

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2103 / 2021

Název projektu: Protein-protein interakce PDZ3 domény v syntetických fúzních proteinech

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Marie Hamšíková

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Marie Hamšíková

Studenti magisterského studia na PřF UHK: Mgr. Petra Bůbelová

Další výzkumní pracovníci: doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace:

Datum zahájení řešení projektu: 3. 3. 2021

Datum ukončení řešení projektu: 30.11.2022

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

Projekt navazoval na výsledky, které vznikly před zahájením projektu ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie, Akademie Věd České Republiky a rozvíjel téma fúzních proteinů (FP), které obsahují PDZ3 doménu z proteinu ZO-1 a jejich interakcí.

Výzkum se zabýval 3 typy dvoudoménových fúzní proteinů Tyto fúzní proteiny se lišili obsahem domén, jejich pořadím a typem linkeru, který se nachází mezi jednotlivými doménami.

První fáze projektu byla zaměřena na sledování a zjištění, ve které části buňky se jednotlivé FP proteiny exprimují v Caco-2 buněčné linii. K určení lokalizace proteinů bylo nutné transfekovat plasmidy nesoucí sekvence kódující jednotlivé FP s různými afinitními značkami (his-tag, FLAG-tag, GFP) do buněčné linie Caco-2. Nejprve byl zaveden a optimalizován postup transfekce.

Podmínky transfekce byly optimalizovány v rámci diplomové práce Mgr. Petry Bůbelové, kde jsou také shrnuty výsledky a vyhodnoceny nevhodnější podmínky pro transfekci (testovány tranfekční činidla, optimální doba exprese proteinu po transfekci, poměr činidla, počet buněk, množství plasmidu), které byly následně využity v další fázi projektu. Diplomová práce Bc. Petry Bůbelové byla obhájena v červnu 2022, čímž byl splněn jeden z deklarováných výstupů

Na optimalizaci transfekce bylo navázáno studiem lokalizace FP v Caco-2 buňkách. K tomu bylo využito imunofluorescenční mikroskopie, metod fixace, permeabilizace a imunofluorescenčního barvení pomocí protilátek. Na základě těchto výsledků byla exprese všech tří studovaných FP pozorována v cytosolu.

Dalším cílem projektu byla identifikace proteinů, které interagují s FP, což může vést k průkazu rozdílné specifity PDZ3 domény v FP. Pro identifikaci a studium možných interakčních partnerů FP byly zvoleny 2 přístupy.

První přístup pracoval s buněčnými lyzáty (různé stáří buněk – 72 h, 96 h, 168 h, 21 dní) Caco-2 buněk, které nebyly nijak ovlivněny a lyzáty byly následně využity pro pull down-assay, kde byly jednotlivé lyzáty inkubovány s jednotlivými FP vázanými na magnetických partikulích za přítomnosti prokřížovacího činidla BS3. Eluční frakce byly nejprve analyzovány pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy, poté také prostřednictvím hmotnostně spektrometrické (MS) analýzy, což umožnilo identifikaci interagujících proteinů pro jednotlivé FP.

Druhým přístupem byl zvolen pull down-assay, který zohledňoval fyziologické podmínky v buňkách. Tento přístup byl testován nad rámec vytyčených cílů projektu a vedl k bližšímu pochopení interakcí FP v buňkách, na které bude možné navázat při dalším studiu této problematiky. V rámci tohoto přístupu byly využity lyzáty Caco-2 buněk po transfekci, expresi FP a následném prokřížení vzniklých vazebných interakcí pro další typ pull-down assay. Lyzáty a vzniklé komplexy FP-protein byly následně vázány na magnetické partikule a eluovány. Eluční frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a MS.

Caco-2 lyzáty byly využity také pro precipitaci proteinu JamA pomocí specifické protilátky. Tento protein je v literatuře popsán interakčním partnerem PDZ3 domény ZO-1, která je součástí FP proteinů. I přes získání nativního Jam-A z buněčné linie se nepodařilo potvrdit popsanou interakci, což může ukazovat na očekávané změny specifity PDZ3 domény ve fúzních proteinech.

Získané výsledky byly prezentovány v rámci 2 konferencí, byly použity do připravované publikace a také jsou součástí úspěšně obhájené diplomové práce Mgr. Petry Bůbelové.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Předem stanovené cíle se podařilo splnit. Podle plánu byly nalezeny optimální podmínky pro transfekci plasmidů se sekvencemi dvoudoménových fúzních proteinů obsahující PDZ3 doménu z proteinu ZO-1 a jednotlivé proteiny byly exprimovány v Caco-2 buněčné linii. Následně byla studována lokalizace FP proteinů v buňce. U všech FP byla popsána lokalizace v cytosolu.

Pomocí pull-down assay za využití buněčných lyzáatů připravených za různých podmínek byly studovány potenciální interakční partneři zkoumaných FP proteinů.

Projekt byl rozšířen o pull down assay na úrovni buněčných linií, kde byl celý proces optimalizován, byly vybrány nejvhodnější podmínky a byly provedeny experimenty pro jednotlivé FP. Následná analýza vedla ke vytipování interakčních partnerů jednotlivých FP v buňkách a jejich dalšímu studiu.

Získané výsledky a znalosti v rámci tohoto projektu budou dalším stavebním kamenem pro studium uvedených FP a napomohou také v odhadu možného využití uvedených FP v modulaci vybraných fyziologických nebo patologických dějů.

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Publikace obsahující výsledky získaných v rámci projektu je stále v přípravné fázi, protože tato publikace vzniká ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AVČR a Středoevropským technologickým institutem. Jde o práci obecnějšího charakteru zahrnující široké spektrum doplňujících se výsledků a bude zcela jistě publikovaná v časopise patřící do Q1, s vysokou pravděpodobností i do D1, tudíž její příprava vyžaduje více času, který se navyšuje i díky komunikaci mezi třemi pracovišti. Dosud byly výsledky publikované pouze v rámci diplomové práce a ve formě posterů na dvou konferencích, jedné domácí a jedné zahraniční.

U výstupů Jimp a Jsc uveďte do závorky plánovaný a skutečný kvartil časopisu.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
<i>Jimp</i> (databáze WoS)	1	0	(Q1)
Jsc (databáze Scopus)	0	0	
B (recenzovaná odborná kniha)*	0	0	
C (kapitola v recenzované odborné knize)*	0	0	
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)	0	0	
P (patent)	0	0	
Počet obhájených dizertačních prací	0	0	
Počet obhájených diplomových prací	1	1	
Počet výsledků	2	1	

Ke zprávě přiložte:

- a. výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem.

Datum: 29.11.2022

Podpis odpovědného řešitele: