



## Školitelský posudek na diplomovou práci

Bc. Markéta Vegrichová (2014) Příprava transgenní kultury testikulárních kmenových buněk *Xenopus tropicalis*.

---

Markéta Vegrichová svou diplomovou práci vypracovala v Laboratoři vývojové biologie na Katedře buněčné biologie PřF UK Praha. Naší laboratoři se podařilo založit smíšenou buněčnou kulturu odvozenou z varlat *Xenopus tropicalis*. Tato kultura se skládá z podkladové vrstvy pre-Sertoliho buněk a na ní rostoucích testikulárních kmenových buněk (TSC). Diplomantka měla několik úkolů, ale jejím hlavním cílem byla optimalizace transfekce testikulárních kmenových buněk a příprava trvalé transgenní linie, která je nezbytná pro výzkum diferenciaci TSC probíhající v naší laboratoři.

Prvním úkolem diplomantky byla optimalizace podmínek pro kultivaci testikulárních kmenových buněk. Ukázalo se, že po přidání myšího LIF do výživově bohatého kultivačního média dochází ke zvýšení proliferační aktivity obou typů buněk a zejména k výrazně rychlejšímu formování kolonií TSC v kultuře. Toto zjištění významně ulehčilo a zrychlilo práci s kulturou, aniž by při dlouhodobé kultivaci docházelo ke spontánní diferenciaci TSC či k senescenci podkladové vrstvy buněk.

Druhým úkolem Markéty byla analýza exprese buněk kultury zaměřená na geny typické pro pluripotentní kmenové buňky, zárodečné buňky a Sertoliho buňky. Výsledky této analýzy jasně ukázaly, že původ TSC nevychází ze spermatogoniálních kmenových buněk, ale naopak naznačují společný původ obou typů buněk a tím i na eventuální dediferenciaci pre-Sertoliho buněk v kultuře.

Hlavním úkolem diplomantky pak byla optimalizace podmínek transfekce TSC *X. tropicalis* a příprava stabilní transgenní linie. Markéta byla již druhou v pořadí, která tento nesnadný úkol dostala. V rámci předchozí diplomové práce byla vyzkoušena řada lipofekčních činidel s nulovou či nízkou efektivitou, nicméně i v případě úspěšných experimentů se vždy jednalo o transientní transfekci. Markéta v první řadě zopakovala většinu předchozích pokusů o transfekci s tím

rozdílem, že byl zvolen jiný vektor. Pozitivního výsledku bylo dosaženo až nukleofekcí, ač je tato metoda primárně navržena pro vyšší obratlovce. Kombinací různých programů s určitým roztokem se nakonec diplomantce podařilo kvantitativně připravit trvalou transgenní linii. Tyto RFP pozitivní buňky byly poté použity v pilotních pokusech o diferenciaci *in vitro* pomocí metody zavěšené kapky a allogenní transplantaci *in vivo*.

Z metodického pohledu musela diplomantka zvládnout spektrum technik sahající od izolace NK, RT-PCR, amplifikaci vektoru, přes kultivaci různých typů buněk, transfekci buněk a jejich separaci pomocí FACS. Dále se účastnila transplantačních pokusů a i přípravy a vyhodnocení kryořezů. Zde musím podotknout, že její schopnosti byly využity i v rámci výuky, kdy demonstrovala přípravu kryořezů studentům v rámci praktických cvičení z histologie. Markéta Vegrachtová se snadno a rychle stala součástí našeho týmu a na přiděleném úkolu pracovala svědomitě a samostatně. Byla schopná získané výsledky kriticky hodnotit a uspořádat. Vytčené cíle diplomové práce byly splněny a předkládané výstupy jsou součástí publikace, kde je Markéta uvedena jako spoluautorka. Diplomová práce je členěna dle požadavků katedry a diplomantka jí sepsala samostatně. Na základě výše uvedených faktů doporučuji tuto práci k přijetí a přiřláním se k hodnocení stupněm výborně.

V Praze dne 10. 9. 2014

RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.