



ROBERT ČERNÝ, PH.D.
robert.cerny@natur.cuni.cz

Phone: 00420 22 195 1850
Fax: 00420 22 195 1841

Oponentský posudek na DP Heleny Fuxové: Studium migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk u *X. tropicalis*

Cílem této DP byla studie migračního potenciálu testikulárních kmenových buněk *X. tropicalis* pomocí jejich mikroinjikace do stadia blastuly, či do peritonea a coelomové dutiny pulců, při využití již dříve založené kultury těchto buněk, odvozené z varlat mladých samců. Autorka se také pokoušela o vytvoření transgenních jedinců celotělně exprimující RFP.

DP má klasické členění, poměrně rozsáhlý úvod resp. literární přehled následuje dlouhá a opravdu detailní metodická kapitola, kde autorka představuje i partikularity typu přesného složení roztoků a reagentů, což je sice dle mého trochu zbytečné, avšak ukazuje to na technické náležitosti, na které se autorka opravdu zaměřovala a kterým dobře rozumí. V rámci výsledků je presentován plazmid, který byl autorkou vytvořen a použit pro vnesení genu „Katuschka RFP“ do recipientních jedinců (celkem 7 transgenezí), přičemž však přežívání embryí bylo nízké a autorce se nepodařilo dochovat žádnou žábu až do pohlavní dospělosti. V této souvislosti autorka zmiňuje, že školiteli se nakonec toto povedlo – v čem byl tedy zakopán pes s nízkou viabilitou embryí? A rámci této kapitoly jsou také presentovány obrázky ukazující polo- či celotělovou expresi RFP, které jsou však neostře, spíše nepěkné a mohly by být řádově menší. Drobný dotaz: proč autorka v prvním případě mluví o injikaci, ale v druhém o transplantaci, když zřejmě používala stále stejný postup i mikroinjektor?

V další, větší části Výsledků autorka popisuje transplantace vitálně značených, testikulárních kmenových buněk do peritonea pulců, aby následně sledovala jejich migraci tělem. Poslední experiment sestával z podobné transplantace, ale do blastocoelu ve stadiu blastuly. V obou případech drápatky dobře přežily, autorka experimentálně testovala optimální množství buněk na transplantaci, získala pěkná a kvantitativní data a hlavně tedy prokázala široký migrační potenciál těchto buněk, z něhož dochází k finálnímu výsledku o příspěvku jejich TSC do struktur všech tří zárodečných listů.

V poslední části Výsledků se autorka snažila vytvořit histologické preparáty, na nichž by bylo lze ověřit, kam přesně buňky jejího zájmu doputovaly a nechtěně tak odhaluje slabinu své práce. Zatímco totiž v předchozí kapitole se suverénně mluvilo o „oblasti“ hlavy, střeva, „oblasti“ pronefros či „oblasti“ srdce, kam analyzované buňky namigrovaly a toto bylo vykazováno na wholamount fotografiích, dochází zde k lámání chleba a jde do tuhého. Jednak jsou tyto „oblasti“ nedobře definované (co to je oblast hlavy? kam tedy buňky přispívají? do

kterých tkání a struktur?!?), a jednak se tedy ukazuje, že přestože autorka tvrdí, že pracuje na modelovém, dokonce „optimálním“ druhu organismu, nedokáže své jedince podrobit analýze na řezech a tím svá předchozí tvrzení verifikovat. Když selhala klasická parafínová technika i jednoduché zalévání pro kryostat, autorka radostně konstatuje, že přes sacharózu a hlavně želatinu nakonec získala řezy, na kterých je „zachována většina struktur embrya“. Odmyslím-li to, že se jedná o pulce a ne embrya, na presentovaném řezu (obr. 23) nejde rozeznat téměř nic (anebo mi autorka ukáže hranice kupř. mezi srdcem, střevem a vnějšími žábry?) leč hlavně, vůbec jediný presentovaný obrázek ukazující fluorescenční data je z řezu, jehož čitelnost je minimálně sporná (obr. 22).

Tímto nechci autorčina data nijak shazovat; práce je to bezrozporně pěkná a bylo radostí ji číst a poučit se, nicméně by bylo vhodné detailněji rozklíčovat místa příspěvku analyzovaných buněk a opravdu tak prokázat, že tyto buňky – stejně jako u ryb – po transplantaci do blastul nedokáží obsadit genitální rýhy. Tento výsledek je poměrně zásadní, leč z presentovaných dat jej nedokáží podpořit. Autorka ve výsledcích uvádí, že po transplantaci do starších pulců našla v genitální rýze kolem 8% buněk – je tohle odvozeno z řezů či z wholemount preparátů? Má autorka představu, proč u ryb a obojživelníků se toto nedaří v ranějších stadiích?

Práce je jinak napsaná pěkným jazykem, četla se mi opravdu dobře (až na to, že je tisknutá jednostranně, sic!), a byla mi radostným přínosem. Až na pár minuciózností jsem si nevšiml žádných grafických, jazykových či výraznějších stylistických pochybení a hlavně, autorka především odvedla kus práce, vytyčené cíle týkající se rozklíčování migračního potenciálu splnila a mnoho zajímavého si sama ozkoušela.

Práce končí shrnutím vlastních dat a hypotéz a vyhlíží k dalšímu sběru dat, které by poměry nastíněné v této DP mohly dále rozvést a tak se již teď dozajista můžeme těšit na další pokračování této úspěšné ságy – v konci konců nikdy nevíme, kdy se nám podobné kmenové buňky budou hodit, že. S předloženou DP jsem spokojen a mohu ji radostně doporučit k obhajobě.

V Praze, 5. září 2013

