałach laboratoryjnych i klinicznych. Szczep laboratoryjny HPIV-3 (ATCC-VR-93)

namnażano i mianowano w linii komórkowej LLC-MK2 (ATCC CCL-7.1). Do określania ilości kopii RNA HPIV-3 zastosowano reakcję RT-PCR w czasie rzeczywistym z sondą typu TaqMan znakowaną FAM i TAMRA. W teście wykrywany jest krótki konserwatywny fragment w regionie kodującym wirusową polimerazę. Test ilościowy zostanie zastosowany do detekcji kopii RNA HPIV-3 w materiałach klinicznych.

TEMAT 10

Tytuł: Charakterystyka mechanizmów transkrypcyjnej regulacji genów związanych z rzadkimi chorobami genetycznymi jako sposób wyjaśniania funkcji tych genów.
Kierownik: dr hab. Łukasz Pułaski

Badano mechanizmy regulacji ekspresji wybranych genów na poziomie zachodzącej w jądrze transkrypcji, a w szczególności wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji regulatorowych w DNA genomowym. Badaniom poddano geny, których białkowe produkty odgrywają ważną rolę w metabolizmie komórkowym oraz na poziomie organizmu, w wyniku czego mutacje w tych genach odpowiedzialne są za choroby genetyczne człowieka. Istotnym celem prowadzonych doświadczeń jest identyfikacja nowych mechanizmów (szlaków sygnalizacji biochemicznej) odpowiedzialnych za regulację ekspresji badanych genów w celu wyciągania wniosków na temat potencjalnej funkcji fizjologicznej produktów tych genów w komórce. W roku 2010 prowadzono eksperymenty w szczególności w odniesieniu do następujących ludzkich genów związanych z rzadkimi chorobami genetycznymi: ABCC6 (gen związany z chorobą pseudoxanthoma elasticum), GDAP1 (gen związany z chorobą Charcota-Marie-Tootha typu 4A), ABCB6 (gen związany z zaburzeniami biosyntezy porfiryn), ABCB8 (gen związany z zaburzeniami transportu mitochondrialnego), DHCR24 (gen związany z chorobą desmosterolozą) i RORC (gen związany z zaburzeniami różnicowania limfocytów Th17). Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem m.in. następujących metod: hodowla in vitro modelowych komórek pochodzenia nowotworowego (linie komórkowe); przejściowe transfekcje komórek hodowanych in vitro; oznaczanie poziomu ekspresji genów techniką reakcji typu PCR w czasie rzeczywistym; oznaczanie aktywności sekwencji promotorowych techniką genów reporterowych; oznaczanie efektywności wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji regulatorowych DNA techniką badania zmiany ruchliwości elektroforetycznej kompleksów DNA-białko (EMSA); oznaczanie kinetyki wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji promotorowych w genomowym DNA hodowanych in vitro komórek techniką immunoprecypitacji chromatyny. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zidentyfikowano kilka nowych osi regulatorowych biorących udział w determinowaniu poziomu ekspresji badanych, ważnych z medycznego punktu widzenia genów, oraz wyciągnięto odpowiednie wnioski w odniesieniu do biologicznej roli wykrytych oddziaływań. W szczególności, odkryto rolę czynników transkrypcyjnych HNF4alfa i C/EBP w regulacji tkankowo specyficznej (wątrobowej) ekspresji genu ABCC6; zidentyfikowano rolę czynnika transkrypcyjnego YY1 w skoordynowanej regulacji ekspresji kilku genów odpowiedzialnych za choroby genetyczne związane z dysfunkcją mitochondrialną, takich jak GDAP1 i ABCB6; odkryto wpływ czynnika transkrypcyjnego SP1 na determinację bazowego poziomu ekspresji białka kodowanego przez gen ABCB8. Badania będą kontynuowane w kolejnym roku.

Sprawozdania

z realizowanych projektów badawczych

Projekty badawcze realizowane przez Instytut Biologii Medycznej PAN w 2010 roku – ogółem: 24

w tym:

Granty międzynarodowe - 8

Granty własne - 13

Granty zamawiane - 2

Granty badawcze- rozwojowe - 1

Projekty badawcze finansowane przez instytucje międzynarodowe – realizowane w 2010 – ogółem 8

	Tytuł projektu	Kierownik projektu/ Koordynator	Okres realizacji	Koszt projektu[1]
1.	**POIG - InterMolMed POIG.01.01.02-10-107/09** Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.1.2 Strategiczne programy badań naukowych i prac rozwojowych **Badanie mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki– patogen – czynniki środowiska (InterMolMed).**	Koordynator Prof. dr hab. Jarosław **Dziadek**	01.01.2010 31.12.2013	39 354 702 PLN
2.	**Grant FP7-INFRASTRUCTURES-2010 - 1 nr. 261861 (EU-OPENSCREEN),European nfrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology. Finansowany w ramach FP7**	Koordynator – Prof dr hab. Zbigniew J **Leśnikowski**	01.11.2010 31.10.2013	94 375 Euro
3.	**Grant CRP – ICGEB 2007 nr CRP/POL07-01 Steroid metabolism in pathogenesis of tuberculosis**. Finansowany w ramach konkursu grantowego CRP (Collaborative Research Programme) organizowanym corocznie przez Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, ICGEB)	Prof. dr hab. Jarosław **Dziadek**	02.01.2008 31.12.2010	42.000 Euro
4.	**Projekt PL 0107 Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczenia środowiska.** finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego	Dr hab. Jarosław **Dastych,** prof. IBM PAN	01.01.2008 31.12.2010	721.792 Eur + 387.105 PLN
5.	**Projekt PL 0270 Zakażenia prenatalne i perinatalne ludzkim wirusem cytomegalii"** finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego	Dr Edyta **Paradowska**	27.11.2008 26. 04.2011	907 895 Eur

6.	**Projekt: Nr INCA/149/2008 Współdziałanie integryn z metaloproteazami podczas wzrostu komórek raka jelita grubego. Proteoglikany oraz ich fragmenty produkowane przez metaloproteazy, ich rola podczas różnicowania komórek macierzystych – znaczenie dla rozwoju guza i angiogenezy - Decyzja nr 343/N-INCA/2008/0z dnia 29.10.2008 r.** wspólny projekt polsko-francuski finansowany w ramach współpracy z INCA i CNRS z dnia 29.07.2008r.	Prof. dr hab. Czesław **Cierniewski**	18.XI. 2008 19.XI. 2011	356 530 PLN
7.	**POMOST_C/16 Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka,** Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki,Program Pomost	Dr Patrycja **Przygodzka**	01.07.2010 31.10.2010	5.088,40 PLN
8.	**POMOST_C/24 Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka,** Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki,Program Pomost	Mgr Małgorzata **Ziółkiewicz**	01.11.2010 31.01.2011	12.391 PLN

1) na okres realizacji

POIG - InterMolMed POIG.01.01.02-10-107/09 Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.1.2 Strategiczne programy badań naukowych i prac rozwojowych
Tytuł projektu: ***Badanie mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki– patogen – czynniki środowiska (InterMolMed).***

Koordynator: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**
okres realizacji: 01.01.2010 - 31.12.2013

Sprawozdanie z realizacji zadania 1.

W pierwszym roku realizacji zadania pierwszego przy wykorzystaniu klasycznych metod biologii molukularnej przygotowano rekombinantowe wektory noszące defektywne formy badanych genów, otoczone sekwencjami flankującymi, kodujących (i) enzymy procesu degradacji cholesterolu takie jak: oksydazę cholesterolową, ketosteroidową dehydrogenazę, transportery ABC (supA i supB) (ii) białka zaangażowane w procesy naprawy DNA: białko RecA, białko Ku i ATP-zależną ligazę LigD, oraz (iii) białko zaangażowane w biosyntezę ściany komórkowej przenoszące reszty acylowe (AcpM) M. tuberculosis. Wektory te skonstruowano w oparciu o plazmid p2NIL zdolny do replikacji w komórkach E. coli lecz nie w komórkach prątków gruźlicy. Ostateczne konstrukty zawierają również kasetę markerową pochodzącą z wektora pGOAL17. Uzyskane wektory rekombinacyjne posiadają odpowiednie geny markerowe pozwalające na selekcję pojedynczych oraz podwójnych krzyżowych rekombinantów uzyskiwanych po rozpadzie plazmidu w komórkach mykobakterii na skutek homologicznej rekombinacji w sąsiedztwie genów

„dzikich” gospodarza. Uzyskane plazmidy po ich weryfikacji poprzez sekwencjonowanie DNA, zostały wykorzystane do uzyskanie odpowiednich mutantów M. tuberculosis pozbawionych zdolności do syntezy wybranych białek.
Uzyskane konstrukty genetyczne (plazmidy rekombinacyjne) noszące defektywne geny kodujące oksydazę cholesterolową, ketosteroidową dehydrogenazę, białko recA oraz białko Ku i ATP-zależną ligazę LigD wykorzystano w celu uzyskania ukierunkowanych mutantów prątków gruźlicy. W pierwszym etapie plazmidowy DNA został wykorzystany w procesie homologicznej rekombinacji w celu uzyskania pojedynczych krzyżowych homologicznych rekombinantów (SCO) noszących zarówno dziką jak i zmutowaną formę genu. Identyfikacje mutantów przeprowadzono na odpowiednich podłożach selekcyjnych a ich genotyp był analizowany metodami genetycznymi z wykorzystaniem metody amplifikacji DNA in vitro oraz metody hybrydyzacji typu Southern. Uzyskane mutanty SCO zostały następnie wykorzystane dla przeprowadzenia kolejnego procesu homologicznej rekombinacji mającego na celu pozostawienie w genomie pojedynczej kopii badanego genu, formy dzikiej lub zmutowanej. Przy zastosowaniu odpowiednich podłóż selekcyjnych otrzymywano kolonie o fenotypie podwójnych krzyżowych rekombinantów. Wyselekcjonowane mutanty poddawano analizie genetycznej z wykorzystaniem procesu amplifikacji DNA in vitro w celu selekcji mutantów pozbawionych funkcjonalnych, badanych genów. Wyselekcjonowane metodą amplifikacji DNA in vitro mutanty poddawano następnie analizie z wykorzystaniem metody hybrydyzacji typu Southern. Mutanty o spodziewanym fenotypie (białe kolonie wrażliwe na kanamycynę i oporne na sacharozę) o potwierdzonym genotypie z wykorzystaniem metody PCR i hybrydyzacji typu Southern uznawano za właściwe i zabezpieczano w postaci stoków glicerynowych.
Uzyskane konstrukty genetyczne (plazmidy rekombinacyjne) noszące defektywne geny kodujące transportery ABC (supA i supB) oraz białko przenoszące reszty acylowe (AcpM) zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie DNA i przygotowano dla procesu homologicznej rekombinacji. Ponadto rozpoczęto proces klonowania wybranych genów w wektorach integracyjnych, które będą wykorzystane dla komplementacji uzyskiwanych mutantów.
W ramach realizacji zadania badawczego 1.2. prowadzone były prace zmierzające do powiększenia kolekcji jelitowych szczepów E. coli należących do podgrupy EPEC (enteropatogenne). Szczepy te pozyskano z Laboratorium Diagnostycznego „Synevo” przy Szpitalu im. Korczaka w Łodzi. Rozpoczęto także gromadzenie kolekcji szczepów uropatogennych E. coli (UPEC). Otrzymane szczepy EPEC oraz UPEC zostały zabezpieczone w postaci mieszanin glicerolowych i umieszczone w temperaturze -80□C. Poszczególne szczepy z kolekcji zostały namnożone na stałym podłożu LB a z uzyskanych pojedynczych kolonii wyizolowano genomowy DNA. Izolację bakteryjnego materiału genetycznego przeprowadzono z wykorzystaniem techniki „boiling-water”. Uzyskane w taki sposób matryce zostały użyte do określenia przynależności filogenetycznej szczepów E. coli. Oznaczenia te wykonano z zastosowaniem metody tripleks-PCR, pozwalającej na jednoczesne określenie obecności trzech markerów genetycznych (chuA, yjaA i TSPE4.C2).
Ponadto opracowano warunki metod pozwalających na określanie profili genetycznych zgromadzonych szczepów przy wykorzystaniu metod ERIC-PCR oraz CGG-PCR. Do analiz wybrano te szczepy, dla których określono przynależność filogenetyczną (101 szczepów).
Wyniki analizy ERIC-PCR:

Zastosowana procedura pozwoliła wykazać, że uzyskiwane profile prążkowe grupują się w postaci dwóch klastrów. W pierwszym, najbardziej licznym (65 szczepów), przeważają szczepy należące do grupy filogenetycznej B2 (75,4%), w drugim szczepy z podgrupy D (25 szczepów, 100%). Pozostałe szczepy z badanej kolekcji (11) grupują się w małoliczne klastry lub pozostaje niesklastrowana.

Wyniki analizy ERIC-PCR:

Analiza CGG-PCR pozwoliła wykazać, że badane szczepy wyraźnie grupują się w postaci trzech klastrów. Pierwszy klaster - 55 szczepów należących głownie do grupy B2 (92,7%), drugi klaster - 28 szczepów należących głównie do grupy D (92,3%) oraz grupa 18 szczepów należących do grup filogenetycznych A, B1 i D.

Za pomocą odczynów ELISA i Western blot wykazano wiązanie ludzkiej lektyny wiążącej mannan (MBL) do szczepów Mycobacterium tuberculosis RV i BCG (zarówno do komórek inaktywowanych termicznie, jak i za pomocą formaliny). Rozdział elektroforetyczny pozwolił na stwierdzenie, że za wspomnianą reaktywność odpowiedzialne są frakcje komórek bakteryjnych o masach około 30-40 kDa i około 20 kDa. Po trawieniu masy bakteryjnej za pomocą proteinazy K, obserwuje się zanik wiązania MBL, co wskazuje na białkowy (lub glikoproteinowy) charakter badanych produktów. Podobne wyniki otrzymano stosując formę rekombinantową lektyny wiążącej mannan. Ponadto wykazano, że ludzka MBL rozpoznaje komórki Mycobacterium xenopi (podobnie, jak w przypadku oddziaływania z M. tuberculosis - frakcje o masie około 30-40 kDa), natomiast nie reaguje z komórkami M. smegmatis i M . kansasii. Wstępne, wymagające potwierdzenia wyniki sugerują, że czynnikiem odpowiedzialnym za wiązanie MBL może być antygen 85. W tym celu podjęte będą badania z wykorzystaniem tego antygenu w postaci oczyszczonej oraz swoistych przeciwciał. Ponadto, stosując odczyny ELISA i Western Blot zaobserwowano wiązanie rekombinantowej fikoliny H (fikoliny 3) do inaktywowanych komórek M. tuberculosis RV i BCG. W odczynie ELISA zaobserwowano wiązanie rekombinantowej fikoliny H (fikoliny 3) do inaktywowanych komórek M. tuberculosis BCG. Reakcja rh fikoliny H z prątkami BCG może zostać zahamowana przez lipopolisacharyd Hafnia alvei 1200, opisany ligand dla tej lektyny. Nie wykazano wiązania surowiczej fikoliny H do prątków BCG. Ponadto zaobserwowano, że dodatek surowicy hamuje oddziaływanie Rh fikoliny H z komórkami Mycobacterium.

Podjęto badania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów odpowiedzialnych za syntezę wybranych czynników odporności wrodzonej u pacjentów z gruźlicą i w grupie kontrolnej.

- gen SFTPA-1 (odpowiedzialny za syntezę kolektyny surfaktantu płucnego A1, SP-A1):

Badano polimorfizmy w trzech pozycjach: kodon 19 (Val/Ala), 50 (Val/Leu) i 219 (Arg/Trp). Wśród osób chorych na gruźlicę oznaczono genotypy: 35 homozygot Val/Val, 6 heterozygot Val/Ala (kodon 19); 8 homozygot Val/Val, 24 heterozygoty Val/Leu, 7 homozygot Leu/Leu (kodon 50); 10 homozygot Arg/Arg, 4 heterozygoty Arg/Trp (kodon 219). W grupie kontrolnej (zdrowe osoby dorosłe, które w przeszłości nie chorowały na gruźlicę) oznaczono odpowiednio: 22 homozygoty Val/Val, 6 heterozygot Val/Ala (kodon 19); 7 homozygot Val/Val, 15 heterozygot Val/Leu, 3 homozygoty Leu/Leu (kodon 50); 24 homozygoty Arg/Arg, 1 heterozygotę Arg/Trp (kodon 219).

- gen SFTPA-2 (odpowiedzialny za syntezę kolektyny surfaktantu płucnego A2, SP-A2):

Badano polimorfizmy kodonach 9 (Asn/Thr), 91 (Ala/Pro) i 223 (Gln/Lys). Wśród osób chorych na gruźlicę oznaczono genotypy: 5 homozygot Asn/Asn, 8 heterozygot Asn/Thr, 1 homozygota

Thr/Thr (kodon 9); 29 homozygot Ala/Ala, 12 heterozygot Ala/Pro, (kodon 91); 22 homozygoty Gln/Gln, 19 heterozygot Gln/Lys (kodon 223). W grupie kontrolnej oznaczono 9 homozygot Gln/Gln, 12 heterozygot Gln/Lys, 4 homozygoty Lys/Lys (kodon 223).
- gen SFTPD (odpowiedzialny za syntezę kolektyny surfaktantu płucnego D, SP-D):
Badano polimorfizmy w kodonach: 11 (Thr/Met), 160 (Ala/Thr) i 270 (Ser/Thr). Wśród osób chorych na gruźlicę oznaczono genotypy: 27 homozygot Thr/Thr, 40 heterozygot Thr/Met, 20 homozygot Met/Met (kodon 11); 14 homozygot Ala/Ala, 18 heterozygot Ala/Thr, 9 homozygot Thr/Thr (kodon 160); 35 homozygot Ser/Ser, 6 heterozygot Ser/Thr (kodon 270). W grupie kontrolnej oznaczono odpowiednio: 7 homozygot Thr/Thr, 13 heterozygot Thr/Met, 4 homozygoty Met/Met (kodon 11); 6 homozygot Ala/Ala, 15 heterozygot Ala/Thr, 4 homozygoty Thr/Thr (kodon 160); 22 homozygoty Ser/Ser, 2 heterozygoty Ser/Thr (kodon 270).
- gen MBL2 (odpowiedzialny za syntezę lektyny wiążącej mannan, MBL):
Badano polimorfizmy w regionie promotorowym (pozycje -550, H/L i -221, Y/X) oraz w kodonach 52 (A/D), 54 (A/B) i 57 (A/C). Defektywne allele D, B i C określane są wspólnie jako O. Wśród osób chorych na gruźlicę oznaczono genotypy: 55 homozygot A/A, 31 heterozygot A/O (w tym 10 LXA/O), 1 heterozygota O/O (B/D). W grupie kontrolnej oznaczono odpowiednio: 42 homozygoty A/A, 26 heterozygot A/O (w tym 6 LXA/O), 1 heterozygota O/O (B/D).
- gen MASP2 (odpowiedzialny za syntezę proteazy serynowej MASP-2, występującej w kompleksach z MBL i fikolinami i współdziałającej z nimi w procesie aktywacji dopełniacza).
Badano polimorfizm w kodonie 359 (A/G). W grupie pacjentów oznaczono 82 homozygoty A/A i 5 heterozygot A/G. W grupie kontrolnej wykryto 49 homozygot A/A i 4 heterozygoty A/G.
Rozpoczęto badania stężeń lektyny wiążącej mannan w surowicach osób chorych na gruźlicę i w grupie kontrolnej. Mediana w grupie pacjentów wynosi 2241 ng/ml (53 oznaczenia), natomiast w grupie osób zdrowych: 742 ng/ml (45 oznaczeń).
Ponadto w analizie western blot wykonanej z białkami M. tuberculosis rozdzielonymi w elektroforezie dwukierunkowej zidentyfikowano dwie frakcje oddziałujące z ludzkim białkiem MBL. Frakcje te izolowano z żelu i są obecnie przygotowywane dla procesu identyfikacji z wykorzystaniem techniki spektrometrii mass.
Ludzki gen MBL poddano również amplifikacji na matrycy genomowego DNA (łącznie z intronami) i sklonowano w wektorze ekspresyjnym pcDNA-TOPO. Obecnie prowadzone są prace zmierzające do weryfikacji poprawności sekwencji DNA.
Komórki makrofagoidalne uzyskane z linii komórkowej THP1 inkubowano ze znakowanymi fluoresceiną prątkami (szczep dziki Rv), (mutanty: CHO, KSDD, Sup AB, Dis A) opsonizowanymi lub nie ludzką surowicą AB w proporcji 1:1, 1:5, 1:10 1:25 (odpowiednio, makrofag/mykobakteria). Liczbę pochłoniętych mykobakterii oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym. Oceniano odsetek komórek fagocytujących, liczbę mykobakterii pochłoniętych w 1 makrofagu. Badania wykazały, że najodpowiedniejszą do oceny fagocytozy mykobakterii jest proporcja 1 makrofag /10 mykobakterii (MOI 10). Nie stwierdzono znamiennych różnic w odsetku fagocytujących (liczbie zakażonych) makrofagów w zależności od badanego szczepu prątków. Wykazano, że opsonizowane i nie opsonizowane mutanty Dis A i Sup AB są znamiennie słabiej fagocytowane przez makrofagi zarówno aktywowane jak i nie aktywowane. Ponadto, odsetek makrofagów nie aktywowanych z pochłoniętymi mutantami Dis A i Sup AB jest istotnie niższy w porównaniu z odsetkiem makrofagów pochłaniających prątki szczepu dzikiego.
Przeżywanie wewnątrzkomórkowe

Oceniano także przeżywalność prątków w makrofagach metodą CFU (jednostek tworzących kolonie). Przeżywalność prątków oceniano w układzie 1:1 (MOI 1). Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że aktywacja makrofagów przez IFNγ istotnie nasila ich zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania zarówno prątków szczepu dzikiego jak i jego mutantów. Stwierdzono ponadto, że opsonizowane mutanty Dis A i Sup AB są efektywniej zabijane przez makrofagi w porównaniu do szczepu dzikiego. Miarą tego jest istotnie mniejsza liczba przeżywających prątków.

Opracowanie i dostosowanie metod do kontynuacji i realizacji zadań.

Dostosowano i opracowano warunki oceny produkcji NO, reaktywnych form tlenu (RFT) i interleukiny-10 (IL-10), ekspresji receptorów TLR-2 przez makrofagi, nie aktywowane i aktywowane IFNγ, fagocytujące opsonizowane i nie opsonizowane prątki szczepu dzikiego. Produkcję NO oceniano met. Grieesa, RFT met. chemiluminescencji wzmocnionej luminolem, IL-10 met. ELISA. Ocenę ekspresji receptorów TLR-2 met. cytometrii przepływowej.

Ustalono, że:

- do prowadzenia planowanych i powtarzalnych badań makrofagi winny być uzyskiwane pomiędzy 7. a 15. pasażem komórek liniiTHP-1,
- najodpowiedniejszą do oceny produkcji NO, RFT, IL-10 przez makrofagi jest proporcja 1 makrofag /10 mykobakterii (MOI 10),
- produkcja NO winna być oceniana po 48 godzinach inkubacji makrofagów z mykobakteriamii,
- produkcja RFT i IL-10 po 24 godzinach inkubacji jw.

Sprawozdanie z realizacji zadania 2.

Przygotowanie banku linii komórkowych oraz wirusowych szczepów klinicznych i laboratoryjnych. Promocja badań w środowisku medycznym.

Wykorzystując posiadany wcześniej bank linii komórkowych i szczepów wirusowych, na potrzeby projektu utworzono i rozbudowano odrębny bank linii komórkowych i laboratoryjnych szczepów wirusowych. Kolekcja obejmuje następujące szczepy laboratoryjne herpeswirusów: szczep McIntyre ludzkiego wirusa opryszczki typu 1 (HSV-1, ATCC VR-539), szczepy laboratoryjne ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV) takie jak AD169 (ATCC VR-538), Davis (ATCC VR-807) i Towne (ATCC VR-977), szczep Oka ludzkiego wirusa ospy wietrznej-półpaśca (VZV, ATCC VR-795), oraz zakupiony w ramach projektu POIG - szczep C243 ludzkiego wirusa paragrypy typu 3 (HPIV-3, ATCC VR-93). Oznaczono miana namnożonych szczepów wirusowych metodą TCID50/ml i PFU (HCMV). Przygotowany bank linii komórkowych obejmuje posiadane wcześniej linie ciągłe: A549 (ATCC CCL-185), LLC-MK2 (ATCC CCL-7.1), L929 (ATCC CCL-1), Vero (ATCC CCL-81) oraz zakupioną w ramach projektu półciągłą linię MRC-5 (ATCC CCL-171). Kolekcję wirusów i linii komórkowych zdeponowano w ciekłym azocie lub/i temp. -80°C. Przygotowano zamówienie na zakup linii komórkowej NAMALWA zawierającej DNA wirusa Epsteina-Barr (EBV). Zadanie realizowane zgodnie z harmonogramem.

Opracowanie testów do wykrywania i mianowania wybranych herpeswirusów. Wykrywanie i genotypowanie szczepów klinicznych wybranych herpeswirusów wywołujących zakażenia w różnych grupach pacjentów.

Wykonano pilotażowe reakcje amplifikacji wybranych genów (UL55, UL144 i US28) HCMV metodą nested-PCR w wybranych materiałach klinicznych. Wprowadzono metodę RFLP do

genotypowania HCMV na podstawie polimorfizmu genów UL73 i UL75. Opracowano test do oznaczania ilości kopii RNA HPIV-3 w oparciu o metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sondy typu TaqMan znakowanej FAM i TAMRA (w oparciu o Cordey S. i współpr. J. Virol. Meth. 2009; 156: 166-8). Do wykrywania białek HPIV-3 wprowadzono test do wykrywania białek HPIV-3 w hodowli komórek linii komórkowej LLC-MK2 z wykorzystaniem metod shell-vial i immunofluorescencji pośredniej. Dokonano optymalizacji warunków dla testów i zastosowano je do wykrywania laboratoryjnego szczepu HPIV-3. Przygotowano zamówienia na odczynniki i materiały oraz specyfikacje techniczne do ogłoszenia przetargów na zakup sprzętu badawczego: spektrofotometru UV/vis i aparatu do elektroforezy kapilarnej.

Dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego identyfikacji molekularnej, metod mianowania HPIV3 i badanych herpeswirusów (HCMV, VZV, EBV) oraz wyboru testów planowanych do detekcji wirusów przy użyciu metod PCR w czasie rzeczywistym i RFLP.

Opracowanie i optymalizacja metod wprowadzania lipofilowego farmakofora karboarnylowego do wybranych klas związków o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej. Synteza pochodnych znanych leków i nowych cząsteczek modyfikowanych farmakoforem karboranylowym.

Przeprowadzono reakcje pilotowe badając nową metodę wprowadzania modyfikacji klasterem boru polegającą na przyłączaniu klastera do funkcji tiolowej jako ugrupowania nukleofilowego. W tym celu zastosowano addukt metalokarboranu i cyklicznego eteru (dioksanu) jako donora klastera boru z wykorzystaniem metody opracowanej wcześniej w Laboratorium Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej do modyfikacji nukleozydów przy atomach tlenu lub azotu. Jako związek modelowy wykorzystano tiocholesterol. Otrzymano nowy typ modyfikowanych pochodnych cholesterolu w którym modyfikacja klasterem boru przyłączona jest za pomocą łącznika eterowego.

Wykorzystując dostępne piśmiennictwo rozpoznano metody syntezy pochodnych alkinylowych klasterów boru. Zoptymalizowano metodę umożliwiające syntezę 2-etynylo-para-karboranu na drodze przekształcenia para-karboranu w jodopochodną a następnie zastąpienie atomu jodu grupą etynylową. Otrzymany para-karboran jest jednym z planowanych modułów do wprowadzania lipofilowego farmakofora karboranylowego do wybranych klas związków chemicznych. Zastosowana metoda syntezy umożliwia wprowadzenie jednej lub kilku grup alkinylowych przyłączonych do atomów boru do tej samej cząsteczki karboranu.

Dokonano przeglądu literatury związanej z chemią boru i nowymi reakcjami chemicznymi związanymi z ta grupą związków, ze szczególnym uwzględnieniem syntezy związków aktywnych biologicznie modyfikowanych klasterami boru, nukleozydowymi lekami przeciwwirusowymi oraz projektowaniem i rynkiem pro-leków.

Przygotowano zamówienia na odczynniki i materiały oraz specyfikacje techniczne do zrealizowanego przetargu na zakup spektrofotometru FT-IR.

Opracowano metodę syntezy amidofosforynu nukleozydowego leku przeciwwirusowego „Entecavir" (ETV). Wykorzystano w tym celu odczynnik fosfitylujący: O-alkilo-N,N-diizopropyloamino chlorofosfinę i odpowiednio blokowany ETV. Otrzymany związek może być wykorzystany zarówno do syntezy DNA modyfikowanego ETV jako modelu do badań mechanizmu działania tego leku jak i do dalszej jego modyfikacji za pomocą lipofilowego farmakofora karboranylowego.

Opracowano metodę syntezy estru acyklowiru, leku przeciwko wirusowi cytomegalii, i kwasów karboranylokarboksylowych. Zoptymalizowana wersja metody polega na reakcji nadmiaru

acyklowiru i odczynnika kondensującego tetrafluoroboranu 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyn-2-ylo)-4-metylomorfolinowego w dimetyloformamidzie jako medium reakcji.
Dokonano przeglądu literatury w obszarze realizacji tematu 2.6, w tym metod syntezy i aktywności biologicznych nowych pochodnych znanych związków o aktywności przeciwwirusowej i podwyższonej lipofilowości.

Sprawozdanie z realizacji Zadanie 3.

W pierwszym roku realizacji projektu prace eksperymentalne obejmowały koncentrowały realizację podzadań 3.1 (Identyfikacja szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych biorących udział w odpowiedzi na rozpoznanie tzw. wzorów obcości (pattern recognition) w wybranych komórkach układu odpornościowego; w komórkach śródbłonka i w komórkach glejowych) oraz 3.2 (Identyfikacja szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych istotnych dla modulacji transkrypcyjnej odpowiedzi odpornościowej przez fizykochemiczne czynniki środowiskowe takie jak: ksenobiotyki, składniki zanieczyszczeń środowiska, promieniowanie UV w komórkowych elementach systemu odporności wrodzonej, w komórkach śródbłonka i w komórkach gleju). W ramach prac nad tymi podzadaniami zdefiniowano i wystandaryzowano kilka modeli tkankowych, do badania zjawiska rozpoznawaniem wzorów obcości i odpowiedzi na czynniki środowiskowe w wybranych komórkach odpornościowych i innych komórkach ważnych dla odpowiedzi odpornościowej. Modele komórkowe, którymi się posługiwano obejmują ludzkie linie komórkowe oraz komórki pierwotne wyprowadzone z komórek prekursorowych z krwi obwodowej o cechach fenotypowych monocytów, komórek tucznych, eozynofilów i bazofilów, komórki śródbłonka HUVEC, unieśmiertelnione komórki śródbłonkowe o cechach elementów komórkowej bariery krew-mózg, a także komórki szczurze mikroglejowe uzyskane z hodowli pierwotnych. W ramach prac nad odpowiedzią monocytów, komórek tucznych i komórek śródbłonka na wzorce obcości (pattern recognition) zbadano działanie aktywatorów wrodzonego układu odpornościowego lipopolisycharydu ze ściany bakteryjnej E. coli , który jest ligandem receptora TLR-4 oraz peptydoglikanu otrzymanego ze ściany bakteryjnej Mycobacterium spp., który jest ligandem receptora TLR-2. Jako modelu komórkowego użyto ludzkich linii komórkowych: LAD-2 o fenotypie komórek tucznych, THP-1 o fenotypie monocytów-makrofagów, HMEC-1 o fenotypie komórek śródbłonkowych. W pierwszej fazie badań dokonano oceny ekspresji receptorów TLR-2 i TLR-4 na powierzchni tych linii komórkowych. Następnie przeprowadzono ocenę działania różnych stężeń aktywatorów na żywotność komórek za pomocą wieloparametrycznej zautomatyzowanej platformy pomiarowej HCS, Cellomics® ArrayScan. Dzięki użyciu 3 różnych barwników fluorescencyjnych możliwa jest ocena badanych aktywatorów na rozmiar i morfologię jądra, integralność błony cytoplazmatycznej oraz aktywność mitochondriów. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie właściwego zakresu stężeń. W następnym etapie wybrane stężenia aktywatorów zostały zastosowane do zbadania zmian w obrazie ekspresji genetycznej we wszystkich testowanych liniach za pomocą reakcji Real time PCR. Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w efektach aktywacji tych samych receptorów TLR w w komórkach o różnym fenotypie. Kontynuując te prace eksperymentalne przeprowadzono badania z użyciem syntetycznych i naturalnych agonistów znanych receptorów wzorów obcości w celu weryfikacji ich wpływu na aktywację szlaku przekazywania sygnałów związanego z czynnikiem transkrypcyjnym NFkappaB w monocytach. W kolejnych seriach eksperymentów zbadano poziom ekspresji receptorów typu RAGE na powierzchni ludzkich komórek tucznych i monocytów oraz odpowiedź tych komórek na obecność D i L mleczanów.

Ekspresje receptorów RAGE określano za pomocą cytofluorymetrii przepływowej i RTPCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wstępne wyniki wskazują, że komórki tuczne w przeciwieństwie do monocytów nie posiadają na swojej powierzchni wykrywalnej ilości receptorów tego typu i nie są pobudzane przez milimolowe stężenia D-mleczanu. W ramach prac nad udoskonaleniem stosowanych modeli tkankowych Przeprowadzono również wstępne (pilotowe) izolacje mRNA z modelowych linii komórkowych, a następnie wypróbowano kilka sposobów wyprodukowania na bazie tych preparatów komplementarnego cDNA, wybierając zapewniający najlepsze rezultaty zestaw do odwrotnej transkrypcji. Zaprojektowano zestawy primerów do analizy ilościowej ekspresji poszczególnych genów (odzwierciedlających aktywację poszczególnych szlaków przekazywania sygnałów w komórkach lub kodujących białka istotne z punktu widzenia aktywacji i roli fizjologicznej odpowiednich typów komórek) w modelowych liniach komórkowych.

W badaniach mechanizmów przekazywania sygnału odpowiadających na tzw. wzory obcości (pattern recognition) w komórkach mikroglejowych zaadoptowano technikę hodowli komórek mikroglejowych Sawada i Hiromi polegającej na pozostawianiu mieszanej hodowli astrocytów i mikrogleju przez okres 14 dni bez wymiany medium i pasażowania, co umożliwiło pozyskiwanie mikrogleju, w ilościach pozwalających na wykonywanie zaplanowanych doświadczeń. W doświadczeniach przeprowadzonych na mikrogleju, wykorzystano agonistów receptorów oreksynowych. Początkowo sprawdzono wpływ oreksyny A i oreksyny B na akumulacją cAMP w komórkach mikrogleju preinkubowanych z [3H]adeniną. W komórkach mikrogleju oreksyna A stymulowała, w sposób zależny od stężenia, wzrost poziomu cyklicznego nukleotydu. Z kolei inkubacja komórek mikrogleju z analogiem oreksyny B– [Ala11, D-Leu15]oreksyną B (silny agonista receptora OX2) – nie wpływała na poziom syntezy [3H]cAMP. Można zatem wnioskować, że w komórkach mikrogleju oreksyna A pobudza szlak AC-cAMP jedynie poprzez selektywny dla niej receptor OX1. Jednocześnie receptor OX2 jest nieselektywnym receptorem obu oreksyn, a brak wpływu analogu oreksyny B na akumulację cAMP wyklucza jego udział w aktywacji szlaku AC-cAMP w komórkach mikrogleju.

Poszukując mechanizmów przekazywania sygnału odpowiadających na tzw. wzory obcości (pattern recognition) w komórkach śródbłonka rozpoczęto badania nad szlakami sygnałowymi regulującymi apoptozę. Nasza uwagę zwróciły białka macierzy jądrowej zwane matrynami, a wśród nich matryna 3, która odgrywa szczególną rolę regulacyjna dzięki oddziaływaniu z licznymi składnikami jądra komórkowego. Celem badań jest ustalenie roli matryny 3 podczas apoptozy komórek śródbłonka, zwłaszcza w warunkach patologicznych, tj. podczas stanów zapalnych. Realizowane badania skupione były na ocenie poziomu ekspresji matryny 3 oraz jej lokalizacji komórkowej w śródbłonku. Analiza wykonana za pomocą Western immunoblottingu wykazała, że matryna 3 należy do jednych z głównych białek jądrowych komórek śródbłonka. Tala lokalizacja została potwierdzona za pomocą mikroskopii konfokalnej. Matryna 3 znaleziona była wyłącznie w przestrzeni pozająderkowej wykazując tendencje do gromadzenia się w różnych skupiskach. Dokładnie taką samą charakterystykę występowania jądrowego matryny 3 zaobserwowano również w komórkach HEK29, które transfekowane były wektorem zawierającym cDNA tego białka. Powstały konstrukt, matryna-3 powiązana z białkiem GFP3, po analizie w mikroskopie konfokalnym, miał taką samą lokalizację wewnątrzjądrową jak białko rodzime, potwierdzając zasadność wykorzystywania tak zmienionych komórek w następnych badaniach. W kolejnym zastosowanym podejściu eksperymentalnym zastosowaliśmy siRNA do zahamowania ekspresji tego białka. Inkubacja komórek śródbłonka z siRNA dla

matryny 3 w znaczący sposób obniżyła ekspresję tego białka, co udokumentowano wykonując analizy stężenia matryny za pomocą immunoblottingu ze swoistymi przeciwciałami, jak również na drodze mikroskopii konfokalnej. Obniżenie ekspresji matryny 3 w komórkach śródbłonka spowodowało zahamowanie adhezji oraz proliferacji. Miało to dramatyczny wpływ na właściwości proangiogenne komórek, co uzewnętrzniło się zniesieniem ich zdolności do tworzenia mikrokapilar w matrigelu. Co więcej spowodowało to również zwiększone wyciekanie LDH z komórek, sygnalizując uszkodzenie błony komórkowej typowe dla nekrozy. W celu dokładniejszego przeanalizowania znaczenia matryny 3 dla przeżywalności komórek śródbłonka, zbadano również jej znaczenie dla cyklu komórkowego. Okazało się, że komórki z obniżoną ekspresją matryny 3 charakteryzowały się znaczącym zahamowaniem podziałów. Około 50% więcej takich komórek nie proliferowało i pozostawało w fazie G0. Mniej było też komórek w fazie S i G2/M. Co więcej, komórki z mniejsza zawartością matryny 3 były mniejsze oraz zawierały mniej ziarnistości niż komórki kontrolne.

Grant **FP7-INFRASTRUCTURES-2010-1 nr. 261861**
(**EU-OPENSCREEN),** ***European Infrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology***.
Finansowany w ramach FP7.
Koordynator: **prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski**
okres realizacji 01.11.2010 - 31.10.2013

W dniach 22-23 listopada 2010 odbył się w Brukseli „kick-off meeting" europejskiego konsorcjum zrzeszającego w chwili obecnej 12 krajów. Realizacja grantu rozpoczęła się w dniu 1 listopada 2010 roku. Celem projektu jest przygotowanie bazy, konstrukcja i eksploatacja pan-europejskiej infrastruktury umożliwiającej tworzenie kolekcji związków chemicznych (przewidywana wielkość centralnej kolekcji 0.5 miliona związków), wysoko-przepustkowe badania przesiewowe, chemiczna synteza i optymalizacja metod otrzymywania związków-kandydatów na nowe leki oraz bioprofilowanie i badania *in vivo* tych związków. Przyjmuje się, że stworzona baza będzie otwarta i dostępna dla wszystkich zainteresowanych placówek naukowych, uczelni jaki i przemysłu farmaceutycznego na ustalonych zasadach.

Projekt zakłada trzy etapy: Etap I. Faza przygotowywacza („Preparatory Phase"), lata 2010-2013, Etap II. Faza konstrukcyjna („Construction Phase"), lata 2013-2018 Etap III. Faza operacyjna („Operation Phase"), lata 2013 i dalsze. Obecny projekt stanowi realizacje Fazy I, przygotowawczej. Część Projektu dotycząca Polski realizowana jest przez konsorcjum zrzeszające sześć polskich placówek naukowych i koordynowane przez Instytut Biologii Medycznej PAN.

Grant CRP – ICGEB 2007 CRP/POL07-01
Tytuł projektu*:* "**Steroid metabolism in pathogenesis of tuberculosis"**

Kierownik projektu: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**

Okres realizacji 02.01.2008 - 31.12.2010

Cholesterol odgrywa kluczową rolę dla wniknięcia komórek Mykobakterii do wnętrza makrofagów. Wiedza na temat znaczenia enzymów uczestniczących w modyfikacji cholesterolu dla procesu patogenezy *M. tuberculosis* jest znikoma. Analiza sekwencyjna genomu *M. tuberculosis* ujawniła obecność przypuszczalnych ontologów *cho*D u *M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae M. smegmatis*. Ponadto genomach *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* zidentyfikowano szereg innych genów kodujących enzymy uczestniczące w katabolizmie cholesterolu. Oksydaza cholesterolowa (ChoD) jest enzymem zapoczątkowującym proces degradacji cholesterolu, katalizującym reakcje oksydacji i izomeryzacji cholesterolu do cholestenonu (4-cholesten-3-one). Następnie cholestenon jest dalej metabolizowany przez inne enzymy do składników nieorganicznych.

Nasze poprzednie badania wykazały, że zarówno szczep dziki *M. smegmatis*, jak i jego mutant pozbawiony aktywności dehydrogenazy ketosteroidowej (zdolny do akumulacji AD-androstendion) nie są zdolne do akumulacji cholestenonu w ilości wystarczającej do detekcji metodą chromatografii gazowej (GC) (Brzostek et al., 2005). W celu wykazania aktywności enzymatycznej oksydazy cholesterolowej, gen *cho*D *M. tuberculosis* sklonowano pod kontrolą promotora *hsp*, kodującego białko szoku termicznego i wprowadzono do komórek mutanta *M. smegmatis ΔksdD*. Zarówno szczep dziki *M. smegmatis*, jak i mutanty hodowano na podłożu z cholesterolem i monitorowano akumulację związków pośrednich z wykorzystaniem chromatografii gazowej w ciągu 72 godzin. Badane szczepy odznaczały się zdolnością do wykorzystywania cholesterolu i akumulacją AD, ponadto zaobserwowano czasową obecność cholestenonu dla szczepu z nadprodukcją oksydazy cholesterolowej.

W celu wykazania roli oksydazy cholesterolowej dla patogenezy *M. tuberculosis* przygotowano szczep ze inaktywowanym genem *cho*D z wykorzystaniem dwu-stopniowego systemu rekombinacji homologicznej. Dodatkowo skonstruowano szczep z aktywnym genem *cho*D w celu komplementowania szczepu mutanta. Przygotowane szczepy wykorzystano do infekcji mysich makrofagów wysiękowych i oceniano żywotność bakterii w makrofagach po infekcji w 6 i 8 dniu przez analizę liczby kolonii *M. tuberculosis* (c.f.u). Zaobserwowano znaczący spadek żywotności bakterii dla szczepu mutanta *ΔchoD*, w porównaniu do szczepu dzikiego i komplementowanego.. Dodatkowo zainfekowano w/w szczepami *M. tuberculosis* myszy C57BL/6, z których izolowano śledziony i płuca w celu oszacowani przeżywalności bakterii poprzez analizę c.f.u. Szczep dziki i komplementowany odznaczały się podobnym poziomem przeżywalności prątków gruźlicy (10^5-płuca; 10^4-śledziony). Natomiast szczep *m. tuberculosis ΔchoD* odznaczal się brakiem przeżywalności w przypadku bakterii izolowanych z płuc i jej obniżeniem do poziomu 10^3 dla bakterii izolowanych ze śledziony.

Szybkorosnące szczepy *Mycobacterium* są zdolne do całkowitej degradacji naturalnie występujących steroli i ich wykorzystania, jako źródła węgla i energii. Wiedza na temat zdolności do akumulacji lub degradacji cholesterolu przez prątki gruźlicy jest wciąż niewielka. W celu określenia zdolności do akumulacji cholesterolu przez *M. tuberculosis* wykorzystano cholesterol znakowany trytem. Przeprowadzone analizy mikroskopowe komórek prątków rosnących w obecności cholesterolu wybarwiono filipinem i obserwowano wiązanie barwnika przez osłony komórkowe. Przypuszczano, że cholesterol może być akumulowany w najbardziej zewnętrznej warstwie ściany komórkowej *Mycobacterium*, w warstwie wolnych lipidów, która jest najmniej

upakowaną strukturą ściany. Cholesterol zakumulowany w ścianie komórkowej prątków wpływa na jej przepuszczalność, uniemożliwiając wnikanie leków przeciwprątkowych, np. rifampicyny, jak również częściowo maskuje antygeny prątków, uniemożliwiając ich rozpoznanie przez przeciwciała. Ponadto przeprowadzone badania z wykorzystaniem szczepu mutanta *M. tuberculosis Δksd* hodowanego na podłożu minimalnym z dodatkiem cholesterolu, jako jedynego źródła węgla akumuluje, w sposób czasowo zależny, produkt pośredni degradacji cholesterolu, jakim jest 9OHAD. Wskazuje to na zdolność *M. tuberculosis* do degradacji cholesterolu z wytworzeniem AD/ADD, jako produktów pośrednich, a dehydrogenaza ketosteroidowa odgrywa kluczową rolę w tym procesie.

Projekt PL 0107

Tytuł projektu: **„Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczenia środowiska"**
finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego

Koordynator / Kierownik projektu: **dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN**
Okres realizacji: 01.01.2008 – 31.12.2010
Koszt: 721.792 Euro + 387.105 PLN

W roku 2010 okresie testowano przydatność stworzonego zestawu testów opartych o biosensory komórkowe do badania pyłów z powietrza, próbek wody i występujących w zbiornikach wodnych sinic. Przygotowano kolekcję próbek środowiskowych zawierającą próbki pyłów z powietrza oraz ekstrakty na fazie stałej z próbek wody i występujących w zbiornikach wodnych sinic Próbki środowiskowe badano za pomocą baterii zautomatyzowanych testów. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie pięciu publikacji, z których dwie ukazały się już drukiem, a pozostałe trzy zostały wysłane do czasopism. Prace nad projektem są kontynuowane.

Projekt nr PL 0270

Tytuł projektu: **„Zakażenia prenatalne i perinatalne ludzkim wirusem cytomegalii"**
finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego

Kierownik/ Koordynator: **dr Edyta Paradowska**
Okres realizacji: 27.11.2008 - 30.04.2011

W ramach Projektu pt. „***Zakażenia prenatalne i perinatalne ludzkim wirusem cytomegalii"*** prowadzone są badania mające na celu m.in.: 1) oznaczenie prewalencji, zachorowalności i czynników ryzyka zakażeń wirusem cytomegalii (CMV) u kobiet ciężarnych i ich dzieci, 2)

wykrywanie i genotypowanie szczepów klinicznych CMV wywołujących zakażenia wrodzone oraz zakażenia nabyte u dzieci, 3) określenie roli wybranych mechanizmów odporności wrodzonej w zakażeniach pre- i perinatalnych CMV (MBL, TLR, wybrane cytokiny), 4) określenie polimorfizmu genetycznego wybranych cytokin/chemokin i ich receptorów w zakażeniach perinatalnych CMV i 5) poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciw CMV.
Zgromadzono i przebadano próbki surowicy pobrane od kobiet ciężarnych (285 kobiet w I trymestrze i 946 w III trymestrze ciąży) oraz 839 noworodków. Oznaczono częstość występowania swoistych przeciwciał IgG, IgM i IgA anty-CMV wśród dotychczas zbadanych ciężarnych i noworodków populacji polskiej. Prowadzono badania nad wykrywaniem i monitorowaniem ilości kopii DNA CMV u kobiet ciężarnych, noworodków z zakażeniem wrodzonym oraz niemowląt z zakażeniem wrodzonym lub nabytym CMV. Określono genotypy CMV (gB, gpUL144, gpUL146) wywołujące zakażenia wrodzone i nabyte u pacjentów z kilku polskich ośrodków pediatrycznych m.in. Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie, jednostek *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Wykonano badania skriningowe ekspresji TLR w nie zakażonych komórkach linii trofoblastów, NHDF i fibroblastów izolowanych z łożysk (I trymestr ciąży); badania aktywacji ligandu TLR i zakażenia CMV w linii komórkowej trofoblastów i fibroblastów są kontynuowane (badania realizowane w Institute of Cancer Research and Molecular Medicine, NTNU, Trondheim). Zgromadzono kolekcję ponad 340 próbek płynu owodniowego pobranych od kobiet ciężarnych do badań wpływu zakażenia CMV na poziom stresu oksydacyjnego. Nie stwierdzono dotychczas występowania różnic w średnim poziomie 3-nitotyrozyny pomiędzy próbkami płynu owodniowego ciężarnych kobiet, u których stwierdzono występowanie swoistych przeciwciał anty-CMV w klasie IgM i/lub IgA a grupą kontrolną. U noworodków i niemowląt oraz kobiet ciężarnych z zakażeniem CMV oznaczono genotypy MBL2. Stężenia MBL <150 ng/ml stwierdzono u około 26.3% dzieci oraz 21.7% kobiet. Zakończono prace związane z immunobarwieniem tkanek łożysk. Określono ekspresję mRNA dla IFN-□ i TNF-□ względem genów referencyjnych (SDHA i YWHAZ) w łożyskach z III trymestru ciąży przy zastosowaniu metody PCR w czasie rzeczywistym. Rozpoczęto oznaczanie poziomu wybranych cytokin w łożyskach zdrowych oraz zakażonych CMV w warunkach *in vitro*. Przeprowadzono analizę polimorfizmu: TNFα – 308 metodą real-time PCR allelic discrimination (AD), IL-10 – 1117 metodą real-time PCR AD, IL-1β – 511 metodą RFLP-PCR, MCP1 +1543 metodą real-time PCR AD, IL-1RN i CCR5-Δ32 bp u noworodków i ich matek (Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, ICZD w Warszawie). Opracowano metody syntezy gancyklowiru i acyklowiru modyfikowanch klasterem *para*-karboranylowym. Przeprowadzono badania trwałości fosforanu gancyklowiru (ZL-1010/AA) oraz H-fosfonianu acyklowiru (ZL-1011/AA) modyfikowanych klasterem para-karboranylowym w buforach o różnym pH oraz w surowicy krwi ludzkiej. Wykonano badania cytotoksyczności i aktywności przeciwwirusowej dla związków ZL-1010/AA i ZL-1011/AA. Przeprowadzono badania pilotowe syntezy H-fosfonianu (3-propyloksy)-para-karboranu oraz wykorzystania go do modyfikacji cidofowiru. Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektu zostały przedstawiane dotychczas w postaci 13 komunikatach na konferencjach zagranicznych i krajowych, 2 proceedings oraz 15 wykładów. W trakcie realizacji są 4 prace magisterskie (1IBM PAN, 3 NTNU) wykonywane w ramach projektu.

PROJEKTY MIĘDZYNARODOWE NIEWSPÓŁFINANSOWANE

Projekt: Nr INCA/149/2008

Tytuł projektu.: **„Współdziałanie integryn z metaloproteazami podczas wzrostu komórek raka jelita grubego. Proteoglikany oraz ich fragmenty produkowane przez metaloproteazy, ich rola podczas różnicowania komórek macierzystych – znaczenie dla rozwoju guza i angiogenezy”** - Decyzja nr 343/N-INCA/2008/0z dnia 29.10.2008 r.

Kierownik: **prof. dr hab. Czesław Cierniewski**
Okres realizacji: 18.XI. 2008 – 19.XI. 2011 r.

Zgodnie z harmonogramem w drugim etapie badan skupiliśmy się na identyfikacji białek błony komórkowej, które ulegają degradacji pod wpływem metaloproteinaz macierzowych w migrujących komórkach. We wstępnych etapach badań naszym modelem były komórki HT29 aktywowane tymozyną β4 (Tβ4), która jak wykazaliśmy w poprzednim etapie aktywuje uwalnianie głownie MMP-2. Wykazaliśmy, że komórki po uwolnieniu MMP-2 wykazują podwyższoną inwazyjność, która ulega zahamowaniu w obecności swoistych przeciwciał dla MMP-2. Po zastosowaniu cytometrii przepływowej wykazaliśmy, że MMP-2 pojawia się w zwiększonej ilości na powierzchni komórek migrujących. W celu identyfikacji substratów tego enzymu, białka błony komórek kontrolnych i aktywowanych Tβ4 zostały biotynylowane i porównano profil wybarwiony awidyną powiązaną z peroxydazą. Znaleziono szereg nowych polipeptydów, wśród których zidentyfikowano fragment 1-276 podjednostki integrynowej β1. Fragment ten odpowiada domenie I receptorów integrynowych, tj, tej, która bezpośrednio oddziałuje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. W toku następnych badań wykazano, że MMP-2 wiąże się z receptorem α5β1 oraz α2β1 w błonie komórek HT29, nadtrawia podjednostkę β1 tym samym inaktywując receptor. Ma to przełożenie na obniżoną adhezyjność komórek oraz ich większą mobilność w obrębie macierzy.

Ekspresja MMP-2 i MMP-9 w komórkach raka jelita grubego HT29 i LoVo. Ekspresję obu metaloproteinaz badano na poziomie mRNA, syntezy białka oraz aktywności proteolitycznej w komórkach HT29 i LoVo. Badania te wykazały, że MMP-2 jest główną metaloproteinazą w tych komórkach, komórki LoVo charakteryzują się wyższą ekspresją MMP-2 od tej, znajdywanej w komórkach HT29. Podwyższona ekspresja MMP-2 w komórkach LoVo koreluję z ich większą inwazyjnością badana w Matrigelu.

Degradacja podjednostki β1 w komórkach raka jelita grubego. We wstępnych badaniach podjęto próbę identyfikacji białek błony komórkowej, które ulegają degradacji pod wpływem MMP-2. Wstępną identyfikację wykonano po porównaniu profili białek biotynylowanych błony komórkowej uzyskanych z kontrolnych i aktywowanych Tβ4. Następnie, wykonano doświadczenia immunoprecypitacji korzystając z różnych przeciwciał dla podjednostki β1, w tym przeciwciał BD610468, które wyłącznie reagują z domeną I. Wykryto, że komórki HT29 w odróżnieniu od komórek śróbłonka nawet w stanie spoczynku zawierają częściowo

uszkodzone receptory z rodziny β1. Proces degradacji tych receptorów nasila się po aktywacji Tβ4. W celu identyfikacji tych receptorów, następnie wykonano doświadczenia w układzie izolowanym z użyciem czystych preparatów α5β1 oraz α2β1, tj. głównych integrin w tych komórkach, które swoiście reagują z fibronektyną i kolagenem macierzy. Doświadczenia te potwierdziły, iż oba receptory hydrolizowane MMP-2 uwalniają domenę I. W kolejnych doświadczeniach użyto próbek klinicznych pobranych podczas operacji chorych na raka jelito grubego w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej. Proces degradacji podjednostki β1 w próbkach klinicznych był bardzo zróżnicowany i zależał od stopnia złośliwości nowotworu.

Oddziaływanie MMP-2 z integrynami rodziny β1. Zakres oddziaływania scharakteryzowano na drodze ko-immunoprecypitacji uzywając swoiście tym celu komórki HT29 oraz próbki kliniczne pochodzące z chirurgicznie usuniętych nowotworów. W obu przypadkach wykazano, że integryny β1 znajdują się w kompleksie z MMP-2, przy czym szczególnie to powiązanie obserwuję się w preparatach nowotworowych. Bezpośrednie oddziaływanie oby białek wykazano następnie swoiście układzie izolowanym, swoiście którym oceniono kinetykę oddziaływania, a także powinowactwo wiązania MMP-2 z α5β1 oraz α2β1 za pomocą systemu BIAcore.

POMOST_C/16

Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki, **Program Pomost**

Kierownik projektu: Dr Patrycja Przygodzka

Okres realizacji: 01.07.2010 - 31.10.2010

W ramach programu Pomost – wsparcie dla kobiet w ciąży (POMOST_C/16, okres realizacji 01.07.2010r – 31.10.2010r) dr Izabela Papiewska-Pająk realizowała zadania badawcze w zastępstwie za Patrycję Przygodzką (laureatkę) w ramach projektu „ Nowa, wewnątrzkomórkowa rola inhibitorów aktywatorów plazminogenu w komórkach śródbłonka."

Zadania zrealizowane przez zastępcę:

1. Przygotowanie modelu badawczego komórek linii Hela z nadekspresją białek PAI-1 i PAI-2. W tym: klonowanie PAI-1 i PAI-2 do wektorów ekspresyjnych pCMV/HA, transfekcja komórek otrzymanymi plazmidami oraz ocena stopnia nadekspresji PAI-1 i PAI-2 w lizatach komórkowych.
2. Badanie wpływu hamowania aktywności proteasomu na właściwości proteolityczne w komórkach śródbłonka czyli ocena wpływu nadekspresji PAI-1 i PAI-2 na ekspresję wyranych białek, ulegających degradacji w szlaku Protasom/ubikwityna (p53, inhibitor NFκB)
3. Przeprowadzenie analizy aktywności proteasomu przy użyciu przygotowanych lizatów komórkowych i zastosowaniu substratów fluorogennych.

W wyniku prac nad projektem przygotowano i opublikowano pracę: Plasminogen activator inhibitor type 1 interacts with alpha3 subunit of proteasome and modulates its activity. Boncela J, Przygodzka P, Papiewska-Pajak I, Wyroba E, Osinska M, Cierniewski CS. J Biol Chem. 2011 Feb 25;286(8):6820-31. Epub 2010 Dec 6.

POMOST_C/24

Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki,Program Pomost

Kierownik projektu: Mgr Małgorzata Ziółkiewicz

Okres realizacji: 01.11.2010 - 31.01.2011

Przygotowano wektor do homologicznej rekombinacji, niosący defektywny gen, którego produkt białkowy uczestniczy w naprawie DNA u mykobakterii, oraz wektor integracyjny zawierający całą, funkcjonalną kopię w/w genu. Skonstruowano następnie ukierunkowanego mutanta Mycobacterium, pozbawionego możliwości syntezy wybranego enzymu zaangażowanego w naprawę DNA (Parish i Stoker, 2000). W dalszym etapie pracy badano przeżywalność mutantów Mycobacterium po ekspozycji na czynniki uszkadzające DNA, poddając przygotowany szczep oraz szczepy kontrolne działaniu różnym dawkom promieniowania UV. Wykonano dwa powtórzenia doświadczenia.

Projekty badawcze własne realizowane w latach 2006 -2011 roku – ogółem

w tym wg konkursów

Tytuł projektu		Kierownik projektu	Okres realizacji	Koszt projektu[1]
1.	**Grant N405 05132/3292** Pochodne adenozyny modyfikowane klasterami boru – nowy typ modulatorów funkcji biologicznych ludzkich neutrofilów in vitro.	prof. dr hab. Zbigniew J. **Leśnikowski**	22.04.2007 15.04.2010	380.572
2.	**Grant N301 3382 33** Procesy naprawy DNA w patogenezie prątków gruźlicy.	prof. dr hab. Jarosław **Dziadek**	09.10.2007 08.10.2010	284.200
3.	**Grant N303 3586 33** Nowa, wewnętrzna rola inhibitorów plazminogenu w komórkach śródbłonka.	dr Joanna **Boncela**	18.10.2007 17.09.2010	300.000
4.	**Grant N407 3568 34** Udział receptorów adhezyjnych i Toll-podobnych w oddziaływaniu neutrofilów krwi obwodowej z komórkami nowotworowymi izolowanymi z raka jajnika in vitro.	dr hab. **Zofia Sułowska,** prof. IBM PAN	08.05.2008 07.05.2011	269.423
5.	**Grant N N401 021035** Miejscowa synteza, mechanizmy jej regulacji oraz zmiany ekspresji wybranych lektyn i proteazy serynowej MASP-2 w nowotworach jajnika.	dr hab. **Anna Świerzko,** prof. IBM PAN	08.09.2008 07.09.2011	300.000
6.	**Grant N N 301 164335** Znaczenie epigenetycznej regulacji ekspresji genu HIF1A w komórkach krwi.	dr Aurelia **Walczak-Drzewiecka**	27.08.2008 26.08.2011	351.000
7.	**Grant N407 3568 34** Aktywność biologiczna płytkowego białka PBP oraz jego pochodnych (beta-TG, NAP-2) – rola w przebiegu stanów zapalnych.	dr hab. Maria Anna **Kowalska**	15.09.2008 14.09.2012	410.000
8.	**Grant nr N N401 162137** Pre-walidacja molekularnej metody TRS-PCR dla genotypowania prątków Mycobacterium gordonae i Mycobacterium avium.	dr hab. Paweł **Parniewski,** prof. IBM PAN	10.09.2009 15.09.2012	298.300
9.	**Grant N N 301 425438** Poszukiwania szlaków Transdukcji sygnału zaangażowanych w proapoptotyczne działanie hipokretyn (oreksyn) w komórkach kory mózgowej szczura.	prof. dr hab. Jolanta B. **Zawilska**	16.03.2010 15.03.2013	393.900
10.	**Grant N N 301 507638** Poszukiwanie ligandów dla receptora jądrowego RORgamma jako potencjalnych czynników terapeutycznych w chorobach autoimmunologicznych.	dr Marcin **Ratajewski**	16.03.2010 15.03.2013	357.500
11.	**Grant N N402 352438** Badania wybranych czynników odporności wrodzonej u pacjentów oddziałów intensywnej terapii.	dr hab. Maciej **Cedzyński,** prof. IBM PAN	03.03.2010 02.03.2013	317.250
12.	**Grant N N302 113138** Biotechnologia rekombinantowej tymozyny beta4 – standaryzacja produkcji i aktywność biologiczna.	dr Radosław **Bednarek**	17.03.2010 16.03.2013	300.000
13.	**Grant N N204 531739** Klastery boru jako znaczniki elektrochemiczne do konstrukcji bioczujnika DNA do detekcji zakażeń wirusowych.	dr Agnieszka **Olejniczak**	17.09.2010 16.09.2013	218. 640

Projekt badawczy nr N405 05132/3292

pt.: **Pochodne adenozyny modyfikowane klasterami boru – nowy typ modulatorów funkcji biologicznych ludzkich neutrofilów *In vitro*.**

Kierownik projektu: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Okres realizacji: 22.04.2007 - 15.04.2010

Klastery boru stanowią nowy typ farmakoforów i molekularnych modulatorów właściwości związków stosowanych w projektowaniu leków. W Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej IBM PAN prowadzone są badania nad syntezą nukleozydów i kwasów nukleinowych modyfikowanych klasterami boru, badaniami ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych, i ich zastosowaniami. W ramach niniejszego projektu skoncentrowaliśmy się na syntezie i badaniach pochodnych adenozyny, ważnego biologicznie nukleozydu którego aktywności biologiczne przejawiają się min. poprzez oddziaływania z receptorami purynergicznymi. Aktywność receptorów purynergicznych związana jest z etiopatogenezą wielu schorzeń min. chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, chorób autoimmunologicznych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i wielu innych. Z tego powodu adenozyna jest często związkiem wyjściowym w projektowaniu struktur nowych cząstek o potencjalnym działaniu terapeutycznym.

Realizując zadania badawcze projektu opracowaliśmy nowe metody syntezy koniugatów adenozyny i klasterów boru. Spośród tych metod, metoda oparta na 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydów i alkinów (metoda „click chemistry") wydaje się szczególnie atrakcyjna. Otrzymaliśmy bibliotekę pochodnych adenozyny modyfikowanych klasterami boru liczącą kilkadziesiąt nowych związków i poddaliśmy ją badaniom przesiewowym badając aktywność otrzymanych cząstek jako inhibitorów produkcji reaktywnych form tlenu w neutrofilach ludzkich oraz inhibitorów agregacji płytek krwi *in vtro* a także oddziaływanie wybranych pochodnych z receptorem A2A. Stwierdziliśmy, że podstawienie adenozyny farmakoforem karboranylowym w pozycji 2' jak np. w związku ZL-0943/BW powoduję istotną zmianę właściwości tego liganda i wpływ na produkcję RTF przez neutrofile aktywowane nie tylko przez fMLP, ale także przez PMA, hamuje także adhezję tych komórek do fibronektyny. Stwierdziliśmy ponadto, że związki ZL-0943/BW i ZL-0984/AA (modyfikacja w pozycji N6) wykazują właściwości agonistyczne względem receptora A2A. W innym nurcie prac badaliśmy antagonistyczne działanie wybranych koniugatów adenozyny modyfikowanych klasterem boru w stosunku do analogu adenozyny NECA oraz do selektywnego agonisty receptora A2A, CGS 21680. Przeprowadzone badania wykazały, że związek ZL-0962/AO (modyfikacja w pozycji N6) jest antagonistą receptora A2A. Do badania specyficznych oddziaływań pochodnych adenozyny z receptorem A2A, zastosowaliśmy również płytki krwi. Wykazaliśmy, że związek ZL-0943/BW charakteryzuje się specyficznym oddziaływaniem z receptorem A2A i hamuje agregację płytek oraz sekrecję białek w stężeniach ok. 100 razy niższych, niż adenozyna.

Uzyskane wyniki stwarzają racjonalne podstawy dalszych badań nad optymalizacją struktury koniugatów adenozyny i klasterów boru modyfikowanych w pozycji 2' i N6 jako modulatorów produkcji RTF i inhibitorów agregacji płytek krwi nowego typu.

Wyniki przeprowadzonych badań opublikowaliśmy w czterech pracach oryginalnych, jednej pracy przeglądowej oraz 14 komunikatach na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Zgłosiliśmy także wniosek patentowy krajowy zat. „Boranowe pochodne adenozyny" (UP RP, 6 luty 2009) oraz zgłoszenie patentowe międzynarodowe zat. „Borane derivatives of adenosine" (05 February 2010, PCT/PL2010/050004) autorzy: Zbigniew J. Leśnikowski, Agnieszka Olejniczak, Zofia Sułowska, Katarzyna Bednarska.

Realizacje projektu zakończono w roku 2010. Pismem z dnia 26 listopada 2010 Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego uznało umowę dotyczącą ww. projektu za rozliczoną.

Projekt badawczy nr N301 3382 33

pt.: **Procesy naprawy DNA w patogenezie prątków gruźlicy.**

Kierownik projektu: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**
Okres realizacji: 09.10.2007 - 08.10.2010

W roku 2010 były realizowane następujące zadania badawcze:

1. Konstrukcja wektorów rekombinacyjnych pozwalających na ukierunkowaną delecję genów ligC i prim3 *M. tuberculosis*. Przeprowadzenie homologicznej rekombinacji w komórkach M. tuberculosis. Selekcja podwójnych homologicznych rekombinantów. Potwierdzenie genotypu otrzymanych szczepów.

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem mutantów *M. smegmatis* pozbawionych zdolności do syntezy funkcjonalnej ligazy LigC oraz primazy Prim3 wykazały, że znaczenie tych enzymów dla naprawy podwójnych pęknięć w DNA jest stosunkowo niewielkie. Obserwowany efekt dotyczył mutagenów powodujących wiele różnych uszkodzeń, w tym DSBs, natomiast w przypadku łączenia (ligowania) *in vivo* linearnych plazmidów nie obserwowano znaczącej roli badanych białek. Uzyskane wyniki spowodowały, że planowane wyłączenie genów *ligC* i *prim3* w prątkach gruźlicy postanowiono zastąpić podobną delecją genów *ligD* oraz *ku*, znanych elementów systemu NHEJ, których rola w patogenezie prątków jest do tej pory nieznana. W tym celu na podstawie znanej sekwencji genomu *M. tuberculosis* H37Rv zaplanowano sekwencje starterowe pozwalające na amplifikację regionów od strony 3' badanych genów (geny *ligD* oraz *ku* sąsiadują ze sobą i znajdują się w pozycji „tail to tail"). Uzyskane produkty amplifikacji klonowano w wektorze pJet1.2 a następnie produkty amplifikacji noszące regiony 3'genów przeklonowywano do wektora p2NIL. W ten sposób w wektorze p2NIL uzyskano rekombinowane, badane geny pozbawione fragmentu 5'. Do tak skonstruowanego plazmidu wprowadzono następnie kasetę markerową noszącą gen lacZ (niebieska barwa kolonii rosnących w obecności X-gal) oraz sacB (gen samobójczy w obecności sacharozy). Uzyskany wektor p2Nil-ΔligD-ku nie posiadające miejsca inicjacji replikacji rozpoznawanego w komórkach mykobakterii został wykorzystany do procesu homologicznej rekombinacji. Poprzez odpowiednią selekcję uzyskano najpierw mutanty typu SCO (zawierające zarówno geny dzikie jak i rekombinujące do chromosomu wraz z plazmidowym DNA geny z wewnętrzną delecją) a następnie przeprowadzono selekcję mutantów DCO zawierających wyłącznie geny dzikie lub zmutowane. Identyfikację mutantów zawierających wyłącznie zmutowaną formę genów przeprowadzono poprzez amplifikację DNA *in vitro*, a następnie uzyskane wyniki potwierdzono metodą hybrydyzacji typu Southern blot. Ponadto podjęto również prace zmierzające do usunięcia aktywnej formy genu *recA* w *M.*

tuberculosis. Badania te są na etapie konstrukcji właściwego wektora dla homologicznej rekombinacji. Usunięcie genu *recA* pozwoli na zatrzymanie procesu homologicznej rekombinacji w komórkach mutantów co pozwoli na bezpośrednią obserwację roli systemu NHEJ dla patogenezy prątków gruźlicy.

2. Konstrukcja wektorów rekombinacyjnych pozwalających na ukierunkowaną delecję genów disA i radA M. tuberculosis. Przeprowadzenie homologicznej rekombinacji w komórkach M. tuberculosis. Selekcja podwójnych homologicznych rekombinantów. Potwierdzenie genotypu otrzymanych szczepów.

Poszukując funkcji dla produktów genów *disA* oraz *radA* postanowiono skonstruować defektywne szczepy *M. tuberculosis* pozbawione zdolności do syntezy tych enzymów. W tym celu na podstawie znanej sekwencji genomu *M. tuberculosis* H37Rv zaplanowano sekwencje starterowe pozwalające na amplifikację regionów od strony 5' oraz 3' badanych genów. Uzyskane produkty amplifikacji klonowano w wektorze pJet1.2 a następnie produkty amplifikacji noszące regiony 3'i 5' danego genu przeklonowywano do wektora p2NIL. W ten sposób w wektorze p2NIL uzyskano rekombinowane, badane geny noszące wewnętrzną delecję, otoczone przez sekwencje flankujące 5' i 3'. Do tak skonstruowanych, rekombinowanych wektorów wprowadzono następnie kasetę markerową noszącą gen lacZ (niebieska barwa kolonii rosnących w obecności X-gal) oraz sacB (gen samobójczy w obecności sacharozy). Uzyskane wektory p2Nil-ΔradA oraz p2Nil-ΔdisA nie posiadające miejsca inicjacji replikacji rozpoznawanego w komórkach mykobakterii zostały wykorzystane do procesu homologicznej rekombinacji. Poprzez odpowiednią selekcję uzyskano najpierw mutanty typu SCO (zawierające zarówno geny dzikie jak i rekombinujące do chromosomu wraz z plazmidowym DNA geny z wewnętrzną delecją) a następnie przeprowadzono selekcję mutantów DCO zawierających wyłącznie geny dzikie lub zmutowane. Identyfikację mutantów zawierających wyłącznie zmutowaną formę genów przeprowadzono poprzez amplifikację DNA *in vitro,* a następnie uzyskane wyniki potwierdzono metodą hybrydyzacji typu Southern blot.

Ponadto wykorzystano wcześniej skonstruowane w naszym zespole mutanty *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych genów ligD i ku. Mutanty te zastosowano do badań znaczenia systemu naprawy NHEJ dla stabilności prostych i odwróconych powtórzeń w genomie mykobakterii. W tym celu wykorzystano odpowiednio skonstruowany plazmid zawierający proste i odwrócone powtórzenia potencjalnie zdolne do tworzenia struktury poślizgowej i krzyżowej DNA, zaopatrzony w szereg genów markerowych pozwalających na śledzenie powstających niestabilności. Plazmid ten wprowadzono do szczepów mutantów ΔligDΔku oraz ΔrecA oraz do szczepu kontrolnego a następnie obserwowano zależności pomiędzy obecnością funkcjonalnych systemów NHEJ i HR a niestabilnościami zależnymi od obecności prostych i odwróconych powtórzeń. Wykazano jednoznacznie, że funkcjonalny system NHEJ oraz w mniejszym stopniu obecność białka RecA stabilizują potencjalnie mutagenne sekwencje powtórzone w genomie mykobakterii. Ta część wyników została włączona do manuskryptu, który złożono do publikacji (manuskrypt w załączeniu).

3. Infekcja linii monocytarno/makrofagowej J744, oraz makrofagów otrzewnowych myszy szczepem dzikim i mutantami M. tuberculosis niezdolnymi do ekspresji LigC i Prim3. Określenie przeżywalności badanych drobnoustrojów w makrofagach. Badanie zdolności przeżywalności badanych drobnoustrojów w makrofagach po uprzednim poddaniu bakterii działaniu czynników mutagennych.

Zmutowany szczep *M. tuberculosis* ΔksdD-Δku uzyskany podczas realizacji zadania 5 oraz szczep kontrolny hodowano w warunkach *in vitro* do fazy aktywnego wzrostu a następnie hodowla została rozporcjowana i zamrożona. Po upływie jednego tygodnia pobrano jedną porcję każdego typu komórek i wysiano na podłoża w celu określenia liczby żywych drobnoustrojów (cfu). Po uzyskaniu tej informacji rozmrażano kolejne porcje komórek bakteryjnych i barwiono fluoresceiną. Tak wybarwione bakterie w równoważnej liczbie dla szczepu mutanta oraz szczepu kontrolnego opsonizowano lub nie z ludzką surowicą AB i dodawano do hodowli nie aktywowanych i aktywowanych przez IFNΔ makrofagów, linii komórkowej THP1 w stosunku 1:1 oraz 10:1 komórek bakteryjnych na jedną komórkę makrofagową. Liczbę pochłoniętych mykobakterii oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w pochłanianiu komórek mutantów w porównaniu do komórek kontrolnych.
Przeżywalność prątków szczepu dzikiego oraz mutanta w makrofagach oceniano metodą CFU (jednostek tworzących kolonie). W tym celu po infekcji makrofagów w czasie 0, 2 i 6 dni prowadzono lizę komórek makrofagów, odzyskiwano bakterie, które przenoszono na podłoża stałe. Dotychczasowe doświadczenia wskazują na znamienne osłabienie zdolności uzyskanych mutantów do wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach THP1 w porównaniu do szczepu dzikiego. Biorąc jednak pod uwagę możliwość częściowego maskowania poszukiwanego efektu przez sprawny system homologicznej rekombinacji (HR) postanowiono uzupełnić badania o analizy podwójnych mutantów pozbawionych zarówno funkcjonalnego systemu NHEJ jak i kluczowego dla HR białka RecA. W ramach realizacji projektu udało się uzyskać takiego mutanta z wykorzystaniem mechanizmu homologicznej rekombinacji a jego genotyp został potwierdzony z wykorzystaniem metody PCR oraz homologicznej rekombinacji. Analizy uzyskanego mutanta w warunkach infekcji makrofagów z racji na długotrwały proces badawczy będą kontynuowane już po zakończeniu tego projektu.

4. Infekcja linii monocytarno/makrofagowej J744, oraz makrofagów otrzewnowych myszy szczepem dzikim i mutantami M. tuberculosis niezdolnymi do ekspresji DisA, RadA oraz RadA i RecA. Określenie przeżywalności badanych drobnoustrojów w makrofagach. Badanie zdolności przeżywalności badanych drobnoustrojów w makrofagach po uprzednim poddaniu bakterii działaniu czynników mutagennych.

Zmutowane szczepy *M. tuberculosis* ΔradA-ΔdisA oraz ΔdisA uzyskane podczas realizacji zadania 6 oraz szczep kontrolny hodowano w warunkach *in vitro* do fazy aktywnego wzrostu a następnie określono liczbę żywych komórek jak opisano dla zadania 7 i wyznakowano fluoresceiną. Tak wybarwione bakterie w równoważnej liczbie dla szczepu mutanta oraz szczepu kontrolnego opsonizowano lub nie z ludzką surowicą AB i dodawano do hodowli nie aktywowanych i aktywowanych przez IFNΔ makrofagów, linii komórkowej THP1 w stosunku 1:1 oraz 10:1 komórek bakteryjnych na jedną komórkę makrofagową. Liczbę pochłoniętych mykobakterii oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym.
Wykazano, że opsonizowane i nie opsonizowane mutanty Dis A oraz DisA-RadA są znamiennie słabiej fagocytowane przez makrofagi zarówno aktywowane jak i nie aktywowane. Ponadto, odsetek makrofagów nie aktywowanych z pochłoniętymi mutantami Dis A jest istotnie niższy w porównaniu z odsetkiem makrofagów pochłaniających prątki szczepu dzikiego.
Przeżywalność prątków szczepu dzikiego oraz mutanta w makrofagach oceniano metodą CFU (jednostek tworzących kolonie). W tym celu po infekcji makrofagów w czasie 0, 2 i 6 dni prowadzono lizę komórek makrofagów, odzyskiwano bakterie, które przenoszono na podłoża

stałe. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że aktywacja makrofagów przez IFNΔ istotnie nasila ich zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania zarówno prątków szczepu dzikiego jak i jego mutantów. Stwierdzono ponadto, że opsonizowane mutanty Dis A i DisA-RadA są efektywniej zabijane przez makrofagi w porównaniu do szczepu dzikiego. Miarą tego jest istotnie mniejsza liczba przeżywających prątków mutantów izolowanych z infekowanych makrofagów w porównaniu do szczepu kontrolnego. Uzyskanie tak istotnej informacji spowodowało konieczność rozszerzenia badań o analizy *in vitro* białka DisA. Białko to, jak widać, istotne w procesie wewnątrzkomórkowego przeżywania prątków zostanie poddane badaniom funkcjonalnym pod kątem jego oddziaływań z DNA. Obecnie gen disA *M. tuberculosis* poddano amplifikacji i sklonowano w wektorze ekspresyjnym dla *E. coli* pHis a następnie uzyskano białko DisA w formie rozpuszczalnej. Białko to będzie wykorzystane w badaniach *in vitro*. Znacznie rozszerzono także badania dotyczące białka RadA zmierzając do identyfikacji jego funkcji w komórce w procesie naprawy DNA. Badania te będą kontynuowane po zakończeniu realizacji tego projektu.

Projekt badawczy nr N303 3586 33

pt.: **Nowa, wewnętrzna rola inhibitorów plazminogenu w komórkach śródbłonka**

Kierownik projektu: **dr Joanna Boncela**
Okres realizacji: 18.10.2007 - 17.09.2010

Składniki systemu fibrynolizy/aktywacji plazminogenu, a wśród nich inhibitory plazminogenu typu 1 i 2 tj. PAI-1 i PAI-2, biorą udział w regulacji wielu różnorodnych procesów biologicznych. Ostatnio wydaje się, że ich aktywność niekatalityczna zyskuje coraz większe znaczenie, jeśli chodzi o badania dotyczące zjawisk zachodzących na poziomie molekularnym i we wnętrzu komórek. Nasze wstępne badania z zastosowaniem metody dwuhybrydowej wykazały, że PAI-1 tworzy kompleks z podjednostką α3 proteasomu. Podobne obserwacje, ale dotyczące PAI-2 opublikowali Fan i wpół. (2004). Wyniki te potwierdzają hipotezę o nieinhibitorowej funkcji PAI-1 i PAI-2, zwłaszcza wewnątrz komórek. W realizowanym projekcie podjęliśmy próbę wyjaśnienia fizjologicznej roli tego kompleksu. W pierwszym etapie badań potwierdziliśmy oddziaływanie PAI-1 z podjednostką α3 w warunkach *in vitro,* w teście ELISA i precypitacji kompleksów białkowych z użyciem białek rekombinantowych i specyficznych przeciwciał. Następnie wykazaliśmy obecność tego kompleksu w komórkach śródbłonka z użyciem mikroskopu konfokalnego i elektronowego. Analizowane obrazy wykazały obecność kompleksów badanych białek z proteasomem, pozwoliły również na identyfikację struktur komórkowych, w których obecny jest badany kompleks. Zaobserwowano zwiększoną wspólną lokalizację obu białek w strukturach aparatu Golgiego. Co więcej wykazaliśmy, że nadekspresja PAI-1 blokuje aktywność proteolityczną proteasomu w komórkach.

Podsumowując nasze prace po raz pierwszy potwierdziły oddziaływanie PAI-1 z podjednostką α3 proteasomu. Wykazaliśmy, że w komórkach PAI-1 jest w kompleksie ze strukturą 20S proteasomu, co więcej moduluje jego właściwości proteolityczne. Mechanizm tego oddziaływanie wymaga jeszcze dalszych badań. Prawdopodobnie PAI-1 poprzez formowanie

„agresomów''(agregatów białkowych) blokuje zdolność degradacyjną proteasomu, co może mieć szczególne znaczenie np., w procesie apoptozy komórek śródbłonka, zachodzącej podczas wielu zjawisk biologicznych, zarówno fizjologicznych (gojenie ran, angiogeneza), jak i patologicznych (miażdżyca tętnic).

Projekt badawczy nr N407 3568 34

pt.: **Udział receptorów adhezyjnych i Toll-podobnych w oddziaływaniu neutrofilów krwi obwodowej z komórkami nowotworowymi izolowanymi z raka jajnika In vitro.**

Kierownik Projektu: dr hab. Zofia Sułowska, prof. IBM PAN.

Okres realizacji: 08.05.2008 - 07.05.2011

Materiał badawczy stanowi krew obwodowa oraz fragmenty tkanki nowotworowej pobrane od kobiet z III stopniem zaawansowania raka jajnika wg klasyfikacji FIGO. Kontynuacja zadań badawczych w roku 2010 przebiegała zgodnie z harmonogramem, a badania w szczególności skupione były na:

1. Ocenie adhezji neutrofilów izolowanych z krwi obwodowej chorych na raka jajnika oraz osób zdrowych do komórek nowotworowych metodą mikroskopowego obrazowania fluorescencji
2. Ocenie adhezji neutrofilów w komorze przepływowej

Do oceny adhezji neutrofilów krwi obwodowej, oprócz komórek izolowanych bezpośrednio po pobraniu guza, w badaniach wykorzystano hodowle komórek z utworzonej w Pracowni kolekcji komórek nowotworowych izolowanych z guzów raka jajnika, zgromadzonych w toku realizacji projektu.

Ad 1. Neutrofile izolowane z krwi osób chorych i zdrowych pre-inkubowano z przeciwciałami przeciwko cząsteczkom adhezyjnym obecnym na ich powierzchni. Kontrolę stanowiły neutrofile nie pre-inkubowane z przeciwciałami. Po inkubacji neutrofile nanoszono na komórki nowotworowe izolowane z guzów jajnika od chorych (kolekcja własna) lub linii komórkowej OVCAR-3, hodowane na płytce 96-dołkowej płynie odżywczym RPMI z dodatkiem FCS (10%), antybiotyków oraz insuliny i EGF. Następnie do komórek dodawano płyn HBSS lub fMLP. Zastosowano również układ, w którym neutrofile nie inkubowane z przeciwciałami (kontrolne) nanoszono na warstwę komórek nowotworowych pre-inkubowanych z przeciwciałami rozpoznającymi cząsteczkę ICAM-1. Po inkubacji (30 min., 37°C w atmosferze 5% CO_2) nie adherujące neutrofile usuwano, a warstwę pozostałych, adherujących komórek utrwalano 1,5% roztworem paraformaldehydu (PFA). Adhezję oceniano metodą obrazowania fluorescencji przy użyciu mikroskopu Nikon ECLIPSE TE 2000-U, a komórki liczono przy użyciu programu komputerowego NisElements 3.0. Zastosowane w badaniach komórki w 99% wykazywały obecność antygenu EpCAM oraz wysoką ekspresję cząsteczki ICAM-**1** (MFI 668 ± 120, 410-982).

Stwierdzono, że nie stymulowane neutrofile izolowane z krwi chorej adherowały do komórek nowotworowych w podobnym stopniu, jak stymulowane fMLP. Zaobserwowano, że wysokiej adhezji neutrofilów spoczynkowych odpowiada wysoka ekspresja cząsteczki CD11b na neutrofilach (MFI 1660) oraz znaczna ekspresja ICAM-1 na komórkach nowotworowych.

Obecność przeciwciał wiążących się z cząsteczką ICAM-1 na komórkach nowotworowych, oraz przeciwciał wiążących się z cząsteczkami CD11b oraz CD11a spowodowała obniżenie adhezji neutrofilów do komórek nowotworowych. Zmniejszenie adhezji neutrofilów obserwowano również po inkubacji komórek z przeciwciałami wiążącymi selektynę L oraz PSGL-1.

Dla porównania, dokonano także oceny adhezji neutrofilów izolowanych od zdrowych dawców do komórek nowotworowych pochodzących z hodowli linii komórkowej raka jajnika (OVCAR-3). Stwierdzono, że obecność przeciwciał wiążących się z cząsteczkami CD11b i CD11a powoduje znamienne zahamowanie adhezji neutrofilów aktywowanych fMLP do komórek nowotworowych, ponadto obecność przeciwciał anty-CD11b obniża również zdolność neutrofilów nie stymulowanych do adhezji. Związanie cząsteczek adhezyjnych przeciwciałami anty-ICAM-1, anty-sLex, anty-selektyna L i anty-PSGL-1 obecnych na neutrofilach nie ma istotnego wpływu na oddziaływania pomiędzy badanymi komórkami, którego efektem jest adhezja do komórek nowotworowych.

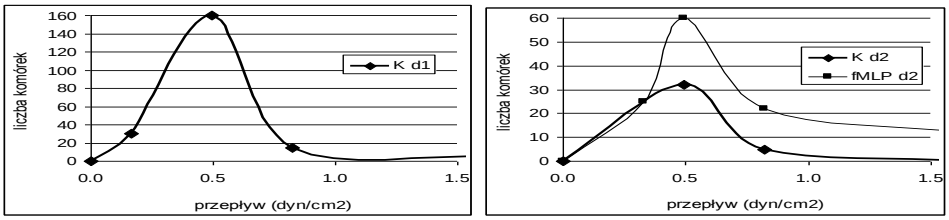
Ad 2. Zawiesinę neutrofilów (1 x 10^6 kom/ml) w HBSS pompowano do kanalików przepływowych (IBIDItreat) opłaszczonych fibronektyną lub komórkami izolowanymi z guza, przy użyciu pompy przepływowo-infuzyjnej (Harvard Apparatus). Badano zdolność do adhezji neutrofilów poddawanych różnym siłom przepływu – od 0,04 do 4 dyn/cm^2. Adhezję neutrofilów oceniano metodą jak opisano w punkcie 1.

W warunkach fizjologicznych na komórki krwi działają siły od 0,05 dyn/cm^2 (w małych żyłach) do 20 dyn/cm^2 (w aorcie brzusznej). Przyjmuje się, że neutrofile adherują (rolują i przylegają) w granicach przepływu od 0,8 do 1,5 dyn/cm^2.

W prezentowanych badaniach neutrofile od chorych najsilniej adherowały do warstwy komórek izolowanych z guza przy przepływie ok. 0,5 dyn/cm^2 (Rys. 1). Neutrofile od zdrowych dawców nie miały zdolności adhezji do komórek izolowanych z guza jajnika, w warunkach przepływu.

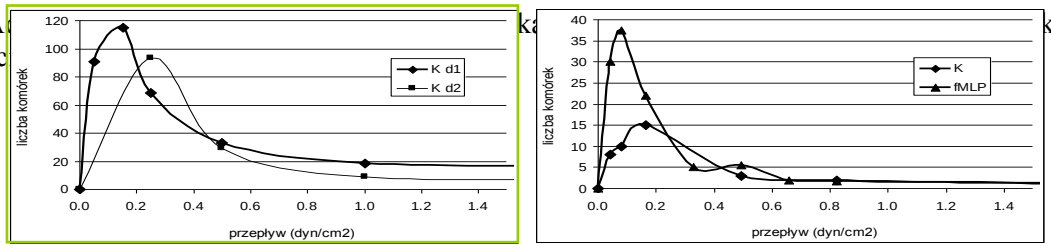
Do warstwy fibronektyny neutrofile osób chorych adherowały przy przepływie około 2-krotnie wolniejszym, 0,15 i 0,25 dyn/cm^2 (odpowiednio dawca 1 i dawca 2) (Rys. 2 A). Wyższe siły przepływu powodowały zmniejszenie liczby adherujących neutrofilów do fibronektyny (Rys.2 A).

Neutrofile izolowane z krwi zdrowego dawcy adherowały do fibronektyny w mniejszym stopniu i przy dwukrotnie niższych siłach przepływu, 0,08 dyn/cm^2, niż neutrofile od chorych (Rys. 2 B). Stymulacja fMLP powodowała zwiększenie liczby adherujących komórek (Rys. 2 B).



Rys. 1. A ka w zależnośc

A



Rys. 2. Adhezja neutrofilów zdrowych oraz od chorych na raka jajnika do fibronektyny w zależności od sił przepływu.

Projekt badawczy nr N401 021035

pt.: **Miejscowa synteza, mechanizmy jej regulacji oraz zmiany ekspresji wybranych lektyn i proteazy serynowej MASP-2 w nowotworach jajnika**

Kierownik: Dr hab. Anna Świerzko, prof. IBM PAN

Stwierdzono istotnie wyższą częstość występowania genotypów LXA/O i O/O (związane z całkowitym niedoborem lektyny wiążącej mannan – MBL) u pacjentek z pierwotnym rakiem jajnika, w porównaniu z grupą kobiet bez zmian rakowych (kobiety zdrowe i ze zmianami łagodnymi jajników). Mediany surowiczych stężeń MBL nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Ponadto, nie wykryto różnic częstości mutacji D105G genu *MASP2* (odpowiedzialnego za syntezę proteazy serynowej związanej z MBL-2, MASP-2) oraz aktywności kompleksów MBL-MASP-2. Również stężenia innego czynnika aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej – fikoliny H nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami.

Opracowano metodę analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu *FCN2* (dla fikoliny L) (z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP). W badaniach polimorfizmów rs17514136 i rs7865453 nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupami pacjentek z rakiem jajnika, ze zmianami łagodnymi tego narządu i kobiet zdrowych.

Oznaczano także polimorfizmy genów odpowiedzialnych za syntezę receptorów Toll-podobnych 2 i 4: *TLR2* (w pozycji 753) i *TLR4* (pozycja 299). Drugi z wymienionych występował istotnie częściej u kobiet z pierwotnymi zmianami rakowymi niż u kobiet bez takich zmian.

W badaniach PCR w czasie rzeczywistym wykazano wyższą ekspresję (na poziomie mRNA) genów *MBL2, MASP2* i *FCN2* w próbach tkanek guzów złośliwych, w porównaniu z tkankami jajników prawidłowych. Najwyższy poziom różnic zaobserwowano w przypadku genu *MASP2,* co zostało potwierdzone także w immunobarwieniu preparatów tkankowych (ekspresja na poziomie białka). Kontynuowane są również badania regulacji ekspresji regionów promotorowych wymienionych genów.

Projekt badawczy nr N N 301 164335

pt.: **Znaczenie epigenetycznej regulacji ekspresji genu HIF1A w komórkach krwi.**

Kierownik projektu: dr Aurelia Walczak-Drzewiecka

Okres realizacji:27.08.2008 – 26.08.2011

Sprawozdanie: W 2010 roku prace koncentrowały się na porównaniu poziomu ekspresji HIF1A w wybranych typach komórek krwi i zmianach w ekspresji tego genu w trakcie procesu różnicowania się komórek tucznych z komórek prekursorowych. Celem prześledzenia zmian w ekspresji HIF1A w kontekście wczesnych etapów różnicowania się komórek tucznych ustalono zestaw genów zawierających geny markerowe dla komórek tucznych takie jak: FCER1A, FCER1B1, FCER1G, FCER1B2, TPSAB1, TPSB2, TPSB2, CMA1, ARD1A, MERTK, geny kodujące białka wchodzące w interakcje z produktem genu HIF1A takie jak: PHD2, PHD3, VHL, SUMO, HBG, oraz gen kodujący marker komórek niezróżnicowanych CD34 i za pomocą RTPCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono analizę kinetyki ekspresji tych genów oraz genu HIF1A

w hodowlach komórek CD133+ wyizolowanych z krwi obwodowej za pomocą pozytywnej selekcji z użyciem systemu immunomagnetycznego (opłaszczonych przeciwciałami kulek ferromagnetycznych). Zaobserwowano, że już pierwszych kilku dni hodowli w obecności ustalonego koktajlu cytokinowego (SCF/IL-3/IL-6) dochodzi do indukcji ekspresji mRNA dla szeregu genów markerowych zróżnicowanych komórek tucznych. Za pomocą takiego podejścia eksperymentalnego można więc obserwować bardzo wczesne etapy różnicowania się ludzkich komórek tucznych. Analiza poziomu ekspresji HIF1A wskazała, że w komórkach CD133+ bezpośrednio po izolacji na kolumnach magnetycznych obserwowany jest wysoki poziom mRNA dla HIF1A od pięciu do dziesięciu razy przewyższający poziom w niefrakcjonowanych leukocytach krwi obwodowej. Po 24 godzinach hodowli poziom ekspresji HIF1A spadał do poziomu dwu trzykrotnie niższego od poziomu obserwowanego w leukocytach. W kolejnych tygodniach obserwowano stały wzrost poziomu ekspresji genów markerowych dla komórek tucznych oraz wzrost poziomu HIF1A do poziomu porównywalnego z poziomem ekspresji w obserwowanym w leukocytach. W poszukiwaniu wyjaśnienia dla nagłego wzrostu poziomu ekspresji HIF1A w trakcie izolacji komórek CD133+ przeprowadzono szereg dodatkowych doświadczeń w których zaobserwowano, że podobny przejściowy wzrost ekspresji HIF1A ma miejsce również w procedurach izolacji innych populacji komórkowych takich jak CD19+ i CD14+. Tak więc wydaje się , że wzrost ekspresji HIF1A nie jest związany z selekcją komórek krwi o fenotypie którego cechą charakterystyczną jest wysoka ekspresja tego genu, ale, że jest efektem przejściowego pobudzenia ekspresji HIF1A w wyniku zastosowanej procedury izolacyjnej. Dane literaturowe wskazują, że ekspresja HIF1A jest pobudzana przez stres mechaniczny, co może wyjaśniać nasze obserwacje jako, że komórki w trakcie izolacji immunomagnetycznej są zapewne narażone na tego typu czynnik stresowy. Reasumując komórki prekursorowe o fenotypie CD133+ w spoczynku charakteryzują się niską ekspresją HIF1A. Ekspresja tego genu ulega podwyższeniu w procesie różnicowania tych komórek w kierunku komórek tucznych. Ekspresja HIF1A w tych komórkach podlega również przejściowej regulacji po wpływem niektórych czynników zewnętrznych takich jak stres mechaniczny.
Wyniki prace nad zagadnieniem epigenetycznej kontroli ekspresji genu HIF1A w komórkach linii HMC-1 zostały opublikowane pt. "DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1" autorstwa Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Pułaski Ł, Dastych J. w Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):1028-32. Badania są kontynuowane.

<u>Projekt badawczy nr N407 3568 34</u>

pt.: **Aktywność biologiczna płytkowego białka PBP oraz jego pochodnych (beta-TG, NAP-2) – rola w przebiegu stanów zapalnych**

Kierownik projektu: dr hab. Maria Anna Kowalska

Okres realizacji: 15.09.2008 - 14.09.2012

Sepsa (posocznica) obejmuje wiele chorób powodujących wszechogarniającą infekcję krwioobiegu jest to specyficzna reakcja organizmu na zakażenie. Definiuje się ją poprzez zaspół

ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS) wywołany zakażeniem. Sepsa może prowadzić do wielonarządowej dysfunkcji organów (MODS). Komórki śródbłonka oddzielające płynącą krew od tkanek są najbardziej narażone na uszkodzenie, jako pierwsza bariera do pokonania przez leukocyty. W płucach uszkodzony śródbłonek powoduje wynaczynienie płynu do tkanki śródmiąższowej i wnętrza pęcherzyków płucnych wynikiem czego jest zapadanie pęcherzyków, przeciekanie nieutlenowanej krwi przez płuca i zmniejszenie pojemności zalegającej płuc. Równocześnie w sepsie zachodzą procesy przeciwzapalne, w których biorą udział cytokiny i chemokiny. Między innymi płytki zawierają magazyny cytokin i mediatorów w ziarnistościach alpha, które są uwalniane podczas aktywacji i biorą udział w wielu etapach zapalenia i odpowiedzi immunologicznej. Jednym z tych czynników jest płytkowe białko zasadowe (platelet basic protein – PBP). Produkt degradacji tego białka, NAP-2 (neutrophil activating peptide) jest aktywatorem neutrofili (PMN, z ang. polymorphonuclear leukocytes).

Jednym z modeli systemowego bądź lokalnego zapalenia, czyli sepsy jest model ostrego uszkodzenia płuc ALI (z ang. acute lung injury). Spowodowany jest on nagłym nieswoistym rozlanym odczynem zapalnym w płucach z towarzyszącym wzrostem przepuszczalności naczyń płucnych, co z kolei prowadzi do nagłego wycieku do płuc białek osocza i komórek hematopoetycznych. W wyniku zapalenia granulocyty PMN przechodzą do płuc poprzez pęcherzyki płucne. Obecność PMN w płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym BAL (z ang. bronchoalveolar lavage) jest złym markerem prognostycznym sepsy. W modelu zwierzęcym ALI, wewnątrzpłucne uszkodzenia i występowanie PMN w BAL jest skorelowane ze stanem ciężkim. Przy czym, gdy mamy mniejszą ilość PMN w BAL występuje mniejszy stopień uszkodzenia płuc. W badaniach mysiego modelu ALI i*n vivo* stopień uszkodzenia płuc mierzony jest przy pomocy wyznacznika ALI (ALI score z ang. acute lung injury score, Fig 1 A i 2A) a przepuszczalność mierzona jest przy pomocy przecieku znakowanego fluorescencyjnie dextranu (Fig 1B i 2B).

W przeprowadzanych badaniach używano myszy pozbawionych mysiego genu PBP, mPBP(-/-) i porównywano je ze szczepem dzikim (z ang. wild type WT). Używano również myszy trangenicznych z nadekpresją genu ludzkiego PBP. Myszy te były jednocześnie pozbawione genu mysiego [hPBP+mPBP(-/-)].

Eksperymenty przeprowadzane były na myszach w wieku 8-12 tygodni. Myszy uspiano nembutolem, 2 mg na 20g masy ciała, (średnia waga myszy). Uszkodzenie płuc wywoływano wstrzyknięciem około 0.3 ml 0.1N HCl (pH2; 2.5 mm/ml) przez tchawicę. Kontrolnym myszom podawano taką samą objętość roztwóru 0.9% NaCl. Następnie po 4 godzinach myszy usypiano, wprowadzano do tchawicy cewnik i eksponowano klatkę piersiową w celu zbadania poziomu uszkodzenia płuc ALI.

Stopień uszkodzenia czyli wyznacznik ALI (ALI score) wynosi od 1 – normalne płuca do 10 - liczne przekrwienia i krwawienia. Poziom 2-5 reprezenuje niewielkie uszkodzenia płuc, poziom 9-10 charakteryzują płuca napuchniete pełne krwi z wieloma uszkodzeniami, pośrednie poziomy 6-8 charakteryzują płuca naciekłe z niewielkimi krwawieniami.

Przepuszczalność naczyń krwionośnych mierzono dekstranem znakowanym izotiocianinem fluoresceiny (FITC) podawanym *in vivo*. 5 min po podaniu kwasu, do żyły szyjnej podawano 0.2 ml 1% dextranu znakowanego FITC. Po 4 godzinach myszy były zbijane i płyn BAL pobierano przez przemycie płuc dwukrotne 0.5 ml zimnym roztworem soli fizjologicznej z inhibitorami proteaz, płuca izolowano, homogenizowano i lizowano. Oznaczano poziom fluorescencji zarówno w lizatach jak i BAL wykorzystując spektrofluorymetr. Badania

przeprowadzono w kilku seriach po 3 do 5 myszy na jeden punkt pomiarowy. Przedstawione są wyniki badań dwóch serii (Fig 1 i Fig.2).
Początkowe badania przeprowadzono na 8-12 tygodniowych samicach. Aby wyniki eksperymentów uniezależnić od płci zwierząt kolejne doświadczenia przeprowadzono na samcach w tym samym wieku.

Na histogramie (Fig. 1A) przedatwiono poziom ALI (1-10) dla myszy dzikiego typu (WT) jak i myszy pozbawionych genu zasadowego białka plytkowego PBP mPBP(-/-) traktowanych kwasem solnym (HCl) lub solą o stężeniu normalnym (NaCl). Myszy WT mają ponad dwukrotnie wiekszy poziom ALI w porownaniu z myszami mPBP(-/-) po podaniu 0.1N HCl. Myszy kontrolne, zarowno dzikiego typu jaki i z knockout PBP mają poziom ALI poniżej 1.

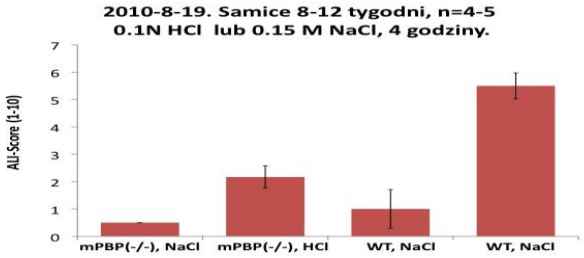


Fig. 1A. Poziom ALI w modelu wewnątrzpłucnego uszkodzenia ALI.

Poziom przepuszczalności naczyń płucnych (Fig. 1B) jest dwukrotnie wiekszy dla myszy WT w porównaniu z myszmi pozbawionymi genu płytkowego białka zasadowego PBP. Badania przeprowadzono w trzech seriach po 4 do 5 myszy na jeden punkt pomiarowy.

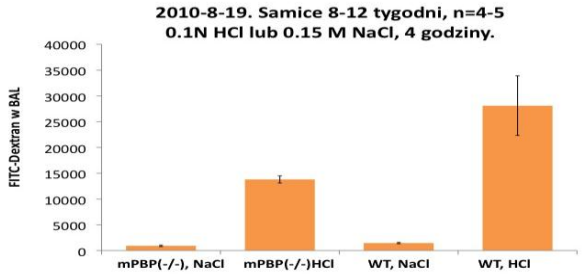


Fig. 1B Poziom przepuszczalności naczyń wewnatrzpłucnych w modelu ALI.

W następnych badaniach użyto zarówno myszy pozbawione genu białka PBP, jak i myszy z nadekspresją ludzkiego płytkowego białka zasadowego hPBP/mPBP(-/-) (przygotowanych na bazie myszy z knockout mPBP) oraz myszy WT (Fig. 2A i 2B).

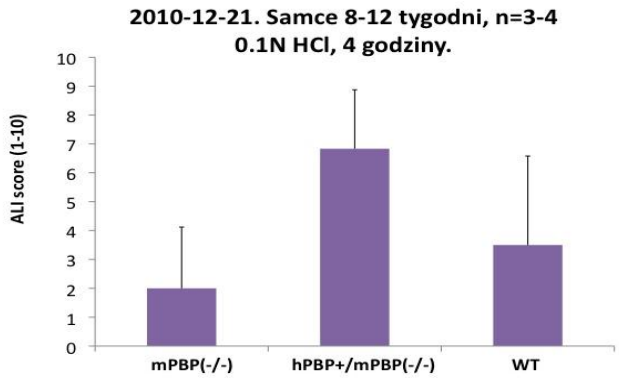


Fig.2A Poziom ALI w modelu wewnątrzpłucnego uszkodzenia ALI.

W doświadczeniu tym myszy pozbawione genu mPBP maja zmniejszoną o połowę wartość poziomu ALI, natomiast myszy z nadekspresja ludzkiego hPBP mają tę wartość podwyższoną prawie dwukrotnie w stosunku do myszy WT (Fig. 2A).

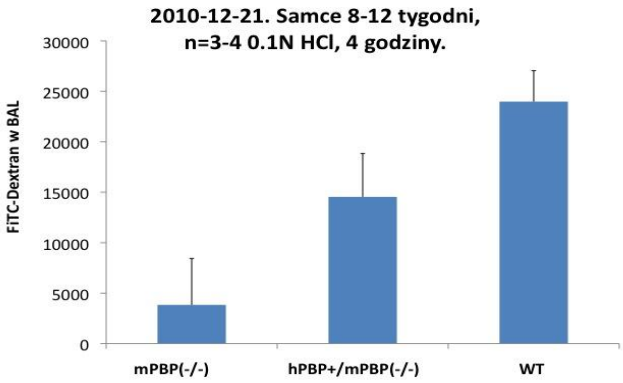


Fig. 2B Poziom przepuszczalności naczyń wewnatrzpłucnych w modelu ALI. Przepuszczalność naczyń krwionośnych w płucach jest największa dla myszy WT i zmiejsza sie pięciokrotnie dla myszy pozbawionych genu mPBP, a myszy z nadekspresją ludzkiego hPBP mają 1,6 razy mniejszą przepuszczalność naczyń (Fig.2 B).

Z przeprowadzonych badań wynika, że w modelu ALI myszy pozbawione geny mPBP charakteryzują się mniejszą przepuszczalnością naczyń krwionośnych w płucach oraz mają mniejsze uszkodzenia płuc. Myszy te nie posiadają NAP-2 czynnika aktywującego neutrofile będącego produktem degradacji płytkowego białka zasadowego, co może powodować wiekszą przeżywalność w modelu ostrego uszkodzenia płuc wynikającego z sepsy.

Projekt badawczy nr N N401 162137

pt.: **Pre-walidacja molekularnej metody TRS-PCR dla genotypowania prątków Mycobacterium gordonae i Mycobacterium avium.**

Kierownik projektu: dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN

Okres realizacji: 10.09.2009-15.09.2012

W ramach realizacji projektu badawczego kolekcję szczepów M. gordonae poddano analizom REP-PCR i ERIC-PCR. Pierwsza z tych analiz nie pozwoliła na uzyskanie wzorów prążkowych przydatnych dla analiz epidemiologicznych – uzyskiwane produkty PCR były nieliczne, słabo widoczne i niepowtarzalne. Natomiast zastosowanie metody ERIC-PCR pozwoliła na uzyskanie charakterystycznych profili prążkowych, które można było wykorzystać do przeprowadzenia analizy podobieństwa szczepów z kolekcji M. gordonae. Wynik tej analizy porównano z wynikami uzyskanymi w metodzie TRS-PCR. Biorąc pod uwagę efektywność różnicowania, metody ERIC-PCR była podobna do testów CAC- i CGG-PCR. Jednakże test z wykorzystaniem startera ERIC charakteryzował się znacząco niższą powtarzalnością uzyskiwanych wzorów. Szczegółowe wyniki dla poszczególnych starterów przedstawiono w poniższej tabeli.

TABLA 1.
Szczegółowa charakterystyka parametrów uzyskanych w testach TRS-PCR i ERIC-PCR dla kolekcji szczepów *M. gordonae*.

Użyty starter	CAC	CGG	ERIC	CAG	GTG	CTG	CCG	GTC	GAC	TCC	AGG
Indeks różnicowania (DI)[a]	0.975	0.948	0.93	0.893	0.887	0.859	0.694	0.611	0.41		
Liczba profili[a]	27	23	19	13	15	16	14	5	4	Brak produktów	Brak produktów
Wartość cluster cut-off [%]	49	74	46,2	81	45	76	79	86	82		
Powtarzalność [%]	92.0	94.4	86,3	93.4	86.6	91.7	90.6	92.3	78.1		

[a] obliczone biorąc pod uwagę powtarzalność .

Dodatkowo, rozszerzono posiadaną kolekcję szczepów M. avium i scharakteryzowano je z wykorzystaniem metody TRS-PCR (8 starterów zawierających GC-bogate motywy TRS). Uzyskane wzory prążkowe dołączono do posiadanej już bazy profili produktów TRS-PCR. Efektywność różnicowania szczepów w obrębie rozszerzonej kolekcji M. avium pozostała na wykazanym wcześniej poziomie.

Projekt badawczy nr N N 301 425438

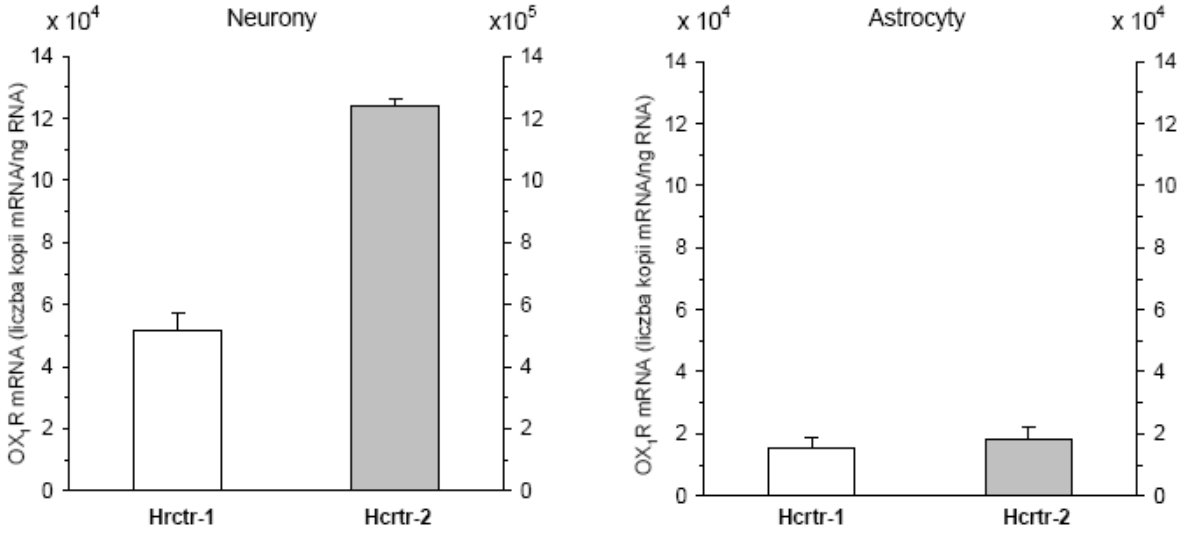
pt.: **Poszukiwania szlaków transdukcji sygnału zaangażowanych w proapoptotyczne działanie hipokretyn (oreksyn) w komórkach kory mózgowej szczura.**

Kierownik projektu: prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska

Okres realizacji: 16.03.2010 –15.03.2013

Hipokretyny (oreksyny) to zidentyfikowane w 1998 r. peptydy produkowane w neuronach podwzgórza, które charakteryzują się działaniem plejotropowym. Hipokretyny wywierają różnorodne działania biologiczne poprzez pobudzenie specyficznych receptorów błonowych: Hcrtr-1 i Hcrtr-2 (OX_1 i OX_2), które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G.

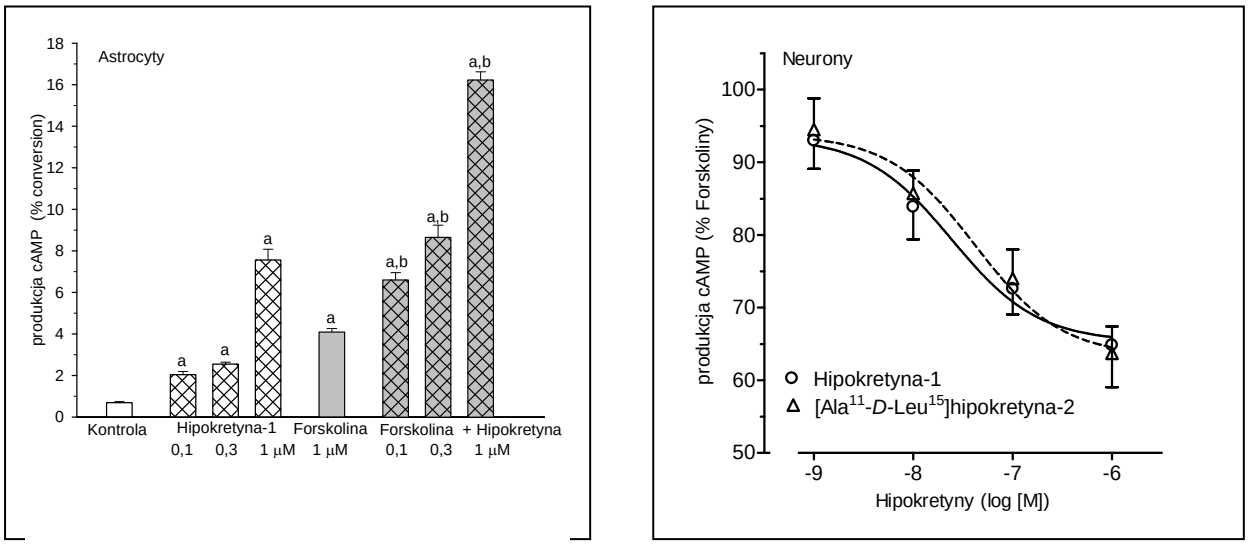
W pierwszej części realizacji projektu badawczego analizowano ekspresję receptorów hipokretynowych w pierwotnych hodowlach neuronów i astrocytów kory mózgowej szczura stosując ilościową technikę RT-PCR. W obydwu typach komórek wykazano obecność mRNA dla Hcrtr-1 i Hcrtr-2, przy czym ekspresja receptorów w neuronach była wyższa niż w astrocytach. Ponadto, w neuronach stopień ekspresji Hcrtr-2 był około 24-krotnie wyższy niż Hcrtr-1 (Ryc. 1).



Ryc. 1. Ekspresja receptorów Hcrtr-1 i Hcrtr-2 w pierwotnych hodowlach astrocytów i neuronów kory mózgowej szczura.

W pierwotnych hodowlach astrocytów kory mózgowej szczura hipokretyna-1 (nieselektywny agonista Hcrtr-1 i Hcrtr-2) stymulowała, w sposób zależny od zastosowanego stężenia i z wartością EC_{50} = 0,68 μM syntezę cAMP. [Ala^{11}-*D*-Leu^{15}]hipokretyna-2 (selektywny agonista Hcrtr-2) była nieaktywna. Hipokretyna-1 nasilała wzrost akumulacji cAMP wywołany przez forskolinę (Ryc. 2). Działanie hipokretyny-1 hamował SB408124 (selektywny antagonista Hcrtr-1), natomiast nie ulegało ono zmianom w obecności TCS 0X2 29 (selektywnego antagonisty Hcrtr-2). W pierwotnych hodowlach neuronalnych kory mózgowej szczura hipokretyna-1 i [Ala^{11}-*D*-Leu^{15}]hipokretyna-2 nie wpływały na podstawową syntezę cAMP. Oba peptydy hamowały, w sposób zależny od zastosowanego stężenia, wzrost produkcji cAMP wywołany przez forskolinę (Ryc. 2), polipeptyd stymulujący przysadkową cyklazę adenylową (PACAP27) i

naczyniowoaktywny peptyd jelitowy (VIP). Wyliczone wartości IC_{50} były w przedziale 16-42 nM. Działanie hipokretyny-1 znosił TCS 0X2 29 oraz toksyna krztuśca; SB408124 był nieaktywny.



Ryc. 2. Wpływ hipokretyn na syntezę cAMP w pierwotnej hodowli astrocytów i neuronów kory mózgowej szczura.

Powyższe wyniki wskazują na to, że hipokretyny w zależności od typu komórek, mogą w przeciwstawny sposób wpływać na syntezę cAMP. W astrocytach pobudzenie Hcrtr-1 stymuluje syntezę cAMP, natomiast w neuronach hipokretyny działając na Hcrtr-2 sprzężone z białkiem Gi hamują produkcję tego cyklicznego nukleotydu.
Hipokretyna-1 i [Ala^{11}-*D*-Leu^{15}]hipokretyna-2 w nieznacznym stopniu stymulowały ły syntezę IP_3 w hodowli astrocytów.

Projekt badawczy nr N N402 352438

pt.: Badania wybranych czynników odporności wrodzonej u pacjentów oddziałów intensywnej terapii.

Kierownik projektu: dr hab. Maciej Cedzyński. prof. IBM PAN

Okres realizacji: 03.03.2010 - 02.03.2013

Sepsa stanowi poważne wyzwanie dla medycyny. Jest zespołem chorobowym bardzo częstym w oddziałach intensywnej terapii i jedną z głównych przyczyn zgonów pacjentów tych oddziałów. Elementy odporności wrodzonej (między innymi dopełniacz i receptory przekazujące sygnał) oraz układ krzepnięcia są niezbędne dla utrzymania stanu homeostazy lub przywrócenia go w sytuacjach takich jak zakażenie czy uraz. Niedobory odporności nasilają podatność na zakażenia, co jest szczególnie niebezpieczne u pacjentów oddziałów intensywnej terapii. Z drugiej strony, hiperaktywacja układu odpornościowego (jak i układu krzepnięcia), do której dochodzi w trakcie sepsy, stanowi poważne zagrożenie życia chorego. Celem projektu jest przeprowadzenie badań genetycznie uwarunkowanych zaburzeń syntezy czynników aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej (lektyna wiążąca mannan - MBL, fikoliny L, H, M i współdziałających z nimi

proteaz serynowych MASP-2 i MASP-1) oraz receptorów TLR4 i TLR2. W przypadku czynników dopełniacza, monitorowana będzie dynamika zmian stężenia i/lub aktywności, w trakcie pobytu pacjenta na oddziale co pozwoli wnioskować o ich udziale i znaczeniu w rozwoju i przebiegu chorób takich jak: zespół uogólnionej reakcji zapalnej, sepsa, ciężka sepsa, wstrząs septyczny. W roku 2010 zgromadzono próby krwi i 204 próby surowicy od 30 chorych oraz materiał od dobranych pod względem wieku osób zdrowych (w przypadku grupy kontrolnej surowica pobierana jest jednokrotnie). Prowadzone są oznaczenia stężeń lektyny wiążącej mannan, aktywności kompleksów MBL-MASP-2 oraz genotypów *MBL2*. Zakupiono także niezbędną do realizacji projektu aparaturę.

Projekt badawczy nr N N 301 507638

pt.: **Poszukiwanie ligandów dla receptora jądrowego RORgamma jako potencjalnych czynników terapeutycznych w chorobach autoimmunologicznych.**

Kierownik projektu: dr Marcin Ratajewski

Okres realizacji: 16.03.2010 – 15.03.2013

Przeprowadzono wstępną analizę ekspresji receptora jądrowego RORgamma w modelowych liniach komórkowych hodowanych in vitro. Skonstruowano pierwsze narzędzia molekularne do badania mechanizmów molekularnych aktywacji receptora RORgamma, w tym konstrukty plazmidowe.

Projekt badawczy nr N N302 113138

pt.: Biotechnologia rekombinantowej tymozyny β4 – standaryzacja produkcji i aktywność biologiczna.

Kierownik projektu: dr Radosław Bednarek

Okres realizacji: 17.03.2010 – 16.03.2013

Fragment DNA kodujący sekwencję aminokwasową tymozyny β4 (Tβ4) zsyntetyzowano w firmie Bionovo (Ulm, Niemcy), zamplifikowano poprzez reakcję PCR, a następnie wklonowano pomiędzy miejsca restrykcyjne *Bam*HI i *Hind*III wektora plazmidowego pRSETA, *Nde*I i *Bam*HI wektora pET-15b oraz *Hind*III i *Not*I wektora pEcoli-Cterm6xHN. Plazmidy namnożono w komórkach bakteryjnych *Escherichia coli* (szczep TOP10), oczyszczono za pomocą zestawu Wizard Miniprep (Promega), po czym poprawność otrzymanych konstruktów zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie. Następnie plazmidy wprowadzono do komórek szczepu BL21(DE3) bakterii *Escherichia coli*. Bakterie inkubowano przez noc w 37°C na płytkach agarowych z ampicyliną. Następnie pojedynczymi koloniami bakteryjnymi zainokulowano 50 ml pożywki TB (12 g/L trypton, 24 g/L ekstraktu drożdżowego, 4 ml/L gliceryny, 0,17M KH_2PO_4 oraz 0,72 M K_2HPO_4) z dodatkiem 100 mg/L ampicyliny. Po nocnej inkubacji w 37°C z wytrząsaniem 250 rpm kultury bakteryjne przeniesiono do 0,5 litra TB z dodatkiem ampicyliny. Początkowa gęstość optyczna hodowli OD_{600} wynosiła 0,1, następnie kultury bakteryjne inkubowano do osiągnięcia OD_{600}=0,4-0,6. W tym momencie indukowano nadekspresję białka poprzez dodanie 1 mM

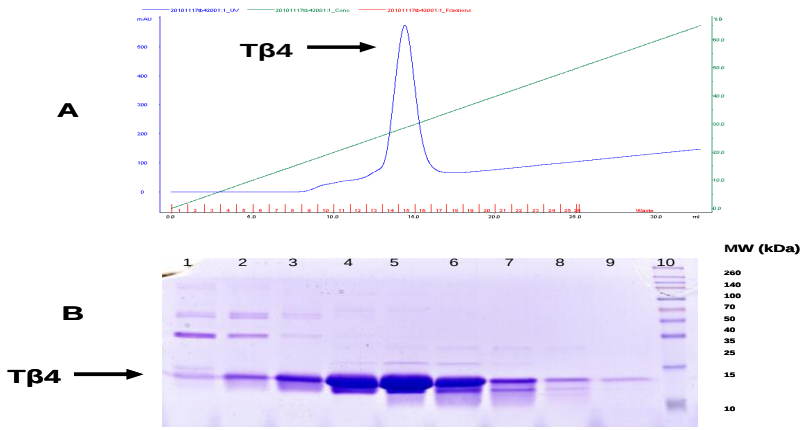
izopropylo-β-D-tiogalaktozydu i prowadzono dalszą inkubację przez 3-4 godziny. Zebrane komórki zwirwano, rozpuszczono w buforze „binding" (10 mM imidazol, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH=7,9) i poddano lizie pod wysokim ciśnieniem na prasie FRENCH (Termo). Lizaty bakteryjne zostały następnie poddane ultrawirowaniu (100.000 x g, 1 godz., 4°), filtracji przez filtr strzykawkowy o porach 0,45 μm oraz analizie poprzez elektroforezę SDS-PAGE, na podstawie której potwierdzono obecność białka rekombinantowego w lizatach bakteryjnych.

Rekombinantową tymozynę β4 zawierającą metkę polihistydynową oczyszczono na zasadzie dwustopniowej chromatografii powinowactwa histydyny do jonów niklu: po wstępnym oczyszczeniu preparat poddano chromatografii na kolumnie HisTrapHP (5 ml, Amersham) podłączonej do systemu FPLC (Amersham). Białka poddano elucji liniowym gradientem stężeniowym imidazolu (10-500 mM). Frakcje wybrane na podstawie chromatogramu (ryc. 1A.) poddano rozdziałowi elektroforetycznemu w 17% żelu SDS-PAGE (ryc. 1B.).

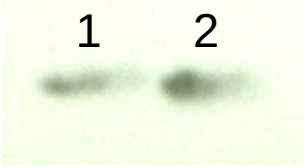
Wybrane frakcje poddano dializie wobec PBS i zagęszczono poprzez ultrafiltrację z użyciem membran celulozowych Ultracell YM-3 (Millipore). Oczyszczone białko poddano analizie Western blot z użyciem przeciwciał poliklonalnych specyficznych dla tymozyny β4 (ryc. 2.).

Przeprowadzono ponadto analizę ilościową uzyskanego białka Tβ4, porównując ilości białka rekombinantowego wyizolowane z bakterii transformowanych wektorem pRSETA oraz pET-15b. W przypadku wektora pEcoli-Cterm6xHN uzyskano zdecydowanie niższe ilości Tβ4 (stwierdzone poprzez analizę SDS-PAGE), zatem wektor ten nie był brany pod uwagę zarówno przy analizie ilościowej, jak i w trakcie późniejszych eksperymentów. Stężenie białka oznaczano za pomocą zestawu BCA Protein Assay Kit (Thermo). Ponadto przeliczono stosunek masy (mg) otrzymanej Tβ4 na 1 gram suchej masy komórek bakteryjnych, a także procentową zawartość Tβ4 w stosunku do wszystkich białek bakteryjnych w badanych lizatach (na podstawie analizy densytometrycznej żeli SDS-PAGE). Wyniki zestawiono w tabel 1.

Podsumowując, w trakcie dotychczasowych badań udało się uzyskać plazmidy z cDNA kodującym tymozynę β4. Rekombinantowa tymozyna β4 ulega ekspresji w komórkach bakteryjnych transformowanych otrzymanymi plazmidami. Poprzez metodę dwustopniowej chromatografii powinowactwa otrzymuje się czysty preparat rekombinantowej Tβ4. Najwyższy poziom ekspresji udało się uzyskać w przypadku konstruktu pRSETA-Tβ4, zatem będzie on wykorzystywany w trakcie kolejnych prac prowadzonych w ramach niniejszego projektu.



Ryc. 1. Oczyszczanie Tβ4 za pomocą systemu FPLC. A: Chromatogram otrzymany podczas oczyszczania Tβ4 na kolumnie HisTrapHP. B: Analiza SDS–PAGE (żel 17%) zebranych frakcji (ścieżki 2-9). Ścieżka 10 – białkowe markery mas cząsteczkowych.



Ryc. 2. Analiza Western blot rekombinantowej Tβ4 uzyskanej z bakterii transformowanych plazmidem pRSETA (ścieżka 1) lub pET-15b (ścieżka 2).

Plazmid	Lizat komórkowy [nr]	Tβ4 [mg/L]	Tβ4 [mg/g suchej masy komórek bakteryjnych]	Tβ4 [% wszystkich białek]
pRSETA	1	1.25	0.28	0.48
	2	3.12	1.53	5.05
	3	1.18	0.57	2.31
pET-15b	4	1.56	0.36	1.05
	5	0.68	0.15	0.45
	6	0.57	0.13	0.48

Tabela 1. Porównawcza analiza ilościowa otrzymanego białka rekombinantowego Tβ4 z lizatów bakterii transformowanych plazmidem pRSETA oraz pET-15b.

<u>Projekt badawczy nr</u> N N204 531739
pt.: Klastery boru jako znaczniki elektrochemiczne do konstrukcji bioczujnika DNA do detekcji zakażeń wirusowych.

Kierownik projektu: dr Agnieszka Olejniczak
Okres realizacji: 17.09.2010 – 16.09.2013

Realizację projektu rozpoczęto pod koniec 2010 roku. Klastery karboranylowe są związkami chemicznymi składającymi się z atomów węgla, boru oraz wodoru. Związki te są aktywne elektrochemicznie, a na wartość potencjału redoks ma wpływ m.in. struktura karboranu, jego izomeria a także charakter podstawników przyłączonych do atomu węgla lub boru.

Bioczujniki elektrochemiczne są szybkimi, prostymi, uniwersalnymi, łatwymi w obsłudze, niedrogimi systemami wykorzystywanymi np. do diagnozowania chorób genetycznych, infekcyjnych, do wykrywania uszkodzeń DNA, skażenia środowiska i żywności. Oferują one znakomitą czułość, kompatybilność z dostępnymi technologiami produkcji, podatność na miniaturyzację, uniwersalność.

Celem projektu jest zastosowanie klastera karboranylowego jako aktywnego elektrochemicznie znacznika do konstrukcji bioczujnika DNA. Zsyntezowane, modyfikowane klastrem karboranylowym DNA-oligonukleotydy wykorzystane zostaną do detekcji elektrochemicznej DNA ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV), w oparciu o zjawisko hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Analizy elektrochemiczne przeprowadzone zostaną z wykorzystaniem nowoczesnego systemu PalmSens (Palm Instrument BV), mającego zastosowanie w projektowaniu różnego rodzaju czujników elektrochemicznych. Otrzymane wyniki stanowić będą podstawę konstrukcji prototypu nowego rodzaju bioczujnika HCMV.

Projekt realizowany jest w Laboratorium Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej od końca września 2010. Pierwsze miesiące jego wykonywania związane były z syntezą odpowiednich nukleozydów jako substratów w reakcji z pochodnymi karboranylowymi. W tym celu zsyntezowano pochodne nukleozydów zawierające grupy blokujące funkcje hydroksylowe reszty cukrowej. Otrzymano w ilościach około 1g pochodne wszystkich deoksynukleozydów (dA, dG, dC, T) posiadające resztę tertbutylodimetylosililową w pozycji 3' i 5' reszty cukrowej. Związki oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej i liofilizowano z benzenu. Poza tym otrzymano pochodną tymidyny z grupą monometoksytrytylową i acetylową odpowiednio w pozycji 5' i 3' reszty cukrowej nukleozydu. Zsyntezowano również 8-bromo-2'-deoksyadenozynę. Otrzymane blokowane nukleozydy jak i 8-bromo-2'-deoksyadenozyna będą substratami w reakcjach z odpowiednimi pochodnymi klasterów boru (głównie izomerami *orto*- i *meta*-). W tym celu zgromadzono odpowiednie odczynniki i wykonano reakcje pilotowe do otrzymania m.in. 2-etynylo-*orto*-karboranu, który w następnym etapie realizacji projektu służyć będzie jako substrat w reakcji cross-coupling z 8-bromo-2'-deoksyadenozyną.

PROJEKTY BADAWCZE ZAMAWIANE:

Projekty badawcze zamawiane realizowane w 2010 – ogółem 2

	Tytuł projektu	Kierownik projektu	Okres realizacji	Koszt projektu[1]
1.	**Fosforany nukleozydów i ich oligomery modyfikowane lipofilowym farmakoforem karboranylowym – projekt cząstkowy.** Umowa nr K152/H03/2007/09 zawarta na podstawie decyzji K152/H03/2007 z dnia 25.10.2007 MNiSW o przekazywanie dotacji przyznanej w ramach projektu badawczego zamawianego Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt: „Biofosforany oraz oligonukleotydy i ich kontenery jako diagnostyki oraz leki nowych generacji"	prof. dr hab. Zbigniew J. **Leśnikowski**	02.01.2008 18 12.2010	**432.000**
2.	**Laboratorium skryningowe – Wirusologia i bakteriologia** Umowa nr K152/H03/2007/10 zawarta na podstawie decyzji K152/H03/2007 z dnia 25.10.2007 MNiSW o przekazywanie dotacji przyznanej w ramach projektu badawczego zamawianego Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt: „Biofosforany oraz oligonukleotydy i ich kontenery jako diagnostyki oraz leki nowych generacji"	prof. dr hab. Zbigniew J. **Leśnikowski**	02.01.2008 18 12.2010	**1.088.750**

1/ na okres realizacji przewidywany przez, MNiSW

Projekt badawczy zamawiany Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007

pt.: **„Fosforany nukleozydów i ich oligomery modyfikowane lipofilowym farmakoforem karboranylowym – projekt cząstkowy"**

Umowa nr K152/H03/2007/09 zawarta na podstawie decyzji K152/H03/2007 z dnia 25.10.2007 MNiSW o przekazywanie dotacji przyznanej w ramach projektu badawczego zamawianego Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt: „*Biofosforany oraz oligonukleotydy i ich kontenery jako diagnostyki oraz leki nowych generacji"*

Kierownik zadania: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Okres realizacji: 02.01.2008 – 18 12.2010

Fosforany nukleozydów (nukleotydy) i ich oligomery są jednymi z ważnych cząstek biologicznie, uczestniczących w wielu fundamentalnych procesach zachodzących we komórkach organizmów żywych. Z tego też powodu białka, z którymi oddziałują są często wykorzystywanym celem dla leków będących pochodnymi i analogami nukleozydów i nukleotydów, przykładem mogą być niektóre leki przeciwwirusowe. Wysoka lipofobowość fosforanów nukleozydów związana z polarnością reszty fosforanowej utrudnia przenikanie ich przez błony komórkowe. Z tego też powodu istnieje zapotrzebowanie na opracowanie pochodnych fosforanów nukleozydów o podwyższonej lipofilowości. Klastery boru stanowią nowy typ farmakoforów wykorzystywanych w projektowaniu leków różnego typu. Wiele pochodnych nukleozydów (w

tym nukleozydów purynowych) modyfikowanej klasterami boru nie było dotąd dostępnych ze względu na brak metod ich syntezy. W okresie sprawozdawczym podjęliśmy prace nad syntezą wybranych koniugatów nukleotydów i klasterów boru oraz przekształcania ich w odpowiednie fosforany.

W ramach realizacji grantu w roku 2010 prowadzono prace nad syntezą biologicznie ważnych fosforanów koniugatów adenozyny i klasterów boru, otrzymano: 2'-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-metylo)-5'-AMP, 2-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-yl)-5'-dAMP, 2'-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-propylo)-5'-AMP, 2-(2-para-karboranylo)-etynylo-5'-AMP, 2-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-yl)-5'-dATP, 2'-pentynylo-5'-ATP, 2'-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-metylo)-3',5'-cAMP, 2'-(1-para-karboranylopropylo-1,2,3-triazol-4-propylo)-3',5'-cAMP.

Ponadto, opracowano metodę syntezy tymidyny modyfikowanej w pozycji N-3 grupą *para*-karboranylową (N^3-[2-etylo-(1,12-dikarba-*closo*-dodekaboran-1-yl)]tymidyna) oraz jej blokowanego w pozycji 5' grupą dimetoksytrytylową amidofosforynu (amidofosforyn 5'-O-dimetoksytrytylo-3'-O-(N,N-diizopropylo-*beta*-cyjanoetylo)-N^3-[2-etylo-(1,12-dikarba-*closo*-dodekaboran-1-yl)]tymidyny). Modyfikowany amidofosforyn tymidyny został wykorzystany do syntezy szeregu RNA oligonukleotydów użytych następnie do konstrukcji siRNA przeciw białku BACE, odgrywającemu ważną rolę w patogenezie choroby Alzhaimera. Czystość otrzymanych oligomerów została zbadana za pomocą RP-HPLC oraz analizy PAGE a ich struktura potwierdzona za pomocą MALDI-TOF MS. Badania właściwości biologicznych modyfikowanych klasterem boru anty-BACE siRNA są w toku. Badania prowadzono we współpracy z prof. Barbarą Nawrot (Centrum Badań Molekularnych i makromolekularnych PAN).

<u>Projekt badawczy zamawiany Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007</u>

pt.: **„Laboratorium skryningowe – Wirusologia i bakteriologia"**

Umowa nr K152/H03/2007/10 zawarta na podstawie decyzji K152/H03/2007 z dnia 25.10.2007 MNiSW o przekazywanie dotacji przyznanej w ramach projektu badawczego zamawianego Nr PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt: „*Biofosforany oraz oligonukleotydy i ich kontenery jako diagnostyki oraz leki nowych generacji"*

Kierownik zadania: prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Okres realizacji 02.01.2008 – 18 12.2010

1. Cytotoksyczność związków chemicznych:
   a) zoptymalizowano warunki testu (zastosowanie 2-hydroksypropylo)-ß-cyklodekstryny, wydłużenie inkubacji komórek ze związkami badanymi, ustalenie gęstości komórek, dobór odpowiednich długości fali dla odczytu OD),
   b) badano cytotoksyczność pochodnych nukleozydów modyfikowanych klasterami boru oraz związków przekazanych w ramach współpracy między ośrodkami naukowymi. Badania prowadzono klasyczną metodą z wykorzystaniem żółtej soli tetrazolowej (MTT) wobec ludzkich komórek nowotworowych (A549, HeLa), jak i wobec normalnych

fibroblastów płuc płodu ludzkiego (MRC-5), a także na liniach komórkowych L-929, LLC-MK2 oraz Vero.

2. Aktywność przeciwwirusowa:
   a) oznaczano aktywność przeciwwirusową (anty-HCMV) związków chemicznych. Badania prowadzono metodą redukcji namnażania wirusa HCMV na monowarstwie komórek linii MRC-5,
   b) zoptymalizowano warunki testu oraz badano aktywność pochodnych nukleozydów wobec wirusa HSV-1, oznaczenia prowadzono wobec komórek linii Vero,
   c) zoptymalizowano warunki oraz oznaczano aktywność związków chemicznych wobec wirusa VZV na linii komórkowej MRC-5,
   d) badano aktywność pochodnych nukleozydów oraz ich trójfosforanów w stosunku do rekombinowanej odwrotnej transkryptazy wirusa HIV z wykorzystaniem:
      - *Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase Assay*, Roche,
      - test z zastosowaniem ^{3}[H]dTTP.
3. Zakupiono aparaturę badawczą przewidzianą w ramach projektu badawczego PBZ-MNiSW-07/I/2007.
4. Zakończono modernizację pomieszczenia Laboratorium Skriningowego przy Tylnej 3a.

Projekty badawcze- rozwojowe realizowane w 2010

Lp.	Tytuł projektu	Kierownik projektu	Okres realizacji	Koszt projektu[1]
1.	**Molekularna identyfikacja prątków gruźlicy występujących u chorych w Polsce. Utworzenie krajowego rejestru wzorów DNA"**Zadanie badawcze w ramach grantu rozwojowego przyznanego dla **Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie** na podstawie **decyzji nr 0617/R/PO1/2007/03.**	prof. dr hab. **Jarosław Dziadek**	27.11.2007 30 06.2010	290.000

1) na okres realizacji przewidywany przez MNiSW

Tytuł projektu:

„Molekularna identyfikacja prątków gruźlicy występujących u chorych w Polsce. Utworzenie krajowego rejestru wzorów DNA"

Zadanie badawcze w ramach grantu rozwojowego przyznanego dla **Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie** na podstawie **decyzji nr 0617/R/PO1/2007/03.**

Kierownik zadania badawczego**: prof. dr hab. Jarosław Dziadek**
Okres realizacji: 27.11.2007r. do 30 06.2010 r.

W ramach realizacji zadania badawczego opracowano metodę MIRU-VNTR opartą o badanie liczby kopii sekwencji rozproszonych identyfikowanych w 15 niezależnych loci genomu szczepów *M. tuberculosis*. Przy wykorzystaniu chromosomalnego DNA szczepu wzorcowego *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ przeprowadzono badania pozwalające na identyfikację optymalnych warunków reakcji amplifikacji oraz rozdziału produktów PCR w żelach agarozowych. Następnie opracowane warunki reakcji zastosowano do badań dla 234 szczepów *M. tuberculosis* izolowanych na terenie Łodzi w latach 2006-2007 oraz 328 szczepów zgromadzonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Na podstawie uzyskanych rozdziałów produktów amplifikacji obliczono dla 15 oddzielnych loci liczbę powtarzających się elementów MIRU-VNTR dla każdego szczepu i przyporządkowano badanym szczepom wzór numeryczny. Szczepowo-specyficzne wzory numeryczne MIRU-VNTR były następnie analizowane w programie Bionumerics 5.0 (Applied Maths) w celu określenia podobieństwa filogenetycznego wśród analizowanych szczepów oraz identyfikacji potencjalnych grup epidemiologicznych. Przy wykorzystaniu tego samego oprogramowania utworzono otwartą bazę wzorów MIRU-VNTR z możliwością wprowadzania do niej wzorów dla kolejnych analizowanych szczepów. Uzyskane wyniki zostały przekazane do Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w celu ich wprowadzenia do bazy zawierającej inne dane epidemiologiczne.
W ramach realizacji projektu przeprowadzono również badania identyfikujące zależności pomiędzy obecnością określonych mutacji w genie *rpoB* a opornością *M. tuberculosis* na ryfampicynę. Przeprowadzone badania pozwoliły na obronę jednej pracy doktorskiej oraz na

uzyskanie publikacji w międzynarodowym czasopiśmie mikrobiologicznym (BMC Microbiology o IF=2,98).

W kolejnym roku kolekcję 234 szczepów izolowanych na terenie Łodzi poddano szczegółowym badaniom w celu określenia ich przynależności do grup epidemiologicznych. W tym celu dla wszystkich szczepów kolekcji wykonano analizę „spoligotyping" przyporządkowując określony wzór hybrydyzacyjny do każdego ze szczepów. Uzyskane wzory pozwoliły na wyodrębnienie pośród 234 izolatow *M. tuberculosis* 84 spoligotypów należących do 21 rodzin. Następnie na podstawie uzyskanych wzorów zaklasyfikowano badane szczepy do grup filogenetycznych i porównano je z międzynarodową bazą danych określając dominujące spoligotypy w analizowanej kolekcji. Wśród dominujących rodzin dla badanej kolekcji były odpowiednio rodziny: T1 (27%), H1 (16%), H4 (11%), H3 (7%) i T4 (5%). Porównanie spoligotypów wykazało obecność w badanej kolekcji szczepów spoligotypów dominujących w populacji światowej, takich jak SIT 53 i SIT 47. Ponadto zaobserwowano wśród 234 izolatów 30 spoligotypów dotąd nie opisanych w międzynarodowej bazie danych, natomiast 196 szczepów zostało zgrupowanych w 54 spoligotyty. Podczas gdy MIRU-VNTR 19 loci pozwoliło na zgrupowanie 108 szczepów i ujawnienie 126 unikalnych wzorów. Uzyskane MIRU-VNTR oraz wzory „spoligotyping" zostały zebrane w bazie danych w programie Bionumerics 5.0 (Applied Maths). Ponadto z wykorzystaniem zaprojektowanej ankiety zebrano dane o pacjentach, które zabezpieczono w postaci oddzielnego pliku. Program Bionumerics 5.0 wykorzystano także do przygotowania dendrogramu pozwalającego na identyfikację szczepów o identycznych wzorach uzyskanych obiema zastosowanymi metodami. Szczepy tworzące grupy epidemiologiczne (86 szczepów zebranych w 29 grup epidemiologicznych) przy zastosowaniu obu metod zostały poddane weryfikacji zależności epidemiologicznych z wykorzystaniem" złotego standardu" badań epidemiologicznych prątków metody IS6110-RFLP. Badanie to pozwoliło na głębsze zróżnicowanie 36 szczepów oraz potwierdzenie zidentyfikowanych zależności epidemiologicznych pomiędzy 39 szczepów. Dane uzyskane w badaniach molekularnych zostały następnie porównane z danymi o pacjentach, co pozwoliło na uprawdopodobnienie transmisji odpowiednio dla: 25 szczepów (takie samo miejsce zamieszkania), kontaminacje laboratoryjną dla 4 izolatów oraz 10 izolatów zostało uzyskanych od 5 pacjentów w krótkich odstępach czasu. Uzyskane wyniki dotyczące kolekcji szczepów izolowanych na terenie Łodzi zostały wykorzystane dla przygotowania publikacji naukowej, która została przesłana do czasopisma naukowego z listy filadelfijskiej.

Równolegle prowadzono badania zmierzające do gromadzenia molekularnych danych o szczepach *M. tuberculosis* izolowanych na terenie Polski. W analizach epidemiologicznych uwzględniono szczepy kliniczne izolowane w IGChP w Warszawie w latach 2006-2008 poddane wcześniejszej analizie metodą „spoligotyping" w IGChP. Analizom „MIRU-VNTR 15 loci" poddano ponad 400 szczepów, dla których zebrano dane na temat liczby kopii powtarzających się sekwencji w 15 loci w obrębie genomowego DNA. Uzyskane dane pozwoliły na przyporządkowanie unikalnego wzoru numerycznego dla każdego z analizowanych izolatów klinicznych. Wzory MIRU-VNTR zostały wprowadzone do bazy danych w programie Bionumerics 5.0 (Applied Maths). Dane te pozwoliły następnie na przeprowadzenie analizy porównawczej i identyfikację potencjalnych grup epidemiologicznych. W obrębie analizowanej kolekcji wydzielono także szczepy szczególnie istotne ze względu na zagrożenie epidemiologiczne. Do badań przy wykorzystaniu metody IS6110-RFLP wybrano szczepy z rodziny Beijing oraz szczepy XDR.

Zgromadzona podczas realizacji projektu baza danych epidemiologicznych pozwala na wyszukiwanie zależności epidemiologicznych dla wszystkich nowoizolowanych prątków gruźlicy na terenie Polski. Baza ta wymaga jednak ciągłego uzupełniania o nowoizolowane szczepy w celu identyfikacji w populacji szczepów o zwiększonej wirulencji oraz śledzenia rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych.

Inne projekty badawcze

Projekt MNiSW nr 1944/P01/2007/32
Projekt afiliowany przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (2007-2010); kierownik projektu: Dr Jolanta Łukasiewicz

Wykonawcy z IBM PAN: Dr hab. Anna Świerzko, prof. IBM PAN, Dr hab. Maciej Cedzyński, prof. IBM PAN.

Badanie swoistości oddziaływań ludzkiej lektyny wiążącej mannozę (MBL) z endotoksynami bakteryjnymi

Celem projektu jest szczegółowa charakterystyka fragmentów endotoksyn (LPS) rozpoznawanych przez MBL, z wykorzystaniem nowoczesnych technik analizy instrumentalnej. Przedmiotem badań są lipopolisacharydy *Hafnia alvei* (warunkowy patogen, izolowany z ran, ropni, plwociny, moczu, krwi). W IBM PAN otrzymano oczyszczony preparat lektyny wiążącej mannan oraz przeprowadzono identyfikację lipopolisacharydów *Hafnia alvei* reagujących swoiście z MBL. Analiza Western blot wykazała, że MBL najsilniej wiąże niskocząsteczkowe frakcje LPS, odpowiadające lipidowi A podstawionemu oligosacharydem rdzeniowym, otrzymanych ze szczepów *H. alvei* 1190, 1200, 1209 i 1213. Lipopolisacharydy te charakteryzują się typem oligosacharydu rdzeniowego OS1 oraz obecnością dodatkowego dwucukru: L-α-D-Hep-(1→4)-α-Kdo. W przypadku innych LPS zawierających rdzeń OS1 lecz pozbawionych wspomnianego dwucukru zaobserwowano słabszą reaktywność z MBL. Uzyskane wyniki potwierdzono w ELISA. Wykazano ponadto, że interakcja MBL z w/w lipopolisacharydami prowadzi do aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej oraz indukuje wstrząs anafilaktoidalny u myszy uwrażliwionych muramylodipeptydem. Lektyna wiążąca mannan rozpoznaje też całe, inaktywowane formaldehydem komórki bakteryjne, co wykazano za pomocą cytometrii przepływowej. Wykazano, że niektóre lipopolisacharydy *H. alvei* wiążą inną surowiczą lektynę – fikolinę H, co stało się podstawą opracowania nowego projektu badawczego, zakwalifikowanego do finansowania.

Projekt MNiSW nr N N401 267339
Projekt afiliowany przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (2010-2013); kierownik projektu: Dr Jolanta Łukasiewicz

Wykonawcy z IBM PAN: Dr hab. Anna Świerzko, prof. IBM PAN., Dr hab. Maciej Cedzyński, IBM PAN, Mgr Agnieszka Szala

Badania molekularnych mechanizmów rozpoznawania bakteryjnych endotoksyn przez fikolinę H i analiza efektów biologicznych tego procesu

Zidentyfikowano nowy, naturalny ligand dla ludzkiej fikoliny H – wielocukier O-swoisty lipopolisacharydu jednego ze szczepów *Hafnia alvei.* Przeprowadzono analizę jego struktury (IIiTD PAN) Wykorzystując koniugat frakcji polisacharydowej z albuminą surowicy wołowej otrzymany w IIiTD PAN opracowano nową metodę oznaczania stężenia i aktywności fikoliny H.

Informacja o umowach zawartych z innymi podmiotami o stałe lub wieloletnie świadczenie na ich rzecz badań naukowych i prac rozwojowych lub usług.

W dniu 14 grudnia 2009 roku została zawarta umowa o wykonanie badań naukowych pomiędzy firmą **Proteon Pharmaceuticals** z siedzibą w Łodzi a Instytutem Biologii Medycznej PAN na wykonanie badań pt.: „***Wykonanie prac badawczo-naukowych z dziedziny mikrobiologii i biologii molekularnej na potrzeby projektu: Innowacyjny dodatek paszowy zapobiegający salmonellozie u zwierząt hodowlanych***”o łącznej wartości netto 190.000,00 złotych.
Badania będące przedmiotem umowy zostaną wykonane do 15 października 2011 roku.
Koordynatorem ze strony Instytutu jest prof. dr hab. Jarosław Dziadek – Kierownik Pracowni Fizjologii i Genetyki Mykobakterium.

Badania są wykonywane w pięciu etapach.

Etap I
- Izolacja z oczyszczalni ścieków oraz ferm drobiu bakteriofagów wykazujących aktywność lityczną względem wzorcowych szczepów *Salmonella* spp.
- Przeprowadzenie wstępnej charakterystyki genetycznej uzyskanych bakteriofagów za pomocą analizy restrykcyjnej DNA i reakcji PCR.

Etap II
- Optymalizacja hodowli wzorcowych szczepów *Salmonella* spp w skali 5 litrów.
- Optymalizacja metody oczyszczania bakteriofagów z hodowli Salmonella spp w skali 5 litrów z wykorzystaniem techniki ultrawirowania.
- Opracowanie i optymalizacja wysokowydajnej, zautomatyzowanej kolorymetrycznej metody pomiarowej siłt litycznej bakteriofagów.

Etap III
- Optymalizacja hodowli wzorcowych szczepów *Salmonella* spp w skali 20 litrów.
- Optymalizacja metody oczyszczania bakteriofagów z hodowli Salmonella spp w skali 20 litrów z wykorzystaniem techniki ultrawirowania.
- Opracowanie i optymalizacja metody otrzymywania czystej zawiesiny bakteriofagów z hodowli salmonella spp prowadzonej w skali 20 litrów z wykorzystaniem technologii mechanicznego rozbicia komórek z wykorzystaniem urządzenia „Mini Bead Beater”.

Etap IV
- Opracowanie i optymalizacja metody zamykania oczyszczonych bakteriofagów w mikrokapsułkach.

EtapV
- Pomiary siły litycznej względem wybranych serowarów *Salmonella* spp przygotowanych przez zleceniobiorcę kompozycji bakteriofagów za pomocą wysokowydajnej, kolorymetrycznej metody pomiarowej.

Współpraca naukowa

Instytutu Biologii Medycznej PAN

z zagranicą

Współpracę naukową w 2010 roku Instytut Biologii Medycznej PAN z placówkami zagranicznymi realizowano zarówno w ramach bezpośrednich umów o współpracy jak i we współpracy nieformalnej. Współpraca ta w istotnym stopniu przyśpieszyła realizację prac badawczych oraz wzbogaciła je o wyniki uzyskane z zastosowaniem technik i aparatury dostępnej w placówkach zagranicznych.

Zagraniczne instytucje naukowe, z którymi Instytut współpracował w ramach porozumienia o współpracy naukowej

1. Norwegia, The Department of Cancer Research and Molecular Medicine, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Umowa partnerska na realizację projektu Nr PL0270 od 1.01.2009 do 30.04.2011 (koordynator: dr Edyta Paradowska).

2. **Polsko - czeski** wspólny projekt badawczy na lata 2009-2013 z Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic; Rez k. Pragi w ramach porozumienia o współpracy naukowej między Polską Akademia Nauk i Czeską Akademią Nauk, pt. ***„Synteza i zastosowania biologiczne metalokarboranów i ich pochodnych. III – Synthesis and Biological Applicationa of Metallacarboranes and their Derivatives,III***" (kordynator: prof.dr hab. ZJ. Leśnikowski).

3. **Polsko - węgierski** wspólny projekt badawczy na lata 2008-2010 z Instytutem Enzymologii Węgierskiej Akademii Nauk, Protokół o współpracy naukowej między PAN i MTA pt**.** ***"Tkankowo specyficzne mechanizmy regulacji ekspreski transporterów opornoęci wielolekowej – Tissue-specific mechanisms regulating the expression of multidrug transports"*** (koordynator dr Ł. Pułaski).

4. **Polsko – rosyjski** wspólny projekt badawczy na lata 2008-2010 z Instytutem Chemii Bioorganicznej Rosyjskiej Akademii Nauk w Moskwie (Dr K. Łukianow) ***"Novel fluorescent proteins in cellular biosensors"*** w ramachPorozumienia o współpracy naukowej między PAN i Rosyjską Akademią Nauk (koordynator dr hab. Ł. Pułaski).

Zagraniczne instytucje naukowe, z którymi Instytutu współpracuje w sposób ciągły bez zawartego porozumienia.

1. **A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Laboratory of Organoaluminium and Organoboron Compounds, Russian Academy of Sciences,** temat: Biologicznie ważne koniugaty nukleozydów i klasterów boru.

2. **Children's Hospital, Philadelphia, Pennsylvania, USA,** temat: Charakterystyka fenotypu myszy z nadekspresją ludzkiego genu kodujacego alfa1 kwasna glikoproteinę.

3. **Department of Pharmacology, University of Cambridge, Wielka Brytania,** temat: Biogeneza bariery krew-mózg i udział szlaków przekaźnictwa sygnałów w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za fenotyp barierowy.

4. **Institute of Biphysics, Academy of Sciences of the Czech Republic; Brno, Republika Czeska**.temat: Elektrochemiczna detekcja DNA.

5. **Royal Free and University College Medical School, Royal Free Campus, Virology Department, Londyn, Wielka Brytania**, temat: Zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania zakażeń HCMV. Zakażenia wirusem cytomegalli

6. **Sussex University, Falmer, Brighton, Wielka Brytania**; temat: DNA repair

7. **Scottish National Blond Transfusion Service, National Science Laboratory, Edinburgh, Wielka Brytania,** temat: Lektyny wiążące mannan, fikoliny L.

8. **Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Szwecja.** Temat: Fosforylacja enzymatyczna koniugatów nukleozydów i klasterów boru.

9. **Tokai University, Japonia** – badania dotyczące fikoliny.

10. **University of East Anglia, Norwich Wielka Brytania**, temat: Ligazy bakteryjne DNA repair.

11. **University of Texas, Health Center at Tyler, USA**, Temat: Badanie procesu podzialu komorki.

12. **University of Copenhagen, Dania,** badania dotyczące fikoliny.

13. **University of Aarhus, Dania,** prof. Jens C. Jensenius – badania dotyczące proteaz serynowych MASP, uczestniczących w aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej.

14. **VSCHT, Department of Analytical chemistry, Prague, Czech Republic**;
    Realizacja projektu pt. "Agregacja konjugatów związków aktywnych biologicznie i klasterów boru".

Wyjazdy pracowników naukowych Instytutu Biologii Medycznej PAN

Sprawozdanie pobytu za granicą w 2010r.

a. Wyjazdy krótkoterminowe:

Prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski przebywał w dniach 31 stycznia 2010 - 5 lutego 2010 w ramach współpracy naukowej w Institut de Ciència de Materials de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona. Podczas pobytu wygłosił wykład pt.: „On the Verge of Bioorganic and Inorganic Chemistry – New Materials for Molecular Medical Diagnostic and Chemotherapy".

Uczestniczył w konsultacjach, dyskusjach. Podczas pobytu uzgadniono tematy dalszej współpracy.

dr Łukasz Pułaski, dr Marcin Ratajewski w dniach 27 lutego – 5 marca 2010 przebywali w Innsbruck, Austria. Brali udział w konferencji naukowej „3rd FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2010", na której zaprezentowano doniesienie „Liver specific site in the proximal promoter of ABCC6 gene – involvement of PLAG and HNF4 transcription factors".

Dr hab. Łukasz Pułaski w dniach 7 – 9 kwietnia 2010 roku uczestniczył w konferencji naukowej „qPCR Symposium 2010" (Wiedeń, Austria) - wymiana informacji i nawiązanie nowych kontaktów i współprac naukowych.

Dr hab. Łukasz Pułaski w dniach 12 – 16 kwietnia 2010 uczestniczył w konferencji naukowej „International Congress of Young Scientists" – Erywań, Armenia, wymiana informacji i nawiązanie nowych kontaktów i współprac naukowych.

W dniach 16 – 19 maja 2010 prof. **dr hab. Jarosław Dziadek** przebywał na konsultacjach naukowych w University of East Anglia, Norwich, Wielka Brytania.

Dr hab. Łukasz Pułaski w dniach 17 – 21 maja 2010 przebywał w Sewillii, Hiszpania, gdzie brał udział w konferencji naukowej „FEBS Workshop on Understanding Transient Molecular Interactions in Biology", wymiana informacji i nawiązanie nowych kontaktów i współprac naukowych.

W dniach 19 - 21 maja 2010 **prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski** przebywał w Pradze, Czechy w związku z uczestnictwem w konferencji naukowej „2nd European Chemical Biology Symposium" oraz udziałem w spotkaniu organizacyjnym konsorcjum EU-OPENSCREEN, gdzie wygłosił prezentacje zat. „Consortium "Polish Infrastructure of OpenScreening Platforms for Chemical Biology".

W dniach 26-28 maja 2010 **dr Agnieszka Olejniczak** brała udział w konferencji Anniversary World Congress on Biosensors, Glasgow, Wielka Brytania. Zaprezentowano plakat pt. „Carborane and metallacarborane clusters as prospective redox labels for DNA", którego autorami są: Agnieszka B. Olejniczak, Zbigniew J. Leśnikowski.

Prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski brał udział konferencji Purines 2010, Adenine Nucleoside and Nucleotides in Biomedicine, w Tarraco, Hiszpania w dniach od 30 maja do 2 czerwca 2010 roku, prezentacja komunikatu: Adenosine and 2'-deoxyadenosine modified with boron clusters ($C_2B_{10}H_{12}$) as new classes of human blood platelet and neutrophil function modulators, autorzy: Katarzyna Bednarska Agnieszka B. Olejniczak, Błażej A. Wojtczak, Agnieszka Piskała, Zofia Sułowska and Zbigniew J. Leśnikowski.

W dniach 2 – 8 lipca 2010 **prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska** uczestniczyła w 7th Forum European Neuroscience Societies (FENS) w Amsterdamie (Holandia)., gdzie przedstawiła

doniesienie „Type 1 orexin receptor (OX_1R) stimulate cyclic AMP synthesis in primary glial cell cultures from rat cerebral cortex" .W trakcie Forum prof. Zawilska brała udział w posiedzeniu Komitetu Network of the European Neuroscience Schools (NENS), którego jest członkiem.

W dniach 04-09 lipca 2010 **mgr Agnieszka Szala i dr hab. Maciej Cedzyński, prof. IBM PAN** wzięli udział w międzynarodowej konferencji „7th International Conference on Innate Immunity" (Ixia, Rodos, Grecja,), na której zaprezentowali poster "MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) expression in healthy and malignant ovary"; uczestnictwo w dyskusjach naukowych.

W dniach 22-27 sierpnia 2010 r. **dr Aurelia Walczak-Drzewiecka** brała udział w Międzynarodowym Kongresie Immunologicznym (ICI 2010) w Kobe, Japonia, gdzie przedstawiła doniesienie „Lineage specific regulation of HIF1A expression in hematopoietic cells".

W dniach od 24 sierpnia 2010 do 28 sierpnia 2010 r. **dr Joanna Boncela** brała udział w XIX Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Fibrynolizy i Proteolizy w Amsterdamie, gdzie przedstawiła doniesienie „PAI-1 and PAI-2 interact with differenr subunits of proteasome in endthelial cells".

W dniach od 31 sierpnia do 3 września 2010 **dr Agnieszka Olejniczak**, wyjazd do Universita degli Studi di Firenze, Florencja, Włochy, , w ramach wymiany osobowej między Polską Akademią Nauk a Consiglio Nazionale delle Ricerche. Podczas pobytu wygłosiła komunikat „Boron clusters as electrochemical labels for DNA". Nawiązanie współpracy, konsultacje.

Dr hab. Łukasz Pułaski w dniach 6 - 14 września 2010 przebywał w Kapsztadzie, RPA, gdzie brał udział w konferencji naukowej „Genomics and Proteomics Approaches in Cancer Research", wymiana informacji i nawiązanie nowych kontaktów i współprac naukowych.

Podczas pobytu w National Research Centre, El-Behoos st. Dokki, Giza, Egipt w dniach 25 września – 6 października 2010 r. **dr hab. Paweł Parniewski prof**. IBM PAN przedstawił zakres badań prowadzonych w Instytucie Biologii medycznej PAN w Łodzi, ze szczególnym uwzględnieniem prac prowadzonych w Pracowni Genetyki Molekularnej. Szczegółowe wyniki prac eksperymentalnych zostały zaprezentowane na seminarium w National Research Centre 3 października 2010 r. Wizytę odbyto w ramach wymiany bezdewizowej pomiędzy ASRiT i PAN.

Dr inż. Marta Majchrzak uczestniczyła w dniach 27-29 września 2010 w konferecji The First International Conference of Biological Sciences (Future Trends for Biological Sciences and Their Application), Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, Cairo, Egypt, 27 – 29 September 2010. – na której zaprezentowala wyniki prowadzonych badań w ramach POIG InterMolMed – prezentacja posteru: M. Majchrzak, A. Wojtasik, W. Adamus-Bialek and P. Parniewski: „Trinucleotide Repeat Sequences in Epidemiological Investigations".

Dr Edyta Paradowska, **mgr Mirosława Studzińska**, uczestniczyły w konferencji „3rd Congenital Cytomegalovirus Conference", Paris Descartes University, odbywającej się w dniach 23-25 września 2010 r. w Paryżu, Francja. Zaprezentowano wyników badań projektu nr PL0270

MFEOG w postaci trzech plakatów pt.: 1) „Cytomegalovirus gB and gpUL144 genotypes distribution among congenitally infected infants in central Poland"; E. Paradowska, M. Studzinska, M. Wisniewska-Ligier, P. Suski, W. Wróblewska, T. Wozniakowska-Gesicka, Z.J. Lesnikowski , 2) „Sequence analysis of the polymorphic regions in the human cytomegalovirus genome detected in newborns with congeital infections"; E. Paradowska, M. Studzinska, P. Suski, K. Fangrat-Dzierżanowska, D. Dzierżanowska, D. Nowakowska, Z. Gaj, J. Wilczyński, Z. J. Leśnikowski; 3) „Clinical manifestation of congenital CMV infectiuons", M. Wiśniewska-Ligier, T. Woźniakowska-Gęsicka, W. Wróblewska, E. Paradowska.

W dniach 25 października 2010 –18 listopada 2010 **mgr inż. Aneta Kuroń** przebywała w East Anglia University at Norwich, Wielka Brytania na wyjeździe szkoleniowym w Wielkiej Brytani finansowanym z projektu ICGEB. W laboratorium dr. Richarda Bowatera ze School of Biological Sciences, University of East Anglia w Norwich realizowała krótki projekt badawczy dotyczący mykobakteryjnej primazy DnaG. Primaza DnaG odgrywa ważną rolę w procesie replikacji DNA u bakterii. Odpowiada za syntezę krótkich fragmentów RNA pełniących rolę praimerów, które następnie są wykorzystywane przez polimerazę DNA.
Założeniem projektu było oczyszczenie primazy DnaG z *Mycobacterium smegmatis* i *Mycobacterium tuberculosis* oraz zbadanie ich aktywności w warunkach *in vitro*.
Wektorem pHIS zawierającym gen primazy z *M. smegmatis* oraz wektorem pHIS zawierającym gen primazy z *M. tuberculosis* transformowano ekspresyjne komórki *Escherichia coli* (pLysS oraz Rosetta). W kolejnym etapie zanlizowano nadprodukcję badanych białek w tych szczepach. Techniką Western blot wykazano, że mykobakteryjna primaza DnaG występuje w formie rozpuszczalnej, ale w większej części w formie nierozpuszczalnej. Następnie oczyszczono białka primazy DnaG z *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* na kolumnach chromatograficznych..W ostatnim etapie podjęto próby zbadania aktywności oczyszczonych białek w warunkach *in vitro*. Aktywność primazy badano w różnych warunkach reakcji (różnym czasie i temperaturze reakcji oraz różnym składzie mieszaniny reakcyjnej).
Uzyskane podczas wyjazdu wyniki będą uwzględnione i wykorzystane podczas kontynuacji badań w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk.

W dniach 2 – 7 listopada 2010 **prof. dr hab. Jarosław Dziadek, dr Małgorzata Korycka-Machała, mgr Jakub Pawełczyk i mgr Alina Górna** uczestniczyli w konferencji pn.: I International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2010) w Valladolid (Hiszpania).
Uczestnictwo w I International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2010) pozwoliło na zaprezentowanie dwóch doniesień naukowych w postaci plakatów naukowych "Characterization of *Dna* G as a potential target for new drugs against tuberculosis", "RNase H- determination of its role in mycobacteria" oraz jednego w postaci wystąpienia ustnego "Evaluation of mycobacterial acetyl-CoA carboxyltransferase (ACCD6) as a potential target for new tuberculostatics".
Poszukiwanie nowych miejsc dla leków oraz nowych skutecznych leków przeciwko gruźlicy nadal jest istotnym celem w walce z tą chorobą. Primaza *Dna* G jest genem niezbędnym dla przeżycia prątków, dlatego wydaje się atrakcyjnym miejscem docelowym dla nowych leków przeciwprątkowych. RNaza H z kolei, jest jednym z białek występujących u prątków gruźlicy jak i u wirusa HIV, który często występuje jako ko- zakażenie podczas przebiegu gruźlicy u ludzi.

Ponieważ terapia przeciwko wirusowej RNazie H wirusa HIV jest jednym z głównych nurtów obecnych badań, istotnym jest określenie roli tego białka w komórkach mykobakteryjnych.
Przedstawione wyniki uzyskane w ramach realizacji zadania pierwszego projektu InterMolMed pozwoliły na podjęcie dyskusji naukowej ze specjalistami z wielu krajów uczestniczącymi w konferencji. Ponadto obecność specjalistów z zakresu czynników przeciwbakteryjnych pozwoliła również na nawiązanie kontaktów naukowych, które będą owocowały w dalszej realizacji zadań projektu.

Dr hab. Paweł Parniewski, dr inż. Marta Majchrzak i dr Arkadiusz Wojtasik uczestniczyli w konferencji pt. Nucleic Acids Conference 2010, w dniach 10 – 13 listopada 2010r., w Puerto Morelos, Mexico, na której zaprezentowano wyniki badań - prezentacja posteru autorstwa M. Majchrzak, A. Wojtasik, M. Mielczarek and P. Parniewski: „TRS-Based PCR as a Potential Tool for Discrimination of Intestinal Escherichia coli Strains" oraz plakat autorstwa A. Wojtasika, M. Majchrzak,W. Adamus-Bialek, E. Augustynowicz-Kopec, Z. Zwolska, J. Dziadka and P. Parniewskiego: „Trinucleotide Repeat Sequences-Based PCR as a Potential Approach for Genotyping Mycobacterium Gordonae Strains.

W dniach 17-20 listopada 2010 r **dr hab. Jarosław Dastych prof. IBM PAN** brał udział w Sympozjum Forum Noblowskiego zatytułowanym: Mast Cells in Health and Disease, które odbywało się w Sztokholmie, Szwecja.

W dniach 21-27 listopada 2010 **dr Anna Kozaczuk** uczestniczyła w konferencji pt.: "Microbes and Industrial Biotechnology" połączonej z kursem pt.: "Advanced Techniques in Bacterial Genome Research" w Bielefeld (Niemcy).

Prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski, w dniach od 12 grudnia do 23 grudnia 2010 roku przebywał w National Research Center, Dokki, Giza, Egipt, , w ramach umowy o współpracy między PAN i Egyptian Academy of Scientific Research and Technology, wygłoszenie wykładu „"Nucleosides bearing hydrophobic boron cluster pharmacophore as new class of nucleoside derivatives for biological testing – A new paradigm". Konsultacje, dyskusje, uzgadnianie tematów współpracy.

Dr hab. Łukasz Pułaski w dniach 13 – 15 grudnia 2010 przebywał w Göteborg, Szwecja na szkoleniu w zakresie transfekcji mikroelektroporacyjnej organizowane przez firmę Cellectricon AB.

b. Wyjazdy długoterminowe:

Dr Katarzyna Kania w terminie od dnia 19 marca 2010 r. do dnia 17 września 2010 roku. Przebywała w Cambridge, Wielka Brytania. Wykonywała prace eksperymentalne w ramach współpracy naukowej z zespołem prof. M. Barrand w Department of Pharmacology, University of Cambridge.

Dr Mariusz Malinowski w ramach udzielonego urlopu bezpłatnego przez Instytut Biologii Medycznej PAN w dniach od 26 października 2009 do 25 października 2011 przebywa w Laboratoire de Biochimie Medicale et Biologie Moleculaire Universite de Reims Champagne-Ardenne, Francja, odbywając staż podoktorski.

Przyjazdy pracowników naukowych z zagranicy do Instytutu Biologii Medycznej PAN

W dniach od 6 do 14 kwietnia 2010 roku w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej IBM PAN przebywał z wizytą naukową **dr Arvind Kumar Srivastava z Division of Biochemistry Central Drug Research Institute, Lucknow, India**. Wizyta odbyła się w ramach wymiany bezdewizowej na podstawie umowy o współpracy naukowej pomiędzy INSA i PAS. Podczas wizyty dr Srivastava uczestniczył w spotkaniach z pracownikami Instytutu, oraz wygłosił wykład „"*New Antidiabetic drug discovery and Future antidiabetic drug's targets*" oraz „A Journey from deep ocean to high mountains towards the search of antidiabetic flora and fauna". Przedyskutowano także możliwości współpracy i prowadzenia wspólnych prac badawczych.

W dniach od 2 do 12 marca 2010 roku w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej IBM PAN przebywała z wizytą naukową **Prof. Julia Laskowa z Instytutu Związków Organoelementarnych (Institute of Organoelement Compounds INEOS), Rosyjksiej Akademii Nauk, w Moskwie.** Wizyta odbyła się w ramach długoletniej współpracy naukowej, w ramach realizacji wspólnego programu badawczego zat. „"Synthesis and Biological Applications of Dodecaborates and their Derivatives". Podczas wizyty Pani Laskowa uczestniczyła w pracach eksperymentalnych związanych z realizacją tego projektu badawczego.

Uzyskane rezultaty współpracy w roku 2010

Wspólne publikacje i doniesienia:

- **uzyskane rezultaty współpracy:** np.: wspólne publikacje, patenty, nowe metody badawcze i technologie

Wspólne publikacje:

1. de Boussac H., **Ratajewski M.**, **Sachrajda I.**, Köblös G., Tordai A., **Pułaski L.**, Buday L., Váradi A., Arányi T.: The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes. **J Biol Chem, 2010**, 285, 22800 – 8, IF 5.328
2. Dziedzic R, Kiran M, Plocinski P, **Ziółkiewicz M, Brzostek A,** Moomey M, Vadrevu IS, **Dziadek J**, Madiraju M, Rajagopalan M.: Mycobacterium tuberculosis ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. **PLoS One**, **2010,** e11058, IF 4.351

3. **Górna AE**,. Bowater R.P and **Dziadek J.:** DNA repair systems and the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: varying activities at different stages of infection**. Clinical Science**, **2010,** 119, 187-202, IF 4.187

4. Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, Zhai L, Hayes VM, **Kowalska MA,** Cines DB, Poncz M.: Monocyte-bound PF-4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. **Blood, 2010** Dec 2; 116(23), 5021-31. IF 10.555

5. Semioshkin A., Laskova J., Ilinova A., Bregadze V, **Leśnikowski Z.J**.: Reactions of oxonium derivatives of [B12H12]2- with sulphur nucleopliles. Synthesis of novel B_{12}-based mercaptanes, sulfides and nucleosides, **J. Organomet. Chem.,** 2010, doi:10.1016/j.jorganchem.2010.09.01, IF = 2,332

Wspólne doniesienia zjazdowe:

1. Aranyi T., de Boussac H., **Ratajewski M., Pułaski L.**, Varadi A.: Identification of an enhancer element in the first intron of the human ABCC6 gene. 3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

2. de Boussac H., **Ratajewski M.**, Koblos G., **Pułaski Ł.**, Buday L., Varadi A., Aranyi T.: ERK1/2 cascade is a major regulator of the expression of human ABCC6 gene via HNF4a modulation. 3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

3. **Ratajewski M.**, de Boussac H., Varadi A., Aranyi T., **Pułaski Ł.:** Liver specific site in the proximal promoter of ABCC6 gene – involvement of PLAG and HNF4 transcription factors. 3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

4. Semioskhin A., Laskova J., Bregadze V., **Wojtczak B., Piskała A,. Olejniczak A.B.** and **Leśnikowski Z.J.**: An effective approach to the conjugates of nucleosides with polyhedral boranes and metallacarboranes, 24th International Conference on Organometallic Chemistry, July 18-23, 2010, Taipei, Taiwan

Publikacje

Cytowania

Doniesienia zjazdowe i konferencyjne

w 2010 r.

Liczba publikacji placówki, które ukazały się drukiem w 2010 roku:

	Liczba
II. 1.1.Publikacji recenzowane, które ukazały się w czasopismach:	
a) z listy filadelfijskiej	13
b) zagranicznych	2
c) polskich o zasięgu co najmniej krajowym	1
II. 1.2. Prace naukowe pracowników placówki:	
a) autorstwo/współautorstwo monografii lub podręcznika w jęz. obcym	
b) autorstwo/współautorstwo monografii lub podręcznika w jęz. polskim	
c) autorstwo/współautorstwo rozdziału w monografii lub podręczniku w jęz. angielskim	
c) autorstwo/współautorstwo rozdziału w monografii lub podręczniku w jęz. polskim	1
Doniesienia zjazdowe i konferencyjne	**41**
Ogółem	**58**

Publikacje pracowników Instytutu Biologii Medycznej PAN wydane drukiem w 2010 roku

Wykaz publikacji recenzowanych, które ukazały się w czasopismach:

a) z listy filadelfijskiej

1. **Ann NY Acad Sci. - 32**
   Cierniewski C.S., Papiewska-Pająk I., Malinowski M., Sacewicz-Hofman I., Wiktorowska M., Kryczka J., Wysocki T., Niewoarowska J., Bednarek R.
   Thymosin beta4 regulates migration of colon cancer cells by a pathway involving interaction with Ku80.
   2010 Apr; 1194:60-71.
   IF 2,670
   Pkt - 32

2. **Biochem Biophys Res Commun - 27**
   Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Pułaski L, Dastych J:
   DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1.
   2010, 391: 1028-1032
   IF 2.784
   Pkt - 27

3. **Bioinorganic Chem. Appl. - 20**
   Olejniczak A.B., Milecki J., Schroeder G.
   The Effect of Stereochemistry on Sodium Ion Complexation in Nucleoside-Metallacarborane Conjugates **2010**, ID 196064
   IF 1,217
   Pkt - 20

4. **Blood - 32**
   Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, Zhai L, Hayes VM, **Kowalska MA,** Cines DB, Poncz M.
   Monocyte-bound PF-4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia.
   2010 Dec 2; 116(23), 5021-31.
   IF 10.555
   Pkt - 32

5. **ChemMedChem- 32**
   Bednarska K.,. Olejniczak A.B., Wojtczak B.A., Sułowska Z., and Leśnikowski Z.J.
   Adenosine and 2'-deoxyadenosine modified with boron cluster pharmacophores as new classes of human blood platelet function modulators.
   2010, 5, 749-756
   IF 3.232
   Pkt - 32

6. **Clinical Science - 32**
   Górna AE,. Bowater R.P and **Dziadek J.**
   DNA repair systems and the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: varying activities at different stages of infection.
   2010, 119, 187-202
   IF 4.187
   Pkt – 32

7. **Exp Cell Res. - 32**
   Papiewska-Pajak I, **Boncela J, Przygodzka P, Cierniewski CS.**
   Autocrine effects of VEGF-D on endothelial cells after transduction with AD-VEGF-D(DeltaNDeltaC).
   2010 Apr 1; 316(6), 907-14.
   IF 3.589
   Pkt - 32

8. **J Biol Chem - 32**
   de Boussac H., **Ratajewski M.**, **Sachrajda I.**, Köblös G., Tordai A., **Pułaski L.**, Buday L., Váradi A., Arányi T.
   The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes
   2010, 285, 22800 - 8
   IF 5.328
   Pkt- 32

9. **J Biol Chem - 32**
   Świątkowska, M; Padula, G; Michalec, L, Michalec L., Stasiak M., Skurzyński S., **Cierniewski CS.**
   Erol alfa Is Expressed on Blood Plateleds in Association with Protein-disulfide Isomerase and Contributes to Redox-controlled Remodeling of alpha(IIb)beta(3)
   2010, **285, 39, 29874-29883**
   IF 5.328
   Pkt- 32

10. PLoS One – brak tytułu w wykazie czasopism MNiSW

Dziedzic R, Kiran M, Plocinski P, **Ziolkiewicz M, Brzostek A,** Moomey M, Vadrevu IS, **Dziadek J**, Madiraju M, Rajagopalan M.
Mycobacterium tuberculosis ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly.
2010, e11058,
IF 4.351
Pkt - 2

11. Scand J Immunol -20

Nowak M., **Klink M.,** Glowacka E., **Sułowska Z.**, Kulig A., Szpakowski M., Szyllo K., Tchorzewski H.:
Production of cytokines during interaction of peripheral blood mononuclear cells with autologous ovarian cancer cells or benign ovarian tumour cells.
2010; 71: 91-98
IF 2.106
Pkt – 20

12. Toxicol Lett. -32

Arkusz J, Stępnik M, Sobala W, **Dastych J:**
Prediction of the contact sensitizing potential of chemicals using analysis of gene expression changes in human THP-1 monocytes.
2010, 199: 51-59
IF 3.479
Pkt - 32

13. Veterinary Parasitology - 32

Jaros S., **Jaros D.**, Wesołowska A., Zygner W., Wedrychowicz H.
Blocking Fasciola hepatica's energy metabolism – a pilot study of vaccine potential of a novel gene – phosphoglycerate kinase
2010, 172, 229
IF 2.278
Pkt - 32

b) Pozostałe czasopisma (recenzowane) zagraniczne i czasopisma polski

14. Pol J Microbiol - 9

Determination of diagnostic value of Toxoplasma gondii recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model.
Gatkowska J, Dziadek B, **Brzostek A, Dziadek J**, Dzitko K, Długońska H.
2010, 59, 137-41
IF 0.0
Pkt - 9

c) czasopismo zagraniczne (adres redakcji poza Polską) wydane w języku angielskim, nieposiadające IF

15. Current Trends in Microbiology

Estimation of *Proteus mirabilis* species genome variability
Cieślikowski T.
2009, Vol.5 (publikacja nie ujęta w Raporcie IBM PAN za 2009 rok)
IF 0.0
Pkt -2

16. Acta Bot. Croat.
Multilocus genomic associations among selected taxa of genus *Potentilla* (Rosaceae) in Poland using RAPD analysis.
Kołodziejek J., **Cieślikowski T.** Sakowicz T.
2010, 69, 1, 71-82
IF 0.0
Pkt -2

Wykaz monografii naukowych i podręczników akademickich autorstwa, współautorstwa lub pod redakcją pracowników placówki

a) autorstwo monografii lub podręcznika w jęz. obcym
b) autorstwo monografii lub podręcznika w jęz. polskim
c) autorstwo rozdziału w monografii lub podręczniku w jęz. obcym

d) autorstwo monografii lub podręcznika w jęz. polskim

1. wydawca monografii / podręcznika; **Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**
tytuł; „Choroby genetyczne człowieka powodowane przez ekspansje traktów polialaninowych", Część pierwsza: KWASY NUKLEINOWE
autor; **Marta Majchrzak, Paweł Parniewski**
rok, 2009 ***praca ukazała się w 2010 roku, ale wydawca się spóźnił i technicznie jest to tom z roku*** **2009** tom, XXII, strony 65-79
Pkt - 3

Inne publikacje:
Annual Report of the Polish Academy of Sciences
Light and endogenous biological clocks – Impact on melatonin signaling.
Zawilska J.B.
2010, strony 84-87.

Proceedings
Paradowska E., Płóciennikowska A., **Studzińska M., Suski P.,** Wiśniewska-Ligier M., Wróblewska W., Woźniakowska-Gęsicka T., Dzierżanowska-Fangrat K., Kasztelewicz B, Dzierżanowska D., Leśnikowski Z.J. Sequence variability of human cytomegalovirus UL146 gene in congenitally infected newborns and infants. *11 Konferencja nt. Biologia Molekularna w Diagnostyce Chorób Zakaźnych i Biotechnologii*, 2010, 102-105.

Liczba cytowań afiliowanych[1] publikacji naukowych pracowników Instytutu Biologii Medycznej PAN oraz jednostek przejętych przez Instytut Biologii Medycznej PAN[1]

na podstawie Science Citation Index Expanded

do roku 2010 wynosi – 6.680[2]

[1] Cytowania dotyczą publikacji z afiliacją IBM PAN, CBM PAN oraz z afiliacja jednostek na bazie których CBM powstało, tj. CMiW PAN i ZAB PAN (frazy wyszukiwawcze dla nazw instytucji: Inst Biol Med., Ctr Med. Biol, Ctr Microbiol & Virol, Dept Biogenic Amines, Polish Acad Sci).

[2]Instytut Biologii Medycznej PAN uzyskał dostęp do pełnej bazy Science Citation Index Expanded dopiero od 2010 roku.

Doniesienia zjazdowe i konferencyjne w 2010.

(wg pierwszego autora alfabetycznie)

1. **Adamska A., Olejniczak A.B., Leśnikowski Z.J**.: Synteza analogów nukleotydów purynowych o potencjalnej aktywności przeciw HCMV modyfikowanych lipofilowym farmakoforem karboranylowym. Postępy w chemii związków heteroorganicznych, XIII Ogólnopolskie Sympozjum sekcji Chemii Heteroorganicznej PTChem, 19 listopada, 2010, Łódź.

2. Arkusz J., Stępniak M., **Dastych J.:** Induction of interleukin-8 (IL8), heme oxygenease 1 (HMOX) and phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIO1)expression in human THP-1 monocytes as potential markers of the skin sensitizing potential of chemicals. XII international Congress of Toxicology, 19-23 July 2010, Barcelona, Hiszpania.

3. Aranyi T., de Boussac H., **Ratajewski M., Pulaski L.**, Varadi A.: Identification of an enhancer element in the first intron of the human ABCC6 gene. 3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

4. **Bednarska K., Olejniczaka A.B., Wojtczak B.A., Piskała A., Sułowska Z. and Leśnikowski Z.J.:** Adenosine and 2'-deoxyadenosine modified with boron clusters ($C_2B_{10}H_{12}$) as new classes of human blood platelet and neutrophil function modulators. Purines 2010 Meeting, Adenine Nucleosides and Nucleotides in Biomedicine, 30th May-2nd June, Tarragona-Barcelona, Spain.

5. **Brzostek A., Pawełczyk J., Rumijowska-Galewicz A.,** Dziadek B. & **Dziadek J**.: Metabolizm cholesterolu w patogenezie prątków gruźlicy. Molecular Biology in Diagnostics of Infectious Diseases and Biotechnology, 2010, Warszawa, Polska

6. de Boussac H., **Ratajewski M.**, Koblos G., **Pułaski Ł.**, Buday L., Varadi A., Aranyi T.: ERK1/2 cascade is a major regulator of the expression of human ABCC6 gene via HNF4a modulation. 3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

7. **Dziadek J., Górna A.:** DNA w patogenezie prątków gruźlicy. Polski Kongres **Genetyki, 2010,** Lublin, Polska

8. Kasperkiewicz K., **Świerzko A. St**., **Cedzyński M**., Skurnik M., Radziejewska-Lebrecht J.: Mannan-binding lectin (MBL) interaction with lipopolysaccharides (LPS) from rough mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3 serotype of various chemotypes, 4th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates; Hyytiälä Forestry Field Station, Finland, 2010, Abstract Book (abstract 31)

9. **Klink M**., **Bednarska K., Kiełbik M., Nowak M., Sułowska Z:** The participation of Hsp72 and TLR2 and TLR4 in the interaction of Neutrophils with ovarian Cancer cells. MIKROBIOT 2010 – The 2nd workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection, September 9-10, 2010, Łódź. SEPSIS ,2010, 4, 3, p. 236

10. **Leśnikowski Z.**: The Bioorganic Chemistry of an Inorganic Cluster – Nucleosides and Nucleic Acids Modified with Dicarba-*closo*-dodecaboranes. International Sumposium on Therapeutic Nucleic Acids, October 14-16, 2010, Lodz, Poland.

11. Łukasiewicz J., **Świerzko A**., Maciejewska A., Farys M., Jachymek W., Niedziela T., **Cedzyński M**., Ługowski C.: Activation of the complement lectin pathway via interaction between human and mouse mannose-binding lectin (MBL) and lipopolysaccharides of *Hafnia alvei* – identification of binding regions and biological activity of this complex, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Tokyo, Japan, (abstract C-O5-022)

12. **Majewska M.M., Paradowska E., Olejniczak A.B., Studzińska M., Wojtczak B.A., Piskała A., Laskowski A., Leśnikowski Z.J.**: Screening Laboratory Virology and Bacteriology, Bio-Forum, May19-21, 2010, Lodz, Poland.

13. **Majewska M.M.,** Soliman A.M., **Leśniowski Z.J.**: Aktywność przeciwwirusowa wybranych pochodnych kumaryny. II Lubelskie Dni Wirusologiczne 22-24 września 2010, Nałęczów, Polska.

14. **Olejniczak A.B, Leśnikowski Z.J.:** Carborane and metallacarborane clusters as prospective redox labels for DNA, 20th Anniversary world Congress on Biosensors, 26-28 May 2010, Glasgow, UK

15. **Olejniczak A.B., Leśnikowski Z.J**.: Boron clusters based DNA-electrochemical chips. BioBorChip. Central European forum of Biotechnology & Innovative BioEconomy – Bio-Forum, May19-21, 2010, Lodz, Poland.

16. **Olejniczak A.B., Bednarska K., Sułowska Z., Leśnikowski Z.J.:** Adenosine modified with boron cluster pharmacophore as new potential modulators of purynergic receptors. AdeBorPharm. Central European forum of Biotechnology & Innovative Bioeconomy-Bioforum, 19-21 maja 2010, Łódź

17. **Olejniczak A.B., Adamska A., Leśnikowski Z.J.:** Modification of anti-HCMV drugs with boron clusters- the case of the ganciclovir. International Symposium on Therapeutic Nucleic Acids, October 14-16, 2010, Lodz, Poland.

18. **Paradowska E.** (Project Coordinator). "Prenatal and perinatal human cytomegalovirus infection" – Partners, Objective, Activities. Central European Forum of Biotechnology & Innovative BioEconomy BioForum 2010, May 19-21, 2010, Lodz, Poland.

19. **Paradowska E., Cedzyński M., Leśnikowski Z.J**.: Prenatal and perinatal human cytomegalovirus infection. Central European Forum of Biotechnology & Innovative BioEconomy BioForum 2010, May 19-21, 2010, Lodz, Poland.

20. **Paradowska E., Studzińska M., Suski P.**, Nowakowska D., Gaj Z., Wilczyński J., **Leśnikowski Z.J.**: Expression of tumor necrosis factor alpha in human term placenta during HCMV infection *in vitro*.
    Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska - *MIKROBIOT 2010,* 9-10 września 2010, Łódź, Polska. *Sepsis*, 4 (3):240 (2010). [1.10].

21. **Paradowska E., Studzińska M.**, Wiśniewska-Ligier M., Suski P., Wróblewska W., Woźniakowska-Gęsicka T., **Leśnikowski Z.J.**: Cytomegalovirus gB and gpUL144 genotypes distribution among congenitally infected infants in central Poland.
    3rd Congenital Cytomegalovirus Conference, September 23-25, 2010, Paris, France.

22. **Paradowska E., Studzińska M., Suski P.,** Fangrat-Dzierżanowska K., Kasztelewicz B., Dzierżanowska D., Nowakowska D., Gaj Z., Wilczyński J., **Leśnikowski Z.J.**: Sequence analysis of The polymorphic regions in the human cytomegalovirus genome detected in newborns with congenital infections. 3rd Congenital Cytomegalovirus Conference, September 23-25, 2010, Paris, France.

23. **Paradowska E., Studzińska M., Suski P**., Wiśniewska-Ligier M., Wróblewska W., Woźniakowska-Gęsicka T., **Leśnikowski Z.J.**: Genotypowanie wirusa cytomegalii u niemowląt na podstawie sekwencji genu UL144. II Lubelskie Dni Wirusologiczne, 22-24 września 2010, Nałęczów, Polska.

24. **Paradowska E., Studzińska M., Suski P.,** Wiśniewska-Ligier M., Wróblewska W., Woźniakowska-Gęsicka T., **Leśnikowski Z.J.**: Metoda PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) do wykrywania i monitorowania zakażeń wirusem cytomegalii u niemowląt. II Lubelskie Dni Wirusologiczne, 22-24 września 2010, Nałęczów, Polska.

25. **Paradowska E.,** Płóciennikowska A., **Studzińska M., Suski P.,** Wiśniewska-Ligier M., Wróblewska W., Woźniakowska-Gęsicka T., Dzierżanowska-Fangrat K., Kasztelewicz B., Dzierżanowska D., **Leśnikowski Z.J.:** Sequence variability of human cytomegalovirus UL146 gene in congenitally infected newborns and infants. XI Conference on "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology", 27 November, 2010, Warsaw, Poland. Proceeedings of XI Conference DIAGMOL 2010, 102-105.

26. **Pawełczyk J., Brzostek A.,** Dziadek B., **Rumijowska-Galewicz A.,** Kremer L., **Dziadek J.:** Evaluation of mycobacterial acetyl-CoA carboxyltransferase (ACCD6) as a potential target for new tuberculostatics. International Conference on Antimicrobial Research, 2010, Valladolid, Hiszpania

27. **Piskała A., Wojtczak B.A, Olejniczak A.B., Laskowski A., Leśnikowski Z.J.:** Synthesis of nucleoside phosphates and their nucleoside precursors modified with boron cluster pharmacophore. International Sumposium on Therapeutic Nucleic Acids, October 14-16, 2010, Lodz, Poland.

28. **Piskała A., Bednarska K., Wojtczak B.A., Olejniczak A.B., Sułowska Z., Leśnikowski Z.J.:** Pochodne adenozyny oraz 2'-deoksyadenozyny modyfikowane klasterami boru jako inhibitory produkcji reaktywnych form tlenu w neutrofilach – synteza i wstępne badania aktywności. Postępy w chemii związków heteroorganicznych, XIII Ogólnopolskie Sympozjum sekcji Chemii Heteroorganicznej PTChem, 19 listopada, 2010, Łódź

29. **Ratajewski M.**, de Boussac H., Varadi A., Aranyi T., **Pułaski Ł.:** Liver specific site in the proximal promoter of ABCC6 gene – involvement of PLAG and HNF4 transcription factors.
    3rd FEBS Special Meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", 2010, Austria.

30. Semioskhin A., Laskova J., Bregadze V., **Wojtczak B., Piskała A,. Olejniczak A.B.** and **Leśnikowski Z.J.**: An effective approach to the conjugates of nucleosides with polyhedral boranes and metallacarboranes,
    24th International Conference on Organometallic Chemistry, July 18-23, 2010, Taipei, Taiwan.

31. Sobczak M., Paduszynska A., Mikolajczyk B., **Piskała A. Wojtczak B.A., Olejniczak A.B., Leśnikowski Z.J.**, Nawrot B.: Synthesis of siRNAs modified with boron cluster and

their physico-chemical and biological characterization. International Sumposium on Therapeutic Nucleic Acids, October 14-16, 2010, Lodz, Poland.

32. **Szala A**., Bąk-Romaniszyn L., **Świerzko A**., Zeman K., **Cedzyński M**.: *MBL2* gene polymorphisms and MBL concentrations in childrem with gastritis, 18th UEGW, Barcelona, Spain, 2010; *Gut,* (59, suppl. III), A140 (abstract P0169)

33. **Szala A.,** Sawicki S., **Świerzko A**., Wydra D., Szemraj J., Kaluzynski A., **Pułaski Ł.**, Szymanski J., **Cedzynski M**.: MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) expression in healthy and malignant ovary. 7th International Conference on Innate Immunity, 2010, Grecja, *Aegean Conferences Series* vol. 50; 125 (abstract 93)

34. **Urbańska A.,** Woldan-Tambor A., **Sokołowska P., Namiecińska M., Biegańska K**., **Zawilska J.B**. Orexin type-2 receptor inhibits cyclic AMP synthesis in neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. XII Conference on Biogenic Amines and Related Biologically Active Compounds. 21-23.10.2010, Łódź.

35. **Walczak-Drzewiecka A., Ratajewski M., Pułaski Ł., Dastych J**.: Lineage specific regulation of HIF1A expression in hematopoietic cells. 14th International Congress of Immunology, 2010, Japonia

36. Wisniewska-Ligier M., Wroblewska W., **Paradowska E., Studzińska M., Suski P., Leśnikowski Z.J.**, Wozniakowska-Gesicka T.: Cytomegalovirus genetic variability and the humoral immunity. Federation of Infection Societies Scientific Meeting. 17-19 November, 2010, Edinburgh, United Kingdom.

37. Wiśniewska-Ligier M., T. Woźniakowska-Gęsicka, W. Wróblewska, **E. Paradowska**.: Clinical manifestation of congenital CMV infections. 3rd Congenital Cytomegalovirus Conference, September 23-25, 2010, Paris, France.

38. Wisniewska-Ligier M., Wroblewska W., **Paradowska E., Studzinska M., Suski P., Leśnikowski Z.**, Wozniakowska-Gesicka T.: Cytomegalovirus genetic variability and the clinical course of cytomegaly. Excellence in Paediatrics. 2-4 December, 2010, London, United Kingdom. PP034.

39. Wydra D., **Szala A., Świerzko A.,** Sawicki S., Szemraj J., Kaluzynski A., **Pułaski Ł.**, Szymanski J., **Cedzynski M.:** Expression of the lectin pathway activation factors in the female reproductive tract. 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 2010, Czechy, Abstract book (abstract 1251)

40. **Zawilska J.B**., Woldan-Tambor A.: Type 1 orexin receptor (OX_1R) stimulate cyclic AMP synthesis in primary glial cell cultures from rat cerebral cortex. 7th FENS Forum 3-7.07.2010, Amsterdam, Holandia.

41. **Zawilska JB.:** Farmakologia „dopalaczy". Neuropsychiatria i Neuropsychologia, 26.11.2010, Poznań.

Wykłady i referaty
wygłoszone na ważnych konferencjach w kraju i za granicą

- autor: prof. dr hab. **Cierniewski Czesław**
- tytuł / temat: Redox controlled activation of integrin receptors,
- nazwa zjazdu lub konferencji: Zjazd Pol.Tow. Biofizycznego, 2010,
- kraj: Łódź, Polska.

- autor: prof. dr hab. **Cierniewski Czesław**
- tytuł / temat: Rola receptorów integrynowych w oporności na anoikis komórek nowotworowych.
- nazwa zjazdu lub konferencji: Konferencja Komitetu Cytobiologii, 2010,
- kraj: Warszawa, Polska.

- autor: prof. dr hab. **Cierniewski Czesław**
- tytuł / temat: Integrin-metaloproteinases cross-talk during colon cancer invasion,
- nazwa zjazdu lub konferencji: Zjazd Pol.Tow. Biochemicznego, 2010,
- kraj: Wisła, Polska.

- autor: prof. dr hab. **Zbigniew Leśnikowski**
- tytuł / temat: The Bioorganic Chemistry of an Inorganic Cluster – Nucleosides and Nucleic Acids Modified with Dicarba-*closo*-dodecaboranes,
- nazwa zjazdu lub konferencji: International Sumposium on Therapeutic Nucleic Acids, October 14-16, 2010,.
- kraj: Łódź, Polska.

Wykłady i referaty wygłoszone w kraju i za granicą
na zaproszenie instytucji naukowych w 2010

nie będące referatami czy wykładami w trakcie konferencji ani działalnością dydaktyczną:

- Autor: prof. dr hab. **Zbigniew Leśnikowski**
- tytuł: On the Verge of Bioorganic and Inorganic Chemistry – New Materials for Molecular Medical Diagnostic and Chemotherapy
- instytucja zapraszająca: Institut de Ciència de Materials de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona,
- kraj: Hiszpania.

- Autor: prof. dr hab. **Zbigniew Leśnikowski**
- tytuł: Nucleosides bearing hydrophobic boron cluster pharmacophore as new class of nucleoside derivatives for biological testing– A new paradigm
- instytucja zapraszająca: National Research Center, Kair,
- kraj: Egipt.

- autor: dr hab. **Paweł Parniewski**, prof. IBM PAN
- tytuł: Trinucleotide repeat sequences in epidemiological investigation,
- instytucja zapraszająca: National Research Centre, El-Behoos st. Dokki, Giza,
- kraj: Egipt.

- autor: prof. dr hab. **Zawilska Jolanta B**
- tytuł: Mózg na dopalaczach,
- Instytucja zapraszająca: Uniwersytet Jagielloński,
- kraj: Kraków, Polska.

- autor: prof. dr hab. **Zawilska Jolanta B**
- tytuł: Farmakologia dopalaczy,
- Instytucja zapraszająca: Polskie Towarzystwo Psychiatryczne
- kraj: Poznań, Polska.

- autor: mgr **A. Szala, M.** dr hab. **Cedzyński** prof. IBM PAN, dr hab. A. **Świerzko** prof. IBM PAN
- tytuł: Czynniki aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej w okresie okołoporodowym,
- instytucja zapraszająca Komitet Mikrobiologii PAN,
- kraj: Polska.

Informacje

o pozostałej aktywności naukowej pracowników

Instytutu Biologii Medycznej PAN

w 2010 r.

Nagrody krajowe przyznane za działalność naukową

- nazwa / rodzaj nagrody: **Indywidualne roczne stypendium w ramach programu "START 2010**
- za co przyznane: **Program START- stypendium krajowe dla młodego naukowca w dziedzinie biologia molekularna**
- przez kogo: **Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej**
- komu: **dr Marcin Ratajewski**

- nazwa / rodzaj nagrody: **II Nagroda im. Basalika**
- za co przyznane: **za najlepsze prace o tematyce mikrobiologicznej opublikowane w 2009 roku, zrealizowane w całości w polskim laboratorium (Brzostek i wsp., J. Bacteriol. 2009)**
- przez kogo: **Komitet Mikrobiologii PAN**
- komu: **Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J.**

Działalność o charakterze innowacyjnym, aplikacyjnym:

Ochrona własności intelektualnej (dotyczy uprawnień placówki z patentu/prawa ochronnego w myśl art. 20 ust. 2 i art. 82 ustawy z 19.10.1972 r. z późniejszymi zmianami Dz. U. Nr 26 z 1993 r. poz. 117),
w tym:

a) Uzyskany patent:

- Tytuł: **„Pochodna nukleozydu, modyfikowany oligonukleotyd oraz sposób otrzymywania pochodnej nukleozydu"**
- Twórcy wynalazku: **prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski, dr Agnieszka Olejniczak**
- Data decyzji: **22-06-2010**
- Numer patentu: **PL 207183 B1,** udzielenie patentu ogłoszono: **30.11.2010 WUP 11/10**
- Numer zgłoszenia: **P 359949 z dnia 2.V.2003**
- uprawniony do patentu: **Instytut Biologii Medycznej PAN**

b) Międzynarodowe zgłoszenie wniosku patentowego:

- Autorzy: **Zbigniew J. Leśnikowski, Agnieszka Olejniczak, Zofia Sułowska, Katarzyna Bednarska**.
- Tytuł: „**Borane derivates of adenosine**".
- Numer zgłoszenia: **PCT/PL2010/050004**
- Data zgłoszenia międzynarodowego Urzędzie Patentowym RP: **5 luty 2010**

c) Zgłoszenie wniosku patentowego:

- Autorzy: Jolanta Łukaszewicz, Czesław Ługowski, Anna Maciejewska, Wojciech Jachymek, Tomasz Niedziela (IIiTD PAN, Wrocław), **Anna Świerzko, Maciej Cedzyński (IBM PAN)**
- Tytuł: **Polisacharyd oraz jego pochodne posiadające powinowactwo do fikoliny-3, sposób ich otrzymywania i zastosowania**
- Numer zgłoszenia: **P 391 475**
- Data zgłoszenia: **11.06.2010**
- Współuprawnieni: **Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN oraz Instytut Biologii Medycznej PAN**

d) Wykaz wdrożeń - udokumentowanych i wykorzystanych poza jednostką wyników badań naukowych i prac rozwojowych prowadzonych w jednostce

- Tytuł przedsięwzięcia: **Opracowanie metodyki oznaczania pozytywnych modulatorów allosterycznych receptora mGluR2**
- słowa kluczowe: **testy przesiewowe, badania in vitro**
- jednostka wdrażająca: **ADAMED Sp. z o.o.**
- forma prawna przekazania wyników prac B+R: **Umowa cywilno-prawna o wykonanie badań naukowych**
- wycena wartości przekazanych wyników badań: **28 000 PLN**
- opis efektów praktycznych, gospodarczych lub społecznych, uzyskanych poza jednostką: **Poufne na żądanie wdrażającego**

Rozwój kadr naukowych

Wykaz uzyskanych tytułów i stopni naukowych pracowników placówki w 2010:

Stopień doktora habilitowanego

(*imię nazwisko, tytuł pracy doktorskiej, zakres nadanego stopnia naukowego)*

imiona i nazwisko: dr **Łukasz Pułaski**

tytuł pracy habilitacyjnej: „**Mechanizmy regulacji ekspresji wybranych genów z rodziny ABCC"**

Stopień doktora habilitowanego **nauk biologicznych w zakresie biologii- biologii medyczne**j, nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 29 czerwca 2010 r.

Promotorstwo prac doktorskich w 2010 roku

Uzyskane doktoraty w ramach studiów doktoranckich pod kierunkiem promotora z placówki (wykonane w IBM PAN)

Praca doktorska: **mgr Joanna Arkusz**
Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Indukcja ekspresji genu interleukiny-1b w hodowanych in vitro komórkach prezentujących antygen jako potencjalny wskaźnik działania uczulających związków chemicznych"**
Promotor: **dr hab. Jarosław Dastych, profesor IBM PAN**

Inne formy kształcenia w 2010 roku

Uczestnicy innych form kształcenia (magistranci, praktykanci, stażyści)
- z wyszczególnieniem poszczególnych form kształcenia: **liczba ogółem: 20 osób**

Pracownia Genetyki i Fizjologii Mykobakterium

<u>Praktykanci –2 osoby</u>
Imię i nazwisko praktykanta: **Mariusz Bachorski**
Imię i nazwisko opiekuna: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**

Imię i nazwisko praktykanta: **Przemysław Chwiałkowski**
Imię i nazwisko opiekuna: **prof. dr hab. Jarosław Dziadek**

Magistranci - 1 osoba
Imię i nazwisko magistranta: **Piotr Kałuża**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Anna Brzostek**

Pracownia Immunobiologii Zakażeń

Praktykanci – 1 osoba
Imię i nazwisko praktykanta: **Mateusz Michalski**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr hab.Maciej Cedzyński prof. IBM PAN,**
dr hab. Anna Świerzko prof. IBM PAN,
mgr Agnieszka Szala

Magistranci - 2 osoby
Imię i nazwisko magistranta: **Marcin Bartłomiejczyk**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr hab. Maciej Cedzyński prof. IBM PAN**

Imię i nazwisko magistranta: **Mateusz Michalski**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr hab. Maciej Cedzyński prof. IBM PAN**

Pracownia Immunologii Doświadczalnej

Stażyści - 2 osoby
Nazwisko i imię stażysty - **mgr Izabela Szulc**
Nawisko i imię opiekuna - **dr hab. Zofia Sułowska prof. IBM PAN,**
dr hab. Magdalena Klink prof. IBM PAN

Nazwisko i imię stażysty – **mgr Izabela Biskup**
Nawisko i imię opiekuna - **dr hab. Zofia Sułowska prof. IBM PAN**

Pracownia Immunologii Komórkowej

Magistranci - 2 osoby
Imię i nazwisko magistranta: **Blanka Majda**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Aurelia Walczak-Drzewiecka**

Imię i nazwisko magistranta: **Aleksandra Jeruzal**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Waldemar Wagner**

Pracownia Proteomiki Komórkowej

Praktykanci – 2 osoby
Imię i nazwisko praktykanta: **Łukasz Pokora**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Mari de la Paz Mena Jaramillo**

Imię i nazwisko praktykanta**: Anna Stępień**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Joanna Boncela**

Pracownia Regulacji Transkrypcyjnej

Praktykanci – 3 osoby
Imię i nazwisko praktykanta: **Lisa Girschick**

Imię i nazwisko opiekuna: **dr Dorota Jaros**

Imię i nazwisko praktykanta: **Magdalena Słapek**
Imię i nazwisko opiekuna: **mgr inż. Iwona Sachrajda**

Imię i nazwisko praktykanta**: Michał Gorzkiewicz**
Imię i nazwisko opiekuna: **mgr inż. Iwona Sachrajda**

Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej

Praktykanci – 3 osoby
Imię i nazwisko praktykanta:**Michał Matuszewski**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Agnieszka Olejniczak**

Imię i nazwisko praktykanta: **Michalina Stokowska**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Agnieszka Olejniczak**

Imię i nazwisko praktykanta: **Karolina Woźniak**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Agnieszka Olejniczak**

Magistranci - 1 osoba
Imię i nazwisko magistranta: **Agnieszka Płuciennikowska**
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Edyta Paradowska**

Stażyści – 1 osoba
Nazwisko i imię stażysty: **Dr. Abd El Mohsen Soliman**, National Research Center, Giza, Egypt
Imię i nazwisko opiekuna: **dr Agnieszka Olejniczak**

Opieka nad studentami studiów doktoranckich

Doktoranci realizujący prace doktorskie w **Pracowni Genetyki i Fizjologii Mykobakterium** Instytutu Biologii Medycznej PAN pod opieką/promotorstwem **prof. dr hab. Jarosława Dziadka.**

- Ewelina Wójcik (Studium Doktoranckie Uniwersytetu Łódzkiego)
- Małgorzata Ziółkiewicz (Studium Doktoranckie Uniwersytetu Łódzkiego)
- Alina Górna (Studium Doktoranckie Uniwersytetu Łódzkiego)
- Elżbieta Fornal (Studium Doktoranckie Politechniki Łódzkiej)

Inne formy aktywności

Działalność ekspercka, przygotowywanie opinii, recenzji, udział w konsultacjach, udział w pracach komitetów programowych konferencji/ zjazdów, przewodniczenie sesjom;

Dr hab. Maciej Cedzyński

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism:
  Clinical and Experimental Immunology
  *Clinical Immunol*ogy
  Asian Biomedical Journal
- Przewodniczenie komisji do spraw przyjmowania i przeprowadzania obron rozpraw doktorskich w IBM PAN.

Prof. dr hab. Czesław Cierniewski

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism:
  - *Journal of Biological Chemistry,*
  - *Thrombosis and Haemostasis,*
  - *Experimental Cell Reasearch*

Dr hab. Jarosław Dastych, prof. IBM PAN

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism
  - *Peptides,*
  - *International Archives of Allergy and Applied Immunology*

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism:
  - *Polish Journal of Microbiology*
- Recenzje wniosków o nagrodę Ministra
- Recenzje projektów grantowych: MNiSW; POIG
- recenzje doktoratów (2 UŁ)

Dr hab. Magdalena Klink, prof. IBM PAN

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism:
  - *Journal of Leukocyte Biology*
  - *Inflammation Research*
- Członek Komitetu Redakcyjnego
  - *Mediators of Inflammation*

Prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

- Recenzent artykułów naukowych w czasopismach:
  - *European Journal of Medicinal Chemistry*
  - *ChemMedChem*
  - *Langmuir*
  - *Macromolecules*
  - *Molecules*
- Reviewer for European Science Foundation
- Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej dr Bogny Rudolf

Dr hab. Zofia Sułowska, prof. IBM PAN

- Recenzje prac doktorskich: lek. med.– **Piotra Krawczyka**
  Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Dr hab. Anna Świerzko

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism:
  - *Cancer Immunology and Immunotherapy*
  - *Human Immunology*
  - *Pediatric Allergology and Immunology*

Prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska

- Recenzent artykułów naukowych do czasopism do:
  - Acta Neurobiologiae Experimentalis
  - *Pharmacological Reports*,
  - Recenzje:
    - *dorobku naukowego, dydaktycznego i osiągnięć w zakresie pracy organizacyjnej dr hab. Bogusławy Budziszewskiej (Instytut Farmakologii PAN) – kandydatki do tytułu naukowego profesora,*
    - *cyklu prac zgłoszonych do Nagrody Naukowej Wydziału Nauk Medycznych PAN,*
    - *rozprawy habilitacyjnej i dorobku naukowego oraz dydaktyczno-organizacyjnego dr Andrzeja Mogielnickiego Z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,*
    - prac doktorskich*: Mgr Katarzyny Werhun "Serotonin and circadian system of nocturnal rodents: in vivo approaches" UJ,*
    - *Mgr Anny Dziubiny "Rola receptorów adenozynowych A2A w stresie oksydacyjnym towarzyszacym podawaniu L-DOPA w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona" Instytut Farmakologii PAN w Krakowie*

Członkostwo z wyboru w organizacjach naukowych

Prof. dr hab. Czesław S. Cierniewski

- Przedstawiciel Polski w International Society of Biochemistry and Molecular Biology. Rok wyboru 2003
- Przewodniczący Międzynarodowego Komitetu Biochemii i Biofizyki. Rok wyboru 2003
- Członek korespondent PAN. Rok wyboru 1998
- Prezes Łódzkiego Oddziału PAN. Rok wyboru 2007
- Przewodniczący Komisji Biologiczno-Chemiczno-Medycznej przy Łódzkim Oddz. PAN. Rok wyboru 1999
- Przewodniczący Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN. Rok wyboru 2003
- Przewodniczący Fundacji Naukowej im Tomasza Jakuba Michalskiego. Rok wyboru 2007
- Vice Przewodniczący Komisji Homeostazy i Zakrzepic Komitetu Fizjologii PAN. Rok wyboru 2003
- Członek Komitetu Biotechnologii PAN. Rok wyboru 1998
- Przewodniczący Komisji Nagród przy II Wydziale PAN. Rok wyboru 2002
- Przewodniczący Rady Naukowej Centrum Zaawansowanych Technologii BIO-TECH- MED. Rok wyboru 2004

- Dyrektor Centrum Doskonałości MolMed. Rok wyboru 2003- 2006
- Komitet Badań Naukowych – członek Sekcji Biochemii i Biofizyki Molekularnej. Rok wyboru 1994
- Członek Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego. Rok wyboru 1998
- Członek Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Rok wyboru 1998
- Członek Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Rok wyboru 1998
- Członek Rady Naukowej Międzynarodowego Instytutu Ekohydrologii PAN w Łodzi. Rok wyboru 2004
- Członek Redakcji (Editorial Board) *Journal of Biological Chemistry*. Rok wyboru 2003

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
- Przewodniczący Narodowego Komitetu ds. Integracji z Międzynarodową Unią Towarzystw Mikrobiologicznych (IUMS). Rok wyboru 2004 i 2008
- Członek Komitetu Narodowego ds. Współpracy z Międzynarodową Radą Nauki (ICSU) przy Prezydium PAN. Rok wyboru 2004
- Członek Komitetu Mikrobiologii PAN. Rok wyboru 2003 i 2008

Prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski
- Członek Łódzkiego Oddziału PAN. Rok wyboru 2003
- Societas Scientarum Lodziensis, 2007-obecnie

Dr Agnieszka Olejniczak
- Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Rok wyboru 2003

Dr Edyta Paradowska
- Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Rok wyboru 2003
- Członek Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych
- Członek założyciel Polskiego Towarzystwa Wirusologii. Rok wyboru 2008

Mgr Mirosława Studzińska
- Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Rok wyboru 2004
- Członek założyciel Polskiego Towarzystwa Wirusologii. Rok wyboru 2008

Dr Łukasz Pułaski
- Komitet Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Rok wyboru: 2003
- Stowarzyszenie Tłumaczy Polskich, Sekcja Tłumaczy Naukowo Technicznych (członek rzeczywisty). Rok wyboru 2003

Doc dr hab. Zofia Sułowska
- Vice Przewodnicząca Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej. Rok wyboru: 2005
- Członek Polskiego Towarzystwa Cytometrii Przepływowej. Oddział Łódzki
- Członek Komisji Etyki przy Łódzkim Oddziale PAN. Rok wyboru 2004
- Członek Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych przy Uniwersytecie Łódzkim

Prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska

- Członek Network of the European Neuroscience Schools Committee (2007-2012)
- Członek Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN (kadencja 2007-2011)
- W-ce Przewodnicząca Komitetu Neurobiologii PAN (kadencja 2007-2011)
- European Society for Biological Rhythms. Rok wyboru 1992
- Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego. Rok wyboru 1992. Członek Zarządu (2009-2011)
- Polskie Towarzystwo Farmakologiczne. Rok wyboru 1983

Seminaria naukowe
przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej PAN w 2010 r.

- 11 stycznia 2010
  Mgr Mirosława Studzińska: „Wykrywanie i genotypowanie ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV) na podstawie sekwencji genów UL55, UL 144 i US28".

- 25 stycznia 2010
  Dr Waldemar Wagner: „Działanie procyjanidyn z ekstraktów pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica*) na komórki nowotworowe raka jelita grubego".

- 8 luty 2010
  Dr Łukasz Pułaski: „ABCB6 - zagadkowy(?) mitochondrialny(?) transporter(?) porfiryn(?)"

- 8 marca 2010
  Dr Małgorzata Korycka-Machała: „Primaza DnaG jako enzym niezbędny w procesie replikacj".

- 22 marca 2010
  Dr Katarzyna Bednarska:" Wpływ pochodnych adenozyny modyfikowanych klasterami boru na funkcje neutrofilów".

- 12 kwietnia 2010
  Dr. Arvind Kumar Srivastava, Division of Biochemistry, Central Drug Research Institute, Lucknow, India: "A journey from deep ocean to high mountains towards the search of antidiabetic flora and fauna".

- 10 maja 2010
  Dr hab. Anna St. Świerzko,prof. IBM PAN, dr hab. Maciej Cedzyński, prof. IBM PAN: „Oddziaływanie fikoliny H z lipopolisacharydami *Hafnia alvei"*.

- 17 maja 2010
  Dr Patrycja Przygodzka: „Nuclear matrix protein, matrin 3 - a regulator of cell survival(?)"

- 31 maja 2010
  Dr Tomasz Cieślikowski: „Różnorodność bakterii: reguły i granice".

- 8 września 2010
  Mgr Mirosława Studzińska: „Analiza sekwencyjna wybranych genów HCMV i genotypowanie izolatów klinicznych od pacjentów z regionu łódzkiego".

- 21 czerwca 2010
  Mgr Agnieszka Piskała: „Pochodne adenozyny modyfikowane klasterami boru jako potencjalne modulatory receptorów purynergicznych - część 2".

- 8 września 2010
  Mgr Anna Krzyżanowska: „Zastosowanie metody TRS-PCR w różnicowaniu serowarów Salmonella enterica subsp. enterica".

- 4 października 2010
  Dr Anna Rumijowska-Galewicz: „alamarBlue – wskaźnik żywotności komórek".

- 18 października 2010
  Mgr Jakub Pawelczyk: „Kluczowa dla biosyntezy kwasów mykolinowych *Mycobacterium tuberculosis* karboksylotransferaza AccD6,nie jest niezbędna w komórkach prątków szybkorosnących".

- 8 listopada 2010
  Mgr Michał Kiełbik: „Związki uwalniające tlenek azotu i ich potencjalne zastosowanie w terapii nowotworu ".

- 22 listopada 2010
  Prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska: „Dopalacze" - przedstawiciele, działania, zagrożenia.

- 29 listopada 2010
  Dr Aurelia Walczak-Drzewiecka: „Regulacja ekspresji HIF1A w procesie różnicowania komórek tucznych".

- 13 grudnia 2010
  Mgr inż. Anna Kubiak: „TRS-PCR a sprawa *Mycobacterium kansasii"*.