

Školitelský posudek - diplomová práce Dominiky Lykové

„Lokalizace a transport proteáz mezibuněčné hmoty“

Projekt, ze kterého vychází diplomová práce Dominiky Lykové, navazuje na starší výsledky naší laboratoře. Především šlo o strukturu invadopodií v třírozměrném komplexním prostředí. Popis invadopodií ve 3D byl ukázán na fixovaných buňkách, které byly kultivovány na bezbuněčné dermis. Cílem navazujícího projektu bylo ukázat nejenom strukturu, ale především dynamiku invadopodií ve 3D na živých buňkách. Dominika se ve svém dílčím projektu měla zaměřit na sledování transportu enzymů štěpících mezibuněčnou hmotu do invadopodií. Pro studium byly vybrány tři nejznámější enzymy: MT1-MMP (MMP14), MMP2 a MMP9.

Diplomová práce sledovala dvě paralelní linie. První část byl návrh, příprava a testování konstruktů. Druhá část projektu zahrnovala přípravu kolagenových gelů, na kterých jsme chtěli buňky pěstovat a pozorovat. Cílem bylo pozorovat invadopodia a značené enzymy v mikroskopech s vysokým detailem a rozlišením na živých buňkách. Při těchto podmínkách již bezbuněčná dermis není nejvhodnější materiál (především pro svou tloušťku). Proto jsme se rozhodli využít Fibrilární kolagen o vysoké hustotě a kolagenový gel značený fluorescenční barvou. Částečně tak jde o metodickou diplomovou práci.

Dominika pracovala paralelně na obou podprojektech. Podařilo se jí vytvořit funkční konstrukty MT1-MMP a MMP9 s různými značeními. Problém s konstruktem MMP2 je zřejmě už v návrhu sekvence. Jde tedy pravděpodobně o chybu školitele. Pro potvrzení, že MMP2 není funkční enzym, bylo potřeba provést několik různých experimentů. Potvrzení jsme získali v zimě tohoto roku a již nebyl čas, aby se vytvořil a otestoval nový konstrukt. MMP2 je stejně jako MMP9 sekretovaná proteáza a tudíž jsme měli funkční sekretovaný enzym pro následné experimenty. C-koncově značený MT1-MMP jsme dostali od spřátelené laboratoře. Dominika pak dle návrhu kolegy Čermáka vytvořila N-koncově značenou variantu, která byla za všech testovaných podmínek funkční.

Co se samotné diplomové práce týče, tak má role byla pouze poradní. Jednotlivé části, které jsme spolu diskutovali, byly po věcné i textové stránce na velmi dobré úrovni a až na drobnosti jsem nemusel psaní práce příliš ovlivňovat. Dominika začala s psaním s dostatečným předstihem a tak se vyvarovala i dodělávání na poslední chvíli.

Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

RNDr. Ondřej Tolde, Ph.D.

ve Vestci dne 5. 6. 2017