

Oponentský posudek na diplomovou práci Dominiky Lykové „Lokalizace a transport proteáz mezibuněčné hmoty“

Diplomová práce Dominiky Lykové v oboru Buněčná a vývojová biologie na PřF UK, se zabývá migrací nádorových buněk *in vitro* v 3D prostoru, který lépe mimikuje situaci v živých tkáních.

Hodnocení přínosu výsledků

Práce si vytyčuje šest cílů, které mají přispět k lepšímu pochopení pohybu nádorových buněk v trojrozměrných kolagenových sítích. Buňky pomocí svých výběžků tzv. invadopodií pronikají do extracelulární matrix, kterou zároveň degradují řadou proteáz. Dominika Lyková se soustředí na tři nejvýznamnější matrixové metaloproteázy MMP-2, -9 a -14. Vytváří značené formy těchto proteinů, jejichž expresi a aktivitu pak sleduje ve vybraných nádorových liniích. Zároveň testuje různé formy kolagenové 3D matrice, aby mohla optimálně pozorovat její degradaci vybranými MMP proteiny. Největší přínos práce vidím v úspěšné snaze pozorovat invazi v trojrozměrném prostředí tak, jak se děje *in vivo*.

Formální kvalita

Předložený text odpovídá formálnímu zadání pro diplomovou práci. Nicméně bych doporučila propojit seznam použitých materiálů (chemikálií) s postupy, aby tak vznikly ucelené protokoly, které by bylo možné následovat. Nalezla jsem pár drobných překlepů. Negativně hodnotím nesjednocení názvů proteinů v celém textu. Někdy nalézám vyložene český přepis např. aktin, E-kadherin a jindy anglický název jako cortactin, cofilin, claudin atd.

Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce a otázky k nim

V úvodu se dozvíme o přirozené migraci buněk versus té nádorové. V případě anglických termínů v českém textu doporučuji použít např. uvozovky, neboť „česko-anglické“ věty snižují kvalitu textu, byť mohou vést k lepšímu porozumění.

Literární přehled je logicky rozčleněn na části o buněčné migraci, o adhezivních strukturách buněk, o extracelulární matrix a její degradaci, o metaloproteázách (MMP) a též o nádorových strategiích. Téma je tak úplné a dává smysl. Text je čtivý. Jedinou připomínku zde mám k obrázkům respektive k jejich popiskům, které díky malému odlišení velikosti písma od zbylého textu jaksi splývají.

Část Materiál a Metody shrnuje veškeré laboratorní procedury, které si autorka textu osvojila. Jak zmiňuji výše, uvítala bych propojení obou kapitol. Každopádně si však cením a vyzdvihuji, že studentka zvládla základní molekulárně biologické postupy včetně klonování a práce s mikroskopy. Mám zde několik dotazů či komentářů a to: v materiálech uvádíte kompetentní bakterie DH5 α (str. 22), máte dokonce protokol na jejich přípravu (str. 43), ale pro vlastní transformaci použijete bakterie TOP10 (str. 45). Proč? Má to nějaký důvod? Také neuvádíte, kdy transformujete bakterie metodou teplotního šoku a kdy elektroporací.

Dále v kapitole o stanovení koncentrace proteinů Folinovou metodou by bylo dobré zmínit spíše princip, než jaké roztoky komerčního kitu mícháte, protože o jejich chemickém složení se nic nedozvíme.

V tabulce 13 je recept na výrobu polyakrylamidových gelů, kde není odlišeno, že separační a zaostřovací gel potřebují odlišný Tris/SDS pufr (str. 47).

Také mě zaujala metoda želatinové zymografie, kdy jsou proteázy v gelu po SDS-PAGE elektroforéze renaturovány a aktivovány, aby štěpily substrát přímo v gelu. **Proč je v aktivačním pufu CaCl₂? Aktivuje vápník MMP?**

Výsledky odrážejí stanovené cíle. Příprava všech konstruktů se zdařila. Po ligaci daných inzertů

do chtěných vektorů a transformaci bakterií autorka aplikuje metodu „Colony PCR“ na kontrolu konkrétních bakteriálních kolonií. Pod tímto názvem ji však v metodické kapitole nenajdeme, což může být matoucí. Též by bylo vhodné uvést schéma vektorů, do kterých se klonuje, protože kontrolní štěpení, která jsou ukázána, budou kontrolovatelná. Takto jim musíme pouze věřit. Zmíněné konstrukty se přepisují v buňkách (mikroskopie, blot) a zde přichází otázka na velikost proteinu MMP-14-GFP. **Proč se jeví na blotu výrazně větší než SNAP-MMP-14, když SNAPtag odpovídá zhruba 20kDa a GFPtag asi 30kDa?**

Ze zymografických výsledků vyplývá, že značená MMP-2 není v médiu aktivní. Není zde však kontrola, že byla tato MMP-2 opravdu sekretována vně transfekované buňky. **Lze detekovat jednotlivé sekretované MMP v mediu čistě na přítomnost byť by byly neaktivní?**

Při optimalizování přípravy 3D matrice autorka našla vhodné podmínky pro ideální zobrazení degradace ECM migrujícími buňkami, čehož jsou důkazem zdařilé mikroskopické obrázky (obr. 21). Dynamika intracelulárních váčků pozitivních na MMP-9-Clover2 ukazuje na jejich rychlý pohyb v oblasti invadopodií. **Jak byste s určitostí prokázala splnutí váčku s plazmatickou membránou a sekrecí MMP-9-Clover2?**

Systém SNAPtag, kdy můžeme pozorovat pouze extracelulární podíl proteinu MMP-14 v buňce a jeho následnou endocytózu je skvělým nástrojem. **Jak zajistíte, že se označí opravdu jen extracelulární protein?**

Poslední otázka nevychází přímo v souvislosti s Vaším textem. **Zajímalo by mě, jaké fosfoinositidy převažují v invadopodiích a také, jestli fyziologické podocyty v 3D podmínkách vypadají stejně jako nádorová invadopodia... jestli se v nich vyskytují stejné proteiny (MMP) ve stejné dynamice.**

V diskuzi se autorka probírá jednotlivými cíly a jak byly naplněny. V případě nepředvídaných výsledků hledá vysvětlení, nabízí možnosti řešení a plánuje budoucí způsoby zkoumání. Má plně vzhled do problematiky, ve které se dobře orientuje. To také odráží množství použité literatury.

Vzhledem k rozsahu experimentů, vzniklých dat a vypořádání se s nimi, nepochybuji o tom, že je Dominika Lyková oprávněna získat magisterský titul. Tento návrh na základě pročtení její diplomové práce jednoznačně podporuji.
