

Výkazy práce – podmínky zpracování

POZOR, nový vzor výkazu práce – nově obsahuje sloupec s číslem Klíčové aktivity, které je nutné vyplnit u každého řádku. Legenda je následující:

- KA 1 = Realizace navržené výzkumné agendy projektu, tzn. výzkumná činnost
 - KA 2 = Upgrade a doplnění výzkumné infrastruktury, tzn. příprava podkladů pro výběrová řízení, instalace a testovací provoz nových přístrojů
 - KA 3 = Sestavení a rozvoj týmu excelentního výzkumu projektu, tzn. personální činnosti vedoucích výzkumných skupin
 - KA 4 = Rozvoj internacionalizace výzkumu ve vztahu k projektu, tzn. zahraniční služební cesty, jednání a spolupráce se zahraničními partnery, příprava mezinárodních grantů, publikace s mezinárodní účastí
 - KA 5 = Řízení projektu, tzn. pouze pro administrativní pozice (Jolana Hořejší, Lenka Štěrbová, Blanka Hajná)
-
- dvouslovný popis činnosti, která se opakuje po celý měsíc, není dostatečně detailní
 - rozsah popisu jedné činnosti v rozmezí délky cca 1 celého řádku – alespoň u některých činnostech, u kterých to takto lze
 - je potřeba popis činnosti rozepsat více do detailu, ideálně navázat na finální výstup, který bude daná činnost mít (např. pro účely publikace)
 - není možné opakovat jednu činnost každý den daného měsíce, je nutné prostřídat několik různých činností (min. 3, pokud možno). Pokud se opravdu věnujete jedné činnosti, tak rozepište její fáze.
 - stále platí, že činnosti musí odpovídat popisu práce v příloze pracovní smlouvy

Není nutné detailní a konkrétní popisy vytvářet odznova, je možné zkopírovat, nebo parafrázovat plánované aktivity z časového plánu studie proveditelnosti s tím, že za ně s pomlčkou uvedete, jakou konkrétní činnost jste v rámci této aktivity prováděli. Jasně viditelná vazba na studii proveditelnosti určitě není na škodu, naopak je vítána.

Příklad:

<i>PB 1.1 - Rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů – navrhování inhibičních derivátů</i>
<i>PB 1.1 - Rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů – proteomická analýza</i>
<i>PB 1.1 - Rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů – příprava vzorků pro spektroskopickou analýzu</i>
<i>PB 1.1 - Rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů - vyhodnocování dat</i>

Činnosti ze studie proveditelnosti

1.1.1.1.1 PB1.1. Mareš - Časový plán

2018-2020/21

- Příprava malých proteinů: rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů.
- Inženýrství malých proteinů pomocí racionálních a kombinatorních metod.

- Strukturní analýza malých proteinů: krystalizační testy, krystalografická a NMR analýza komplexů inhibitorů s proteasou.
- In silico analýza: výpočetní analýza na 3D strukturách komplexů proteinových inhibitorů, predikce mimetických inhibitorů.
- Funkční analýza proteinových inhibitorů: in vitro testy s proteasami a různými substráty, in vivo testy v buněčných systémech.

2020/21-2022

- Příprava a inženýrství proteinových inhibitorů a příprava jejich komplexů.
- In silico analýza komplexů proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů.
- Syntéza mimetických inhibitorů.
- Funkční analýza proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů: in vitro testy s proteasami a různými substráty, in vivo testy v buněčných systémech.
- Optimalizace funkčních vlastností proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů: od navrhování inhibitorů k jejich testování.
- Strukturní analýza komplexů optimalizovaných proteinových a mimetických inhibitorů.

1.1.1.1.2 PB1.2. Řezáčová - Časový plán

2018-2019/20

- Validace možnosti cílení proti cN-II.
- Strukturní charakterizace interakce MLL-LEGF/p75 s inhibitory identifikovanými metodou HTS pomocí NMR spektroskopie a jejich rozvoj.
- Optimalizace knihovny fragmentů

2018/19-2022

- Testování fragmentů proti vybraným cílům (cN-II, MLL-LEDGF/p75, nově identifikované cíle).
- Validace nově identifikovaných protein-proteinových interakcí jako terapeutických cílů.

2019/20-2022

- Validace identifikovaných molekul fragmentů.
- Strukturní a biofyzikální charakterizace identifikovaných fragmentů.
- Rozpracování fragmentu a vývoj inhibitoru.

1.1.1.1.3 PB1.3. Hobza - Časový plán

2018-2018/19

- MD insulinového receptoru, CTSK a GlpG v komplexu se známými ligandy.
- Výpočet příspěvků k vazebné energii na úrovni SQM; identifikace “horkých míst” pro návrh.
- Identifikace nekovalentních interakčních motivů; jejich přidání do databází.

2019-2020/21

- Vytvoření databáze důležitých interakčních motivů v PPI.
- Ověření SQM a MM metod.
- Odvození korekcí pro nekovalentní interakce v SQM a MM metodách.

2019/20-2022

- Virtuální prohledávání knihoven fragmentů, které by se vázaly do “horkých míst” a ověření vazby experimentem.
- Návrh a předpověď nových proteinových ligandů pro insulinový receptor, CTSK a GlpG s použitím fragmentů.
- Iterativní optimalizace návrhu ligandů po jejich ověření syntézou a měřením aktivity.

1.1.1.1.4 PB1.4. Vondrášek, Bouř - Časový plán

2018-2019

- Strukturní charakterizace AMBN a z něj odvozených peptidů metodami DLS a SAXS v kombinaci se simulacemi metodami molekulové dynamiky. Budou získány jeho agregační a interakční vlastnosti

2018-2019/20

- Experimentální charakteristika a VCD spektroskopie peptidů odvozených od AMBN, proteolytických produktů a modelových struktur obsahující sekvence náchylné k agregaci.

2020-2021

- Vliv fosforylace na chování AMBN odvozených peptidů a produktů proteolýzy pomocí výpočetních metod a NMR.

2018-2020/21

- Optimalizace VCD experimentů pro modelové fibrily, testování výpočetních metod.

2020-2022

- In vitro and in vivo testování navržených peptidových sekvencí a produktů proteolýzy jako modely protein-protein interakce a mezibuněčné komunikace.

2020-2022

- Použití RNAseq a ChipSeq metod k popisu transcriptomu a jeho regulace AMBN a ostatních AMBN závislých proteinů.

2021-2022

- Rozšíření spektroskopické detekce fibril ve fyziologických podmínkách, testování závislosti na okolním prostředí a teplotě.

1.1.1.1.5 PB1.5. Jiráček, Jahn, Konvalinka - Časový plán

2018-2022

- Design a syntéza sérií azidů a polyfunkčních nepřírodných derivátů α -amino, β -amino, β,γ -diamino, α,β,γ -triaminokyselin a oxidativně modifikovaných aminokyselin.
- Design a syntéza peptidů a peptidomimetik.
- Strukturní charakterizace derivátů aminokyselin a peptidomimetik.
- Design a validace vysokokapacitní metody pro testování knihoven.
- Design a syntéza kombinatoriálních knihoven založených na struktuře trifunkčních skeletů metodou syntézy na pevné fázi.

2019-2022

- Testování biologických vlastností látek.
- Strukturní charakterizace aktivních látek.
- Molekulární modelování neaktivnějších látek do struktury insulinu vázané na receptor.
- Optimalizace aktivních struktur.
- Mapování vazebných míst selektivně značených aktivních látek na receptorech.

1.1.1.1.6 PB1.6. Jiráček - Časový plán

2018-2019

- Studium interakce insulinu s endogenními ligandy in vitro a in silico.

2019-2022

- Studium schopností dostupných pankreatických permanentních buněčných linií, primárních linií a tkání produkovat, skladovat a sekretovat insulin
- Optimalizace experimentálních protokolů izolace nativních a neporušených sekrečních granulí.
- Analýza obsahu sekrečních granulí pomocí hmotnostní spektrometrie.

2020-2022

- Strukturní analýza insulinu v sekrečních granulích slinivky.

2021-2022

- Studium účinků vybraných ligandů na strukturu zásobních forem insulinu a na sekreci insulinu v modelových buněčných kulturách, primárních buňkách a tkáních.
- Chemická charakterizace nejzajímavějších ligandů a studium jejich efektů *in vitro* a *in vivo*.

1.1.1.1.7 PB1.7. Lazar - Časový plán

2018-2019/20

- Vývoj 2PPM na vysokokapacitní (high-throughput) techniku (optimalizace mikrostruktur, vývoj softwaru).
- Vývoj palicových FP.

2018-2022

- Vývoj 2PPM sond interakcí GPCRs s dalšími proteiny; interakcí inzulinového receptoru a receptoru IGF-1 s inzulinovými mimetiky
- Pozorování interakcí mezi receptory a dalšími proteiny/inzulinovými mimetiky
- Testování série sloučenin na jejich interakce s receptory

1.1.1.1.8 PB1.8. Cígler, Bouř - Časový plán

2018-2022

- Čištění a izolace reprezentativních vzorků ND.
- Povrchová modifikace ND.
- Preparativní příprava a izolace proteinů a jejich izotopicky značených variant.
- Syntéza modelových peptidů imitujících navržené vazebné domény.
- Získání spektrálních dat o interakci ND s proteiny.

2019-2022

- Zjištění struktury povrchu ND.
- Analýza pomocí více spektroskopických technik najednou, návrh teoretického modelu vazby.
- Návrh jednoduchých modelových molekul a peptidů pro vazbu na ND.
- Syntéza modelových peptidů.
- Monitoring konformačního chování během interakce s povrchem.
- *In vivo* testy nových sloučenin.

1.1.1.1.9 PB1.9. Nencka, Bouř - Časový plán

2018-2022

- Validace a strukturální charakterizace hitů fragmentů proti UEV doméně s použitím NMR spektroskopie.
- Vývoj vysokokapacitních vazebných testů pro testování fragmentů.
- Ověření hitů proti UEV doméně testem kompetice založeném na fluorescence a nově vyvinutým DIANA testem.

- Design a vývoj inhibitorů s vysokou afinitou pomocí dokovacích studií.
- Strukturální charakterizace komplexu 3A: ACBD3 GOLD doména z různých ss (+) RNA virů.

2020-2022

- Strukturální analýza připravených UEV ligandů.
- Optimalizace nových UEV vázajících molekul.
- Strukturální charakterizace HCV NS5A proteinu v komplexu s PI4K.
- Ověření účinnosti a toxicity připravených sloučenin buněčnými testy.
- Pokročilé studie molekulárního modelování potenciálních ligandů narušujících další PPI důležité pro interakce viru s hostitelem a posouzení nejslibnějších cílů.
- Příprava ligandů pro vybrané nejslibnější cíle.

1.1.1.1.10 PB1.10. Pichová, Weber, Cvačka - Časový plán

Interakce HBV core proteinu s buněčnými partnery

2018-2022

- Identifikace, ověřování a charakterizace hostitelských proteinů interagujících s HBc.
- Analýza komplexního vlivu buněčných proteinů interagujících s HBc na replikaci HBV.
- Charakterizace posttranslačních modifikací HBc proteinu a jejich vliv na jeho epigenetickou funkci v životním cyklu HBV.
- Identifikace interagujících domén HBc.

2021-2022

- Testování známých modulátorů HBc funkce a testování nových kandidátů v ÚOCHB knihovně nízkomolekulárních látek.
- Analýza a optimalizace látek s požadovaným účinkem.

Interakce HBx proteinu s buněčnými partnery

2018-2022

- Ověřování a charakterizace interakcí mezi HBx a hostitelskými proteiny (v tkáňových kulturách).
- Identifikace minimálních oblastí HBx požadovaných pro interakci.
- Optimalizace testovací procedury a počáteční testování ÚOCHB knihovny nízkomolekulárních látek.

2019-2022

- Určení strukturních základů studovaných interakcí pomocí NMR a rentgenové strukturní analýzy.
- Testování inhibitorů interakcí mezi HBx a hostitelskými proteiny – identifikace látek vhodných pro další modifikace a vývoj.

Zrání HBV precore proteinu a vliv buněčných partnerů na jeho lokalizaci

2018-2022

- Mapování buněčné dráhy HBe, hledání interagujících partnerů a ověření těchto interakcí.

2019-2022

- Sekvenace transkriptomu a analýza genové exprese.

2020-2022

- Strukturní charakterizace interakcí mezi precore proteinem a jednotlivými buněčnými partnery, molekulární modelování a návrh inhibitorů.

1.1.1.1.11 PB1.11. Konvalinka - Časový plán

2018 – 2019/20

- Finální optimalizace AlphaScreen eseje pro hromadné testování s použitím robotické linky navrhované v projektu.
- Optimalizace hitů identifikovaných během prvních testů.
- Hromadné testování (s použitím robotické linky navrhované v projektu) tzv. "IOCB knihovny" obsahující různé typy organických sloučenin připravených na ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

2020 – 2022

- Rentgenostrukturní a termodynamická analýza nejúčinnějších sloučenin identifikovaných pomocí AlphaScreen eseje.
- Antivirové testování nejúčinnějších sloučenin a analýza vývoje resistance proti nejaktivnější sloučenině pomocí sériového pasážování.
- Testování vlivu nejúčinnějších sloučenin na aktivitu virové polymerázy v buněčné eseji.
- Detailní termodynamická analýza vazby peptidů odvozených od N-koncové části PB1 podjednotky na C-koncovou část podjednotky PA. Určení minimální peptidové sekvence odpovědné za protein-proteinovou interakci.

1.1.1.1.12 PB2.1. Jungwirth, Jahn, Lazar, Bouř - Časový plán

2018

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vývoj zhrubených modelů pro hlavní strukturální motivy uvnitř glykokalyxu, tj. interakcí glycosaminoglycan–glycosaminoglycan a glycosaminoglycan–albumin.
- Vývoj hydrogelů obsahujících glycosaminoglycany jako in vitro modely glykokalyxu.
- Kalibrace esejí dvoufotonové polarizační mikroskopie ke zkoumání relevantních interakcí v glykokalyxu, jako je interakce mezi albuminem a glycosaminoglycanem.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Studium interakcí peptidů bohatých na arginin s modelovými plazmatickými membránami pomocí molekulové dynamiky s atomickým a zhrubným rozlišením.
- Syntéza a charakterizace foldamerů tvořených nepřírozanými aminokyselinami obsahujícími guanidiniové jednotky a další funkční skupiny.
- Syntéza fluorescenčních sond peptidických/proteinových struktur.

2019

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vývoj plně funkčního modelu vnitřní oblasti glykokalyxu použitelného k zhrubným molekulově dynamickým simulacím.
- Vývoj zhrubeného modelu pro hlavní strukturální motivy v oblasti glykokalyxu přilehlé k membráně, např. bílkovin CD44 a syndekanu..
- Charakterizace hydrogelového modelu glykokalyxu po přidání foldamerů specificky určených k narušení struktury glykokalyxu.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Studium interakcí peptidů bohatých na arginin s komplexními membránami, např. obsahujícími transmembránové proteiny.
- Provedení experimentů ROA a VCD na micelách a heterogenních systémech s cílem odhalit penetrační mechanismus peptidů pronikajících do buňky.
- Použití 2PPM k monitorování kationických peptidů pronikajících do buňky.

2020 -2022

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vyvinutí úplného zhrubeného modelu glykokalyxu obsahujícího jak vnitřní tak povrchovou oblast a zachycujícího jeho hlavní rysy.
- Použití vyvinutého modelu k prozkoumání potenciálních cílů, které budou schopny efektivně měnit strukturu glykokalyxu.
- Aplikace modelu glykokalyxu ke studiu jeho odezvy na systémy přivádějící molekuly léčiva.
- Rozšíření použití spektroskopických technik jako ROA a VCD na glykoproteinové systémy.
- Porovnání výpočetních předpovědí dynamiky bílkovin v heterogenním prostředí s experimentálními výsledky.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Použití peptidů bohatých na arginin a foldamerů jako nosiče molekul léčiva, které bude studováno jak *in silico* tak *in vitro*. Intenzivní využívání nově upravených spektroskopických technik.
- Vyvinutí výpočetního protokolu dovolujícího zahrnout vliv dynamických jevů a efekty okolí na vibrační molekulová spektra s použitím ke studiu detailů interakcí mezi membránami a bílkovinami.

1.1.1.1.13 PB2.2. Stříšovský - Časový plán

2018-2020

- Příprava rekombinantních proteinů iRhom, NTD, IRHD, a ADAM17
- Fágový display bicyklických peptidů k identifikaci ligandů/inhibitorů NTD, IRHD a ADAM17

2018-2022

- Strukturní charakterizace celodélkového iRhomu, NTD, a IRHD
- Identifikace interaktorů iRhomu pomocí BioID
- Buněčně biologická a strukturní charakterizace interaktorů iRhomu
- Vývoj stanovení inhibice interakcí iRhom-klientský protein
- Vyhledávací kampaň inhibitorů rhomboidů, validace nalezených sloučenin a jejich další vývoj
- Validace inhibitorů rhomboidů v buňkách a testování v myších

1.1.1.1.14 PB2.3. Bouřa, Nencka - Časový plán

2018-2022

- Příprava, exprese a purifikace rekombinantních nestrukturálních 3A, 3B (Vpg) a 3D^{pol} proteinů pocházejících z několika picornavirů z rodu Enterovirů a Kobuvirů.
- Purifikace lidské PI4KB, ACDC3 proteinu a fluorescentního PI4P biosenzoru (SidC PI4P vazebná doména fúzovaná k mCherry).
- Návrh a syntéza “super substrátů” fosfatidylinositol kinas a jejich vyhodnocení v enzymatické esaji. Krystalizace “super substrátů” s PI4K.
- Screening antivirální aktivity syntetizovaných sloučenin.
- Výběr vhodných proteinových kandidátů pro syntézu nových “super substrátových” analogů.

2019-2022

- Rozrušení formování membránových sítí *in vitro* s využitím biomimetického GUV systému.
- Analýza rekrutování picornavirových 3D^{pol} enzymů k membráně.
- Vytvoření nové generace inhibitorů cílících inositolovou část aktivního místa PI4K se znalostmi strukturních rysů získaných z X-ray krystalografie.

1.1.1.1.15 PB3.1. Hocek - Časový plán

2018-2022

- Design a syntéza nových modifikovaných (d)NTPs nesoucích různé funkční skupiny
- Systematická studie jejich polymerázové inkorporace do DNA či RNA
- Selektce of modifikovaných aptamerů proti cílovým proteinům

2019-2022

- Systematická studie inkorporací reaktivních skupin (specifických i nespecifických) do DNA nebo RNA a studium kovalentních cross-linků s DNA- nebo RNA-vazebnými proteiny
- Design a syntéza inherentně reaktivních aptamerů proti vybraným proteinům
- Testování cytostatické a protivirové aktivity vybraných aptamerů

1.1.1.1.16 PB3.2. Pichová, Curtis, Hocek - Časový harmonogram

2018- 2019/20

- Expres a purifikace divokého typu (wt) Cp149 a Cp Y132A mutantu.
- Optimalizace podmínek pro získání stabilních Cp dimerů pro testování.
- Klonování, exprese a purifikace zkrácených Cp v RNA vazebné doméně.
- Počáteční *in vitro* selekční experimenty.
- Optimalizace motivů randomní mutagenezí a *in vitro* selekce.
- Identifikace mutací zvyšujících aktivitu pomocí high-throughput sekvenování.
- Optimalizace motivů syntetickou rekombinací a *in vitro* selekce.
- Nabohacení a qPCR analýzy.

2020-2022

- Analýza vlivu optimalizovaných motivů na skládání HBV kapsid
- Sledování vlivu selektovaných motivů na replikaci HBV.

1.1.1.1.17 PB3.3. Birkuš, Nencka - Časový rozvrh

2018-2022

- Návrh a příprava fosfonátových/fosfinátových analogů CDN
- Biologické a biochemické vyhodnocení aktivity CDN
- Krystalografická analýza CDN se STING
- Počítačové modelování vazby mezi CDN a STING

2018-2019

- Expres rekombinantního STING, RNPP1 a bakteriální a eukaryotické cyklické dinukleotidsyntázy
- Vývoj buněčných esejí pro sledování aktivity CDN
- Enzymatická syntéza CDN z příslušných nukleosid trifosfátů

2019-2022

- Příprava proléčiv jednoho z CDN kandidátů na léčivo
- S9 průzkum stability CDN a jejich proléčiv, PK/PD kandidátů ve zvířecích modelech a měření anti-HBV aktivity ve “woodchuck” modelu
- Návrh a příprava nízkomolekulárních agonistů STING založená na virtuálním a fragmentovém screeningu.

1.1.1.1.18 PB3.4. Konvalinka - Časový plán

2018-2021

- Návrh a charakterizace membránově vázané T7 RNA polymerasy a produkce stabilních Tet-off regulovatelných klonů HEK293 buněk exprimujících upravenou T7 RNA polymerasu
- Návrh a charakterizace adaptorového proteinu
- Vývoj tzv. beněčné metodologie, zahrnující výše zmíněnou T7 RNA polymerasu a adaptorový protein, která umožní produkci funkcionalizovaných nanočástic na bázi exosomů nesoucích mRNA
- Návrh CRISPR/Cas9 nukleasy degradující cccDNA viru žloutenky typu B
- Vysoká produkce IVT-mRNA kódující danou CRISPR/Cas9
- Vývoj tzv. “syntetického” přístupu nanočástic obsahujících IVT-mRNA kódující CRISPR/Cas9 a její následné obalení liposomům podobnými nanočásticemi s cílovací adresou

2019-2022

- Testování biologické aktivity vyvinutých nanočástic ve tkáňových kulturách. Optimalizace nejúčinnější procedury přípravy nanočástic pro přenos CRISPR/Cas9 mRNA nebo DNA aptamerů

1.1.1.1.19 PB3.5. Vondrášek - Časový plán

- 2018-2019 Bioinformatická analýza strukturní a termodynamické databáze pro ETS/HIF-1 komplexy s DNA, molekulárně dynamické simulace a výpočet vazebných afinit.
- 2020-2021 Určení změny Gibbsovy volné energie pomocí ITC mikrokalořimetrie a určení vazebné konstanty pomocí MST metody a CVD spektroskopie.
- 2018-2021 ECD Spektroskopie a strukturní studie komplexů pomocí NMR.
- 2020-2022 Úplná chemická syntéza nízkomolekulárních peptidových ligandů a posun konformační rovnováhy.