

Průběžná výroční 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: Bc. Petra Bůbelová

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

Celková částka přidělené dotace: 188700,-

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

Projekt navazoval na výsledky, které vznikly 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.

První oblastí výzkumu byla lokalizace 3 typů dvoudoménových fúzních proteinů v buněčné linii Caco-2, které se lišily obsahem domén, jejich pořadím a typem linkeru, který se nachází mezi jednotlivými doménami.

Pro určení jejich lokalizace v buňce bylo třeba plasmidy nesoucí sekvence kódující jednotlivé FP s různými afinitními značkami (his-tag, FLAG-tag, GFP) transfekovat do vybrané buněčné linie (Caco-2), aby bylo možné následně sledovat, v které části se dané proteiny v buňkách exprimují. Nejprve byl optimalizován postup transfekce. Bylo testováno několik různých transfekčních činidel a postupů při jejich použití (např. počet buněk, množství plasmidu, poměr činidla, doba exprese). Úspěšnost transfekce byla ověřována metodou PCR, western blottingem a také pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Jako nejvhodnější transfekční činidlo se ukázal být pro Caco-2 buňky JetOptimus a 48 hodinová doba exprese. Optimální poměr mezi množstvím plasmidu a transfekčním činidlem byl určen 1:1,5. Optimální konfluenci buněk Caco-2 se pro transfekci pohybovala mezi 60-80 %. Výsledky týkající se optimalizace transfekčního postupu budou součástí diplomové práce Bc. Petry Bůbelové, která je členkou řešitelského týmu projektu a bude obhájena v roce 2022.

Zavedení transfekčního postupu umožnilo následně studium lokalizace FP v Caco-2 buňkách. K tomu byla využita imunofluorescenční mikroskopie. Transfekované buňky byly fixovány, permeabilizovány a byly v nich detekovány příslušné FP proteiny přímo (GFP značka) nebo pomocí protilátek (his-tag, FLAG tag) společně s proteiny typickými pro určité subcelulární kompartmenty (např. aktin pro cytosol). Na základě těchto výsledků byla exprese všech tří studovaných FP pozorována v cytosolu.

Dále byl projekt zaměřen na identifikaci proteinů, které interagují s FP, což může vést k průkazu rozdílné specifity PDZ3 domény v FP. K tomuto účelu bylo třeba připravit buněčné lyzáty (různé stáří buněk – 72 h, 96 h, 168 h, 21 dní) s využitím 2 typů lyzáčnických pufrů (s inhibitory fosfatáz a bez inhibitorů fosfatáz). Takto připravené lyzáty byly následně využity pro pull-down assay, ve kterém 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 umožní identifikaci interagujících proteinů pro jednotlivé FP.

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

Caco-2 buňky po transfekci byly mimo studia subcelulární lokalizace FP využity i pro další typ pull-down assay, který by měl více zohledňovat fyziologické podmínky, protože interakce mezi FP a proteiny se vytvoří na úrovni buňky. Po transfekci byly buňky lyzovány a vzniklé komplexy FP-protein vázány na magnetické partikule a eluovány. Eluční frakce byly pilotně analyzovány pomocí SDS-PAGE. Postup pull-down assay s transfekovanými buněčnými liniemi bude v rámci dalších projektů dále optimalizován a vylepšen (použití prokřížovacích činidel, promytí).

Získané výsledky byly prezentovány v rámci jedné konference a budou použity do připravované publikace a také budou součástí jedné diplomové práce.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Vytyčené cíle projektu se podařilo splnit. Dvoudoménové fúzní proteiny obsahujících PDZ3 doménu z proteinu ZO-1 byly studovány tak, jak bylo v návrhu projektu vytyčeno. Bylo dosaženo jejich exprese v Caco-2 buněčné linii po tom co byl použit optimalizovaný transfekční postup připravenými plasmidy obsahující kódující sekvenci pro FP. To umožnilo studium jejich subcelulární lokalizace na úrovni buňky – pro všechny FP byla popsána lokalizace v cytosolu.

Pomocí pull-down assay za využití buněčných lyzátů připravených za různých podmínek byly studovány potenciální interakční partneři zkoumaných FP proteinů. A také byly provedeny pilotní experimenty pull-down assay na úrovni buněčných linií.

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.

Vzhledem k náročnosti prováděných experimentů byla celá doba projektu využita pro laboratorní experimenty, jak bylo plánováno už v návrhu projektu. Publikace výsledků získaných v rámci projektu je plánována na rok 2022. Výstup by měl být typu Jimp (Q1/Q2)

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Jimp (databáze WoS)	1	0	(Q1/Q2), plánováno na 2022
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	0	Plánováno, červen 2022
Počet výsledků	2	0	

* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

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

Materiálové náklady (nutno soutěžit v rámci DNS)	Stručné zdůvodnění nákupu	Přesná specifikace	Cena včetně DPH (Kč)

Spotřební náklady (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena včetně DPH (Kč)
Spotřební materiál	Protilátky (anti-histag, anti-FLAG tag, anti-aktin, fluorescenčně značné protilátky), spotřební materiál pro práci s buněčnou kulturou Caco-2 (kultivační media, FBS, trypsin), pull down assay (magenetické partikule), transfekční činidla, laboratorní plast, dezinfekce atd.	176986,31,-

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

Titul, jméno a příjmení zaměstnance	Ubytování (cca Kč)	Cestovné (cca Kč)	Stravné (cca Kč)	Celkem (Kč)	(Název, místo a datum konání)

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

Typ služby	Stručné zdůvodnění služby	Cena včetně DPH (Kč)

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

Titul, jméno a příjmení	Odměna (Kč)	Zdůvodnění	Celkem (Kč)

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

Titul, jméno a příjmení	Odvozy z odměn 34,52 % (Kč)	Celkem (Kč)

--	--	--

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

Stipendium studentů za práci na řešení projektu

Titul, jméno a příjmení studenta/ky	Číslo studenta/ky	Typ studia (Mgr./PhD.) / ročník studia	Obor studia	Bankovní spojení	Stipendium (Kč)
Bc. Petra Bůbelová	S20CH002 NP	nMgr./2	N0531A 13CZBO	228266796/0300	2 000,-

Cestovní stipendia studentů

Titul, jméno a příjmení studentky	Konferenční poplatek	Ubytování	Cestovné	Stravné	Celkem	Plánovaná konference (název, místo a datum konání)
Mgr. Marie Hamšíková	7307,-	1035,-	706,-	789,-	9 837,-	26. Biochemický sjezd; 29.08.-01.09.2021; České Budějovice

- g) **Další položky** (uveďte čísla dle IS Magion):
další položky a jejich stručné zdůvodnění

Výsledek čerpání finančních prostředků uveďte v jednotné přehledné tabulce 2.

Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč

Položka magionu	Položka	Plán Kč	Žádost o změnu	Skutečnost	Poznámka
Položka magionu	Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	Ne	0	
	Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	1	Ne	1	
501	Spotřeba materiálu DHIM	174 000	+ 2863	176986,31	Ušetřené finance z účasti na konferenci byly využity na spotřební materiál
512	Cestovné	0	Ne	0	

518	Ostatní služby	1000	-1000	0	Částka přesunuta do spotřebního materiálu
521	Mzdové náklady	0	Ne	0	
524	Zákonné pojištění	0	Ne	0	
549	Jiné ostatní náklady (stipendia)	13700	-1863	11837	Zbylá částka přesunuta do nákladů na spotřební materiál
545	Kurzové ztráty	0		745,33	
	Odúčováno na zak.1000/04450			-868,64	
	Celkové náklady	188700		188700	

Ke zprávě přiložte:

- a) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem,
- b) výsledovku z ekonomického informačního systému Magion – vyúčtování dotace.

Datum: 6.1.2022

Podpis odpovědného řešitele:



Výsledovka s očekávanými náklady
Pohyby za období 01 - 12 / 2021

Pracoviště:	****	Všechny vybrané analytiky		
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky		
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky		
Zakázka:	2103	SV Protein-protein interakce PDZ3		
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky		
Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU			
	Počáteční stav	0,00		
	ZAV/0411/00141/21	18.03.2021	4 769,82	0,00 materiál
	ZAV/0411/00145/21	19.03.2021	5 118,30	0,00 spotřební materiál
	ZAV/0411/00188/21	12.04.2021	24 347,62	0,00 materiál
	ZAV/0411/00196/21	13.04.2021	8 951,58	0,00 materiál
	ZAV/0411/00224/21	27.04.2021	3 136,32	0,00 materiál
	ZAV/0411/00247/21	07.05.2021	3 908,30	0,00 materiál agarosa broad range
	ZAV/0411/00310/21	02.06.2021	23 948,32	0,00 spotřební materiál Pulldown
	ZAV/0411/00370/21	28.06.2021	4 167,30	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00373/21	29.06.2021	5 462,60	0,00 chemikálie
	ZAV/0411/00401/21	14.07.2021	352,35	0,00 materiál - MEM eagle
	ZAV/0411/00483/21	27.08.2021	11 616,00	0,00 spotřební materiál - TubulinmAb 20 µl
	ZAV/0411/00507/21	02.09.2021	3 153,26	0,00 spotřební materiál - fluoromount
	ZAV/0411/00533/21	13.09.2021	4 257,99	0,00 materiál - el. kyvety
	ZAV/0411/00537/21	14.09.2021	2 674,10	0,00 materiál - essential
	ZAV/0411/00594/21	06.10.2021	11 616,00	0,00 materiál - Anti flag
	ZAV/0411/00660/21	01.11.2021	6 736,07	0,00 oligonukleotidy
	ZAV/0411/00672/21	02.11.2021	1 702,78	0,00 materiál-glutamine, brand
	ZAV/0411/00728/21	15.11.2021	661,39	0,00 materiál - Trypsin
	ZAV/0411/00855/21	16.12.2021	6 001,60	0,00 chemikálie dle 3004408456
	ZAV/0411/00861/21	17.12.2021	1 128,20	0,00 materiál - chemikálie
	ZAV/0411/00863/21	17.12.2021	8 604,92	0,00 chemikálie SYPRO® Orange Protein Gel StainCockta
	ZAV/0411/00864/21	17.12.2021	2 162,70	0,00 tlakové láhve - GOURMETKG + poplatky
	ZAV/0414/00031/21	20.04.2021	24 148,35	0,00 materiál
	ZAV/0414/00031/21	20.04.2021	5 071,20	0,00 DPH materiál
	ZAV/0414/00086/21	26.10.2021	2 718,34	0,00 materiál
	ZAV/0414/00086/21	26.10.2021	570,90	0,00 DPH materiál
501 099	Spotřeba materiálu ostatní DU	176 986,31	0,00	176 986,31
501	Spotřeba materiálu	176 986,31	0,00	176 986,31
545 001	Kurzové ztráty DU			
	Počáteční stav	0,00		
	ZAV/0414/00031/21	20.04.2021	670,22	0,00 0000000000 materiál
	ZAV/0414/00086/21	26.10.2021	75,11	0,00 0000000000 materiál
545 001	Kurzové ztráty DU	745,33	0,00	745,33
545	Kurzové ztráty	745,33	0,00	745,33
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU			
	Počáteční stav	0,00		
	BAN/0802/24415/21	22.09.2021	9 837,00	0,00 1 mimořádné stipendium

Výsledovka s očekávanými náklady
Pohyby za období 01 - 12 / 2021

Pracoviště:	****	Všechny vybrané analytiky		
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky		
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky		
Zakázka:	2103	SV Protein-protein interakce PDZ3		
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky		
Účet	Název účtu	Má dáti	Dal	Zůstatek
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. DU			
	Počáteční stav	0,00		
	BAN/0802/27030/21 26.10.2021	2 000,00	0,00	2 mimořádné stipendium
549 006	Jiné ostatní náklady mimoř.stip. D	11 837,00	0,00	11 837,00
549	Jiné ostatní náklady	11 837,00	0,00	11 837,00
	Náklady celkem	189 568,64	0,00	189 568,64
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický výzkum			
	Počáteční stav		0,00	
	MAN/0910/00007/21 15.02.2021	0,00	188 700,00	dotace MŠMT SVV
691 006	Provoz.dotace věda MŠMTspecif	0,00	188 700,00	188 700,00
691	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.sl	0,00	188 700,00	188 700,00
	Výnosy celkem	0,00	188 700,00	188 700,00
	Účetní hospodářský výsledek:			-868,64
	Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů:			-868,64

Účetní hospodářský výsledek za vybrané: -868,64

Hospodářský výsledek včetně očekávaných nákladů za vybrané: -868,64

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

Pracoviště: (04[45|90]*|0447*)

Činnost: (***|1210)

Fullcost:

Zakázka: 2103 (*|*)

Podzakázka:

Zahrnuty všechny předpokládané náklady