



PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA Univerzita Karlova

V Praze dne 24.5. 2019

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Fryntové „Transdiferenciace somatických buněk do hepatocytů a klinicky relevantní editace genu Tight junction proteinu 2“

Předložená diplomová práce je sepsána na 118 stranách a hlavním cílem byla přímá transdiferenciace myších embryonálních fibroblastů do hepatocytů vnesením DNA vektorů kódujících geny *Hnf4 α* a *Foxa1*. Sekundárním cílem, kterého však nebylo dosaženo, bylo zavedení bodové substituční mutace nt2732A>G (p.Tyr911Cys) do genu *Tjp2* v rámci připravených transdiferencovaných hepatocytů iHep. Tato mutace je spojována s rozvojem jaterního onemocnění progresivní familiární intrahepatální cholestázy 4. typu (PFIC4). V případě splnění obou cílů měly takto upravené hepatocyty sloužit jako model pro testování léčebných postupů pro tuto chorobu.

Diplomová práce je standardně členěna. Úvodní kapitola se zabývá fenoménem indukované pluripotence. Tato část je podle mého názoru velmi zavádějící a plná faktických chyb, větných neobratností a překlepů. Například na straně 11, cituji: "Cílená úprava genomu buňky slouží jako patologický model, u které je tak možné pozorovat změny, nastávající v důsledku rozvoje onemocnění". Další odstavec na téže straně dokonce obsahuje odborná faux pas, cituji včetně překlepů: "Embryonální kmenové buňky (ESC) představují buňky zárodku ve stádiu blastocysty (Evans, M. J. a M. H. Kaufman, 1981; Thomson JA et al., 1998), která se v průběhu gastrulace přeměňuje na vývojové stádium gastruly (Tam, P.P.L., & Zhou, S.X., 1996). Klíčovou vlastností těchto buněk je tzv. pluripotence, což je schopnost, která jim umožňuje diferencovat se na jakýkoli typ fetálních i dospělých buněk. Diferenciace v konkrétní buněčný typ poté spočívá v přítomnosti extraembryonální tkáně a konzervativnosti regulačních sítí, složených z mnoha transkripčních faktorů a signalizačních kaskád." Zaprvé, buňky blastocysty nepředstavují ESC nýbrž jsou z nich pouze odvozeny. Za druhé pluripotentní buňky nejsou schopné se diferencovat v trofoblast, tudíž není pravdivé tvrzení, že jsou schopné se změnit v jakýkoliv typ tkáně a za třetí diferenciace buněk na konkrétní buněčný typ určitě není nezbytně závislá na přítomnosti extraembryonální tkáně. Na straně 12 je věta, cituji: "Všem výše vyjmenovaným buňkám jsou nadřazeny buňky



PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA Univerzita Karlova

totipotenti, které obsahují kompletní genetickou informaci a mohou od nich být odvozeny všechny buněčné typy v organismu (Honecker, F., et al., 2006).“ Znamená to tedy, že buňky pluripotenti či dokonce unipotenti neobsahují veškerou genetickou informaci? Na straně 13 pak studentka uvádí, že v průběhu 60. let byla vyvinuta spousta technologií zabývajících se indukovanou pluripotencí. Podle mého názoru zaměřuje experimenty s přenosem somatického jádra do enukleovaného oocyty s přípravou iPSC. Další část úvodu je již o poznání fakticky správnější a čtenář má až pocit, jako by se jednalo o jiného autora nebo byla sepsána s daleko větší rozvahou. Jsou zde popsány způsoby transdiferenciace buněk, jednotlivé buněčné typy jaterní tkáně a taktéž moderní genom editovací techniky jako například ZFN, TALEN či CRISPR/Cas9. Dle mého názoru je tato kapitola příliš rozsáhlá a bohatě by stačil popis posledně jmenované metody. Závěr teoretického úvodu je věnován progresivní familiární intrahepatální cholestáze 4. typu, onemocnění, které bylo předmětem přípravy relevantního buněčného modelu.

Cíle diplomové práce jsou jasně stanoveny. Kapitola materiál a metody zevrubně popisuje jak přípravu veškerých reagensů a roztoků, tak hlavně metodických postupů. V rámci výsledků se studentce podařilo transfekovat myši embryonální fibroblasty vektory nesoucími geny *Hnf4 α* a *Foxa1* a připravit dvě buněčné kultury transdiferencovaných hepatocytů iHep1A a iHep1B, jejichž diferenciační status posléze prokázala pomocí qPCR a imunocytochemicky s využitím protilátek namířených proti specifickým markerům jak časných, tak maturovaných hepatocytů. Jak jsem již avizoval v úvodu mého posudku, druhý cíl, zavedení bodové substituční mutace nt2732A>G (p.Tyr911Cys) do genu *Tjp2* u transdiferencovaných hepatocytů splněn nebyl. Diskuze je poměrně rozsáhlá, místy mi však chybí skutečné srovnání získaných dat s ostatními publikovanými články a jedná se spíše o opakování a shrnutí výsledků.

Asi největší výtka mám k formální stránce diplomové práce. Snad největším nešvarem je enormní množství překlepů či špatně přeložených výrazů z angličtiny. Bohužel překlepu se nevyhnul ani název práce, “Transdiferenciace somatických buněk do hepatocytů a klinicky **relevantní** editace genu Tight junction proteinu 2. Z dalších vybírám následující:

str. 29 - ...jsou vkládány do jamek DNA (myšleny jsou asi malý či velký žlábek)

str. 48 - Eppendorf byly inkubovány....

str.52 - proděravění membrán - lepší termín je permeabilizace



PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA Univerzita Karlova

str. 68, legenda k tabulce 14 - ...v různých transdiferenciačních stáridích

str. 82 věta: "Konkrétně u albuminu docházelo k výraznému nárůstu až po dvoutýdenní kultivaci iHep, protože se jedná o protein, syntetizovaný zralými hepatocyty, což by se shodovalo s primárními hepatocyty." podle mého názoru nedává vůbec smysl.

podobně na str. 91 věta: "Ačkoli konkrétně se jedná o pět izoform, protože existují 3 typy A - A1, A2, A3, a 2 typy C - C1, C2 (viz Teoretický úvod - Kapitola 6.2)." je taktéž zvláštně formulována.

str. 92 věta: "Ty jsou potom rozpoznávány proteazomy, které proteolýzou štěpí na peptidové vazby v proteinu."

Bohužel ani obrázky nejsou v odpovídající kvalitě a co je více důležité, pouze výjimečně jsou citovány v textu. Na tomto místě bych se rád zeptal, zda studentka připravovala obrázky sama, nebo je získala od jiných kolegů a převáděla je z jednoho formátu do druhého se ztrátou rozlišení.

Na závěr mého posudku bych rád shrnul, že Lucie Fryntová dle mého názoru splnila, i když částečně, cíle diplomové práce. Na druhou stranu odbytá formální stránka, včetně některých zavádějících či dokonce nepravdivých tvrzení mne nutí tuto práci hodnotit stupněm dobře. Přesto práci doporučuji k přijetí jako práci diplomovou a jako podklad pro udělení titulu Mgr.

K práci mám několik otázek:

- 1) Na str. 50 mi u tabulky 8 chybí podrobnější popis. Mohla byste jí vysvětlit?
- 2) Jak konkrétně očekáváte, že u pacientů s různými jaterními chorobami bude docházet ke snížení počtu biopsií po zavedení modelu transdiferencovaných hepatocytů? Není právě biopsie potřeba pro diagnózu, na základě které by pak vznikl příslušný in vitro model?
- 3) Na straně 81 píšete: "Přeměna myších či lidských fibroblastů na hepatocyty může mít výsadní postavení jako potenciální nástroj pro **regenerativní** medicínu nebo pro léčbu jaterních onemocnění a hepatocelulárních karcinomů." Jak konkrétně?
- 4) Jaké jsou výhody a nevýhody použití tzv. epizómů v rámci transdiferenciačních experimentů?



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

- 5) Na straně 85 píšete: "Lidské fibroblasty jsou v tomto případě transdukovány retroviry, nesoucími OSMK faktory, a po 6-10-ti denní kultivaci se objevují první iPSC s karyotypem a genovou expresí, odpovídající pluripotentním kmenovým buňkám." Jak se liší karyotyp fibroblastu od karyotypu pluripotentní kmenové buňky?

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Krylov".

doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.