

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

OPIS PROJEKTU

I. Všeobecné informácie o projekte	
Názov projektu	<i>Rekombinantné varianty vírusu kliešťovej encefalitídy ako nástroj pre štúdium virulencie a úloha neuroendokrinného systému kliešťa v prenose vírusu kliešťovej encefalitídy</i>
Kód projektu	09I01-03-V04-00089
Názov programu	Plán obnovy a odolnosti SR
Komponent	9. Efektívnejšie riadenie a posilnenie financovania výskumu, vývoja a inovácií Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky
Investícia	1. Podpora medzinárodnej spolupráce a zapájania sa do projektov Horizont Európa a Európsky inovačný a technologický inštitút (EIT – European Institute of Innovation and Technology)
Kód a názov výzvy	09I01-03-V04 – Matching grants ku zdrojom získaným v rámci programu Horizont 2020 a Horizont Európa
Schéma pomoci	Neuplatňuje sa
Anotácia projektu	<i>Vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV) je patogén prenášaný kliešťami spôsobujúci u ľudí v Európe a Ázii závažné neurologické ochorenie kliešťovú encefalitídu. Vírus cirkuluje v prírodných ohniskách medzi kliešťami a rezervoárovými hosťiteľmi, pričom vzťahy medzi vírusom a kliešťom sú stále neprebádané. Cieľom tohto projektu je nadviazať na MSCA-IF-EF-RI projekt žiadateľa a pokračovať vo výskume virulencných faktorov TBEV prostredníctvom rekombinantných variantov so zmutovanými oblasťami genómu, ktoré budú testované in vitro a in vivo. Ďalším cieľom projektu bude na základe doterajších výsledkov testovať nové reportérové TBEV varianty, ktoré uľahčia štúdium interakcií vírusu a kliešťa. Bunky neuroendokrinného systému v rôznych orgánoch kliešťa produkujú bioaktívne látky regulujúce fyziologické procesy vrátane imunitných reakcií. Tie by mohli byť modulované vírusom na zabezpečenie replikácie a prenosu. Cieľom bude preto identifikovať neuroendokrinné dráhy kliešťa zapojené do prenosu TBEV.</i>
II. Identifikácia projektového zámeru Programu Horizont 2020/Horizont Európa, ku ktorému je podporovaný projekt komplementárny	
Názov projektového zámeru:	
<i>Tick-Virus Interactions Shape persistence and Transmission OF Flavivirus pathogen in tick vector</i>	
Akronym projektového zámeru:	
TVISTOFF	
Typ výzvy/typ akcie:	
<i>MSCA Postdoctoral Fellowships – European Fellowships</i>	
Kód výzvy:	
<i>H2020-MSCA-IF-2020</i>	
Rola žiadateľa v projektovom zámere:	

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

<i>Koordinátor</i>	
Začiatok a koniec projektového zámeru:	
<i>Od 01/09/2021 do 31/08/2023</i>	
Výška príspevku účastníka (prijímateľa prostriedkov mechanizmu):	
<i>155 364,48 EUR</i>	
III. Financovanie projektu	
Forma financovania	zálohové platby, predfinancovanie, refundácia, kombinácia
IV. Harmonogram projektu	
Začiatok realizácie Projektu (MM/RRRR)	<i>09/2024</i>
Ukončenie vecnej realizácie Projektu (MM/RRRR)	<i>06/2026</i>
V. Pracovné balíky projektu	
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	<i>NV1 Vývoj mutantných variantov TBEV</i>
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	<i>M1</i>
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	<i>M12</i>
Miera zapojenia (človeko-mesiace)	<i>22</i>
Personálne náklady na PB [EUR]	<i>8 104,80</i>

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

Ostatné oprávnené priame náklady na PB [EUR] (bez DPH/s DPH)	13 990,00 / 16 788,00
Indikatívna výška nepriamych nákladov na PB¹ [EUR] (bez DPH/s DPH)	1 546,64 / 1 855,97
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	NV2 <i>Inovácia rekombinantných variantov TBEV nesúcich reportérovú značku</i>
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M11
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M22
Miera zapojenia (človeko-mesiace)	22
Personálne náklady na PB [EUR]	8 104,80
Ostatné oprávnené priame náklady na PB [EUR] (bez DPH/s DPH)	12 990,00 / 15 588,00
Indikatívna výška	1 476,64 € / 1 771,96

¹ Výška nepriamych nákladov nesmie presiahnuť 7 % z oprávnených priamych nákladov

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

nepriamych náklady na PB² [EUR] (bez DPH/s DPH)	
Poradové číslo a názov pracovného balíka (PB)	NV3 <i>Aktivita zložiek neuroendokrinného systému kliešťov počas infekcie TBEV</i>
Začiatok realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M1
Koniec realizácie PB (mesiac projektu – Mx)	M22
Miera zapojenia (človeko-mesiace)	22
Personálne náklady na PB [EUR]	8 104,80
Ostatné oprávnené priame náklady na PB [EUR] (bez DPH/s DPH)	12 990,00 / 15 588,00
Indikatívna výška nepriamych náklady na PB³ [EUR] (bez DPH/s DPH)	1 476,64 € / 1 771,96
VI. Cieľ projektu a výstupy	

² Výška nepriamych nákladov nesmie presiahnuť 7 % z oprávnených priamych nákladov

³ Výška nepriamych nákladov nesmie presiahnuť 7 % z oprávnených priamych nákladov

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

<p>Cieľ projektu</p>	<p><i>Predložený projekt svojim zameraním nadväzuje na pôvodný MSCA-IF projekt s cieľom pokračovať v štúdiu interakcií medzi vírusom kliešťovej encefalitídy (TBEV) a kliešťom, prenášačom vírusu, pomocou etablovaných metód reverznej genetiky vírusov ako aj in vitro a in vivo laboratórných modelov. Jednotlivé ciele sú zamerané na identifikáciu a štúdium virulencných faktorov TBEV dôležitých počas perzistencie a diseminácie v kliešťoch rodu Ixodes, a mapovanie a charakterizáciu komponentov neuroendokrinného a imunitného systému kliešťov a ich zapojenie do procesu infekcie kliešťov TBEV.</i></p> <p>Cieľ 1: Inovácia mutantných a reportérových variantov TBEV</p> <p><i>Využívanie mutantných variantov je jedným z esenciálnych prístupov pre štúdium funkcie virulencných faktorov vírusov. E proteín TBEV zohráva zásadnú úlohu pri prichytení viriónu na hostiteľskú bunku. Okrem toho, proteín E obsahuje N-glykozylačné miesto, ktoré je dôležité pre tvorbu zreých viriónov. Cieľom bude vytvoriť variant TBEV s mutáciami v predikovaných receptor-viažúcich doménach proteínu ako aj v N-glykozylačnom mieste pomocou reverznej genetiky. Nakoľko sa glykozylačné miesta nachádzajú okrem E proteínu aj v ďalších vírusových proteínoch, vytvorené budú aj iné N-glykozylačné mutantné varianty, ktoré budú testované na in vitro cicavčích a kliešťových bunkových kultúrach a in vivo v kliešťoch a laboratórných myšiach. Vírusy vo vzorkách budú analyzované pomocou vírus-špecifickej qPCR, vírus-špecifickej protilátky a plakovej titrácie vírusu.</i></p> <p><i>Vírusy stabilne exprimujúce reportérovú značku sú významným nástrojom vo výskume patogenézy a životného cyklu rôznych vírusov. Takýto nástroj prináša vyššiu efektivitu, špecificitu, citlivosť a zároveň ponúka aj robustnú platformu pre vývoj antivírusových látok. Na základe našich doterajších výsledkov, cieľom bude vyvinúť stabilnejšie reportérové varianty pre štúdium perzistencie a prenosu TBEV v kliešťoch. Testované budú krátke reportérové proteíny z rôzneho svetelného spektra (napr. near-infrared miRFP670nano) a luciferázový systém (napr. nLuc, krátka forma luciferázy). Rovnako bude optimalizovaná topológia pre vloženie reportérového génu do vírusového genómu. Podobne ako v prípade mutantných variantov TBEV, funkčnosť reportérových variantov bude overená pomocou in vitro bunkových kultúr a in vivo v kliešťoch a laboratórných myšiach a detekcia vírusu bude analyzovaná vírus-špecifickou qPCR, imunofluorescenciou, bioluminiscenciou a plakovou titráciou.</i></p> <p>Cieľ 2: Charakterizácia komponentov neuroendokrinného a imunitného systému kliešťov počas infekcie kliešťov TBEV</p> <p><i>Stále nie sú k dispozícii prakticky žiadne informácie o asociácii neuroendokrinného a imunitného systému kliešťov s infekciou TBEV. Hoci dáta z pôvodného projektu naznačujú na aktivizáciu GABA a sNPF signalizácie v skorých fázach cicania infikovaných kliešťov, je nutné túto hypotézu potvrdiť ďalšími experimentami. Okrem toho, kliešte disponujú širokým spektrom signálnych dráh regulovaných neuroendokrinnými bunkami v rôznych orgánoch. Je teda možné, že TBEV môže stimulovať ďalšie signálne dráhy kliešťa. Na základe týchto hypotéz bude cieľom najprv zmapovať komponenty neuroendokrinného a imunitného systému kliešťa experimentálne infikovaného TBEV nanoinjikovaním, pomocou proteomických prístupov (LC-MS/MS a UPLC). Identifikované neurotransmitery, neuropeptidy a imunogény budú ďalej testované v infikovaných kliešťoch pomocou qPCR a western blotom (disponujeme viacerými špecifickými protilátkami voči neuropeptidom a neurotransmitterom kliešťov).</i></p> <p><i>Keďže počas infekcie dochádza ku natívnej imunitnej odpovedi kliešťa na TBEV, o povahe ktorej podobne ako pri neurosekrécii dáta chýbajú, ďalšie úlohy budú smerovať k identifikácii indukovaných imunitných dráh a ich asociácii so zložkami neuroendokrinného systému kliešťov. Selektívna supresia génovej expresie identifikovaných neuropeptidov/neurotransmitterov alebo naopak imunogénov pomocou RNA interferencie na základe infekčných fenotypov osvetlí asociáciu týchto systémov. Potenciálne zmeny génovej expresie komponentov imunitných dráh kliešťov počas infekcie budú analyzované qPCR, ktoré sú v našom laboratóriu rutinne využívané. Tiež nadviažeme na pôvodný projekt o štúdiu GABAergického systému kliešťov počas infekcie TBEV a zameriame sa na optimalizáciu GABA receptor-špecifických RNAi pokusov a overíme zapojenie enzýmu glutamát dekarboxylázy pri produkcii GABA do procesu infekcie TBEV.</i></p>
-----------------------------	---

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

Výstupy projektu	Číslo výstupu	Výstup	Kód pracovného balíka	Typ	Prístup a šírenie	Navrhovaný spôsob preukázania	Dodanie výstupu (mesiac projektu)
	1	Prezentácia výsledkov na konferencii	NV1, NV3	Diseminácia výsledkov	P	Recenzované abstrakty	M13
2	Priebežná správa o dosiahnutých výsledkoch	NV1, PN3	Report	N	Písomná správa	M12	
3	Vedecký článok o mutantných variantoch	NV1	Publikácia	P	Open Access	M13	
4	Vedecký článok o reportéroých variantoch	NV2	Publikácia	P	Open Access	M22	
5	Vedecký článok o molekulách neuroendokrinného systému kliešťov počas infekcie TBEV	NV3	Publikácia	P	Open Access	M22	
6	Záverečná správa o dosiahnutých výsledkoch	NV1, NV3, NV2	Report	N	Písomná správa	M22	

Míľniky projektu	Číslo míľnika	Míľnik	Kód pracovného balíka (prípadne viacerých)	Navrhovaný spôsob overenia	Očakávaný čas dosiahnutia míľnika (mesiac projektu)
	M1.1	Vytvorenie mutantných variantov	NV1	M6	
M1.2	Analýza mutantných variantov	NV1	M12		
M2.1	Vytvorenie reportéroých variantov	NV2	M17		
M2.2	Analýza reportéroých variantov	NV2	M22		
M3.1	Identifikácia neznámych neurosekrečných molekúl v infikovaných kliešťoch	NV3	M6		
M3.2	Analýza expresie identifikovaných neurosekrečných molekúl počas vírusovej infekcie	NV3	M12		
M3.3	Úloha GABAergického systému kliešťov počas infekcie TBEV	NV3	M22		

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

VII. Celkový rozpočet projektu	
Celková výška oprávnených výdavkov	77 678,29 €
Výška prostriedkov mechanizmu	68 784,31 €
Výška prostriedkov mechanizmu – DPH	8 893,98 €

V prípade tab. III. Financovanie projektu – Forma financovania je potrebné ponechať všetky formy financovania uvedené vo výzve.

V tab. V Pracovné balíky projektu- je potrebné v prípade viacerých pracovných balíkov doplniť príslušné riadky.