

Témata diplomových prací

Studium fyziologie stárnutí kůže

Konzultant: *Mgr. Iva Dolečková, Ph.D*

Stárnutí kůže je komplexní biologický proces, který vzniká jako důsledek kombinace různých vnitřních a vnějších faktorů. Mezi ty vnitřní patří převážně genetické předpoklady, buněčný metabolismus a hormony, naopak mezi nejvýznamnější vnější faktory se řadí UV záření a různé chemikálie, toxiny přítomné v okolním prostředí. Všechny tyto faktory přispívají ke kumulativním negativním změnám ve struktuře a fyziologii kůže, které vedou ke zhoršení její funkce i vzhledu. Důsledkem vnitřního stárnutí v místech krytých před sluncem je atrofovaná, suchá kůže s jemnými vráskami. Typickým znakem kůže vystavené slunečnímu záření jsou hluboké vrásky, ztráta elasticity vedoucí k povadlosti kůže a pigmentové skvrny. Na molekulární úrovni je stárnutí doprovázeno degradací složek extracelulární matrix, převážně kolagenu a glykosaminoglykanů, kumulací amorfní hmoty poškozených elastických vláken (solární elastóza), zpomalením proliferace buněk, redukcí deskvamace, sníženou produkcí bariérových lipidů, chronickým zánětem, poruchami procesu melanogeneze atd.

Cílem diplomové práce bude zkoumání některého z aspektů stárnutí kůže pomocí různých molekulárně-biologických metod jako např. kvantitativní RT-PCR, SDS-PAGE, western blotting, fluorescenční mikroskopie, imunohistochemie, stanovení viability buněk, stanovení aktivity vybraných enzymů atp. na primárních kožních buňkách odvozených z lidských dárců či na buněčných liniích, popř. na vzorcích lidské kůže z plastických operací nebo dobrovolně darované, či na modelu prasečí kůže.

Studium fyzikálních jevů při elektrostatickém zvlákňování

Konzultant: *Ing. Marek Pokorný, Ph.D.*

Student se podrobně seznámí s technologií elektrostatického zvlákňování a se všemi faktory ovlivňujícími tento proces. V teoretické části se zaměří na fyzikální jevy při laboratorní a průmyslové výrobě nanomateriálů. V experimentální části budou vybrané jevy studovány a prověřovány na přístrojích 4SPIN®.

Studium elektrostatických metod pro přesné strukturování povrchů

Konzultant: *Ing. Marek Pokorný, Ph.D.*

Objemový materiál, na jehož povrchu bude vytvořena pravidelná struktura v rozsahu nano až mikrometrů získává nové aplikační vlastnosti. U takových materiálů se dá dosáhnout velmi specifických parametrů a chování, například při mechanickém namáhání, při interakci s optickými paprsky, při biologických procesech apod. Přesnou a řízeně uspořádanou strukturu na povrchu objemových materiálů lze vytvářet několika principy, přičemž v této práci jsou využívány elektrostatické techniky v blízkém poli (tj. „near field electrospinning“, „electrohydrodynamic printing“ apod.). Studium elektrostatických metod klade za cíl vytvářet přesně strukturované povrchy v podobě pravidelných proužků a jiných obrazců dané PC programem. Diplomant se během svého výzkumu prakticky seznámí s nejrůznějšími počítačově řízenými elektromechanickými prvky, osvojí si práci s elektrostatickým napětím (do 5 kV) a využije moderních analytických postupů (optickou a elektronovou mikroskopii, příp. i mikroskopii atomárních sil apod.). Svě teoretické znalosti prohloubí v oborech fyzikální chemie, termodynamika, hydrodynamika, elektrostatika a obrazová analýza.

Regulace produkce kyseliny hyaluronové u G+ bakterie Streptococcus zooepidemicus globálním dvousložkovým regulačním systémem covRS

Konzultant: *Mgr. Stanislav Pepeliaev, Ph.D.*

Regulační systém covRS skládající se z membránově vázaného receptoru a cytoplazmatického regulátoru je důležitý bakteriální mechanismus pro reakce na externí podněty. U streptokoků skupiny A tento systém řídí mimo jiné také expresi mnoha faktorů virulence (kapsule, cystein proteáza, streptokináza, streptolyzin S a streptodornáza). Inaktivace covRS systému (globálně), respektive jeho cílové regulační sekvence u operonu pro syntézu hyaluronové kyseliny, povede s vysokou pravděpodobností ke zvýšené tvorbě hyaluronové kapsule streptokoka

Práce bude obnášet přípravu kmene *S. zooepidemicus* s delecí covRS a také s delecí cílové regulační DNA pro covRS metodou cílené mutagenese, porovnání produkce hyaluronové kyseliny u obou delečních kmenů vůči původnímu kmeni. Dále bude sledována změna vlastností delečních kmenů (změna vitality, specifické růstové rychlosti, teplotního optima atd.).

Porovnání vlivu promotorů na expresi cílového proteinu v buňkách *Pichia pastoris*

Konzultant: *Mgr. Stanislav Pepeliaev, Ph.D.*

V naší laboratoři úspěšně produkujeme několik enzymů v rekombinantních kmenech *P. pastoris*. Kromě ověřených konstitutivních promotorů, které používáme k expresi těchto enzymů, je někdy vhodné použít inducibilní promotory. Jedná se o případy, kdy je exprimovaný protein velkou zátěží pro metabolismus hostitelské buňky a proto se exprese spouští až po dopěstování většího množství buněk. Aktuálně máme k dispozici AOX promotor, který však vyžaduje kultivaci na metanolu. Metanol je při vyšších koncentracích toxický také pro *P. pastoris*, proto je taková kultivace komplikovaná.

Cílem práce bude příprava rekombinantních kmenů *P. pastoris* nesoucích v genomu enzym pod různými promotory. Bude se jednat o enzym u nás již úspěšně exprimovaný pod GAP promotorem. Po vytipování aktivních klonů na základě kultivací v erlenmeyerových baňkách budou vybrané kmeny kultivované v maloobjemových fermentorech. Na závěr bude vyhodnoceno, který promotor je pro expresi daného enzymu nejvhodnější.

Syntéza a funkční in vitro screening adhezivních peptidů

Konzultantky: *Ing. Romana Šuláková, Ph.D. (syntéza peptidů), Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D. (biologické testování)*

Adhezivní peptidy založené na přirozených složkách extracelulárních matrix či buněčných membrán jsou významnou součástí scaffoldů pro tkáňové inženýrství a hrají důležitou roli při studiu buněčné adheze v in vitro výzkumu. Testování většího množství těchto peptidů a tedy též jejich vzájemné porovnání je problematické, především kvůli nutnosti jejich ukotvení na pevný povrch v prostředí umožňující kultivaci buněk.

V rámci této diplomové práce si student připraví sérii peptidů s předpokládanou adhezivní funkcí pro eukaryotické buňky (výběr vhodných sekvencí bude založen na literární rešerši). Po ukotvení těchto peptidů na vhodný (pro buňky neadhezivní) nosič bude provedena série testů s různými buněčnými typy a bude porovnána míra adheze buněk na modifikované nosiče. V případě pozitivních výsledků může být biologický screening doplněn i o testování viability buněk a dalších parametrů (např. diferenciací).

Analýza vlivu způsobu kultivace na genovou expresi pomocí dekonvoluce dat z genové microarraye

Konzultant: *Mgr. Vojtěch Pavlík*

Školitel: odborník v oboru matematické biologie

Jednoduché 2D monokultury stále představují hlavní in vitro model využívaný v buněčné a molekulární biologii. Pro lepší modelování situace v tkáni a celém organismu je ovšem nutné modifikovat způsob kultivace a to ve dvou směrech – 3D kultivace a kokultivace několika typů buněk. Především u směsných kultivací je však náročné sledovat změny na úrovni genové exprese v jednotlivých buněčných typech, protože musí dojít nejprve k separaci buněk a následné analýze jednotlivých separovaných populací. Alternativou se jeví tzv. dekonvoluce dat získaných z genové microarraye kompletního směsného vzorku. Hlavním úkolem diplomanta by bylo vytvořit model minimálně dvou odlišných typů buněk (fibroblasty, nádorové buňky, imunitní buňky či kmenové buňky) kultivovaných samostatně či v kokultuře ve 2D a 3D podmínkách. Následně analyzovat genovou expresi takto kultivovaných buněk pomocí genové microarraye s následnou aplikací dekonvoluce v softwarovém prostředí R (podmínkou je znalost práce s R softwarem). Dostatečné rozlišení expresních profilů jednotlivých kokultivovaných buněčných typů bude kontrolováno pomocí magnetická separace buněk před samotnou analýzou. Získané výsledky ukáží další možnosti aplikace metody dekonvoluce, ale zároveň by mohly přinést zajímavé informace o vlivu metody kultivace na expresi genů.

Charakterizace hyaluronidázy z houby *Macrolepiota* sp.

Konzultant: *Dzianis Smirnou, Ph.D.*

Z nedávných zjištění vyplývá, že kromě obecně známých producentů hyaluronidáz (bakterie, pijavice, obratlovci) se enzymy štěpící glykosidické vazby hyaluronanu (HA) nacházejí také v některých druzích vláknitých hub. Houbové hyaluronidázy mají unikátní vlastnosti, které z nich dělají zajímavé nástroje pro přípravu biologicky aktivních oligomerů HA.

Cílem práce bude izolace HA-štěpícího enzymu ze submerzní kultury vyšší houby rodu *Macrolepiota* a jeho charakterizace (identifikace mechanismu štěpení HA, stanovení optimálních podmínek, teplotní stability, substrátové specifity enzymu apod.).

Degradace kyseliny hyaluronové v kůži

Konzultant: *Mgr. Petra Žádníková, Ph.D.*

Kyselina hyaluronová (HA) je lineární, vysokomolekulární polysacharid, jež je jednou z hlavních složek extracelulární matrix. Hojně se vyskytuje ve tkáních obratlovců, kde zodpovídá za funkční a strukturní integritu buněk a orgánů. HA a její fragmenty jsou zodpovědné za celou řadu fyziologických i patologických procesů. Přestože velké množství orgánů obsahuje vysoké koncentrace HA, v kůži se vyskytuje přibližně polovina celkové tělesné HA. HA má velmi dynamický obrát a její poločas rozpadu v kůži je méně než jeden den. Nicméně přesný mechanismus, kterým je kyselina hyaluronová v kůži odbourávána není doposud známý.

Hlavním úkolem diplomanta by bylo zjistit v jakých kožních buňkách se nachází transkripty enzymů případně jiných proteinů podílejících se na degradaci kožní HA za pomoci metody kvantitativní real-time PCR. Dále zjistit přítomnost zmíněných enzymů/proteinů využitím metod, jež jsou založeny na reakci antigenu a specifické protilátky - Western Blot, imunocytochemie, imunocytofluorescence. V případě potvrzení přítomnosti enzymů degradujících HA předchozími metodami by se následně analyzovala aktivita těchto enzymů v jednotlivých kožních buňkách (fibroblasty, keratinocyty) za použití metod kolorimetrie, turbidimetrie a zymografie. Posledním úkolem by bylo objasnit, jakým mechanismem vstupuje HA do kožních buněk (fibroblasty, keratinocyty) za použití nízkomolekulární fluorescenčně značené HA a konfokálního mikroskopu.

Získané poznatky přispějí k objevení nových vědomostí v oblasti základní biologie. Objasnění degradace HA v kůži by mohlo nabídnout nové farmakologické cíle, které by například konfrontovali věkově závislou depolymeraci HA v kůži.

Studium prostupu nosičových systémů do nádorových sféroidů

Konzultant: *Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D.*

Dvojměrné (2D) buněčné kultivace jsou standardní procedurou využívanou pro určení efektivity nových farmaceutických látek během preklinického testování. Tyto modely však nedostatečně napodobují přirozené mikroprostředí v tkáních, která jsou typická svou trojrozměrnou strukturou, mezibuněčnými interakcemi a interakcemi buněk s extracelulární matrix. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny 3D rakovinné modely, jakými jsou např. sféroidy, které lépe odpovídají strukturální organizaci přítomné v pevných nádorech. V těchto 3D modelech lze vytvořit gradienty pro výživu, výměnu

plynů i gradienty pH, které jsou tak typické pro nádorové tkáně. Stejně tak se sféroidy vyznačují vyšší rezistencí k terapeutikům díky jejich omezené penetraci do středu tkáně. Hlavním úkolem diplomanta by bylo optimalizovat přípravu sféroidů z jedné, popř. dvou buněčných linií (nádorové buňky a fibroblasty). Následně by tyto sféroidy byly využity pro studium přenosu modelových fluorescenčních látek, popř. známých rakovinových terapeutik, pomocí nosičových systémů do jejich středu. Dále by byla sledována indukce buněčné smrti v závislosti na typu použitého nosiče a zároveň specifita nosičů pro jednotlivé buněčné linie. Analýza by byla prováděna pomocí histocytologických řezů a konfokální mikroskopie.