Oponentský posudek diplomové práce Martina Kováře (2017)

Název práce: Krvetvorba u mihule mořské

Magisterská práce Bc. Martina Kováře se zabývá objasněním některých aspektů vývoje a mechanismů regulace erytro-myeloidní diferenciace obratlovců. K dosažení tohoto cíle používá jako modelový organismus, jednoho z vývojově nejstarších žijících obratlovců, mihuli mořskou (*Petromyzon marinus).*

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Cílem práce bylo popsat systém hematopoézy mihulí, identifikace homologů známých hematopoetických genů vyšších obratlovců a ověřit vztah mezi erytroidní a trombocytární linie. Práce byla zaměřená na doposud ne příliš probádané aspekty molekulárních mechanismů vývoje hematopoézy obratlovců zaměřené na diferenciaci erytroidní a trombocytární linie. Výsledků bylo dosaženo využitím rozsáhlého spektra metod, které byly vyhodnoceny s použitím statistických a bioinformatických nástrojů. Kromě nepopiratelného vědeckého přínosu je kladem disertační práce i využití řady moderních metod molekulární biologie a bioinformatiky a důkladné zpracování získaných výsledků.

Formální kvalita předložené diplomové práce a hodnocení jednotlivých částí

Diplomová práce má 73 stran včetně příloh. Je psána česky a tvoří ji všechny náležité kapitoly. Práci nelze po formální ani jazykové stránce nic závažného vytknout.

Úvod a přehled literatury

Jsou přiměřené rozsahem a jsou důkazem toho, že autor je s problematikou dobře seznámen. V úvodu je jasně definovaná hypotéza, ze které následně vychází cíle práce. Přehled literatury uceleně shrnuje dosavadní poznatky v oblasti vývoje hematopoézy u obratlovců. Prezentuje současné hypotézy diferenciace kmenových buněk a progenitorů do jednotlivých hematopoetických linií u vyšších obratlovců. Identifikuje základní faktory, které se podílí na diferenciaci kmenových a progenitorových buněk jednotlivých hematopoetických linií a zároveň slouží jako liniově specifické markery. Neopomíjí také možnou plasticitu hematopoetických progenitorů v různých stadiích diferenciace. Na závěr shrnuje změny, ke kterým došlo v průběhu evoluce na úrovni krvetvorby a diferenciace buněk erytroidní a trombocytární linie ze společného progenitoru. Tyto části vhodně doplňují schémata a obrázky, které usnadňují orientaci v popisované problematice.

Cíle práce

Cíl diplomové práce je formulován jasně a ve třech dílčích bodech.

Materiál a metody

Metody experimentů jsou popsány srozumitelně, v logickém sledu a s přehledem, který svědčí o tom, že Martin Kovář dosáhl přiměřeného stupně laboratorních dovedností. Je zde jasně popsaný způsob získávání vzorků, vektory, media, primery, pufry a další používané chemikálie. Autor detailně popisuje širokou škálu metod (např. izolace RNA a DNA, reverzní transkripce, PCR, přípravu a transformaci kompetentních bakteriálních buněk, ligaci DNA do vektorů, in vitro transkripci, průtokovou cytometrii, imunohistochemické barvení, *in situ* hybridizaci, bioinformatické analýzy a další). Autor zasvěceně popisuje i metody, které sám neprováděl, a které využil k získání vstupních dat (např. sekvenování transkriptomu).

Výsledky

Výsledková část práce je členěna dle metodických přístupů. Je přehledná a přesvědčivě dokazuje, že autor je schopen jasně popsat své výsledky. Na základě analýzy transkriptomu potenciálních hematopoetických tkání (ledvina, játra a supraneurální tělísko) a krve mihule mořské se autorovi podařilo identifikovat místa exprese markerů jednotlivých hematopoetických linií a jejich sekvenční homologii s ortologními geny ostatních obratlovců. Dle očekávání homology některých známých hematopoetických genů vyšších obratlovců v transkriptomu mihule mořské nebyly identifikovány. S cílem mapovat aktivitu klíčových genů hematopoézy v časných stadiích ontogeneze mihule mořské autor adaptoval protokol *in situ* hybridizace pro Danio rerio a provedl pilotní analýzu. Na základě předběžných výsledků a s přihlédnutím k struktuře tkání larválního stadia mihule mořské navrhl změny protokolu, které by mohly přispět ke zvýšení specificity a senzitivity protokolu *in situ* hybridizace pro tento organizmus. S cílem identifikovat jednotlivé subpopulace krevních buněk byly autorem provedeny histochemické analýzy krevního nátěru a analýzy krve pomocí průtokové cytometrie. Tyto analýzy mohou přispět k přesnějšímu určení jednotlivých populací a třídění těchto populací za účelem dalšího molekulárně biologického výzkumu mechanismů diferenciace hematopoetických buněk u mihule mořské.

Diskuze, souhrn a seznam použité literatury

V diskuzi autor kriticky hodnotí získané výsledky a konfrontuje je se současnou úrovní znalostí studované problematiky. Hlavní výsledky práce jsou na závěr přehledně shrnuty. Práce je opatřena 78 citacemi. Citace jsou voleny přiléhavě, přiměřený je i počet recentních prací. Rozsah citací odpovídá celkové výborné kvalitě práce.

Dílčí připomínka:

Na závěr práce se rozchází číslování tabulek a obrázků s odkazy v textu (tabulka 11 je označena tabulka 81, obrázek 16 je označen obrázek 12, obr.xx je označen obrázek 17). Vzhledem k tomu, že zmiňované obrázky a tabulky jsou součástí textu odpovídající kapitoly a/nebo v logickém pořadí tyto

drobné „překlepy“ nesnižují orientaci v předloženém textu a nesnižují celkově vysokou kvalitu předložené práce.

Závěr

Diplomová práce dokazuje výbornou teoretickou připravenost autora na poli studované problematiky. Autor prokázala patřičné laboratorní dovednosti, schopnost získat smysluplná data, konstruktivně je analyzovat a kriticky hodnotit. Přináší také původní výsledky, které mohou přispět k rozšíření znalostí o vývoji a mechanismech regulace hematopoézy u obratlovců. Doporučuji přijetí práce Bc. Martina Kováře jako podkladu pro udělení akademického titulu „Magistr“.

Doplňující dotazy:

Molekuly mRNA některých hematopoetických faktorů (např. erytropoetinu) jsou přítomné v nestimulovaných tkáních v malém množství a jsou obtížně detekovatelné metodami, které nevyužívají jejich specifickou amplifikaci pomocí PCR (např. historicky RNAse protection assay). Velký dynamický rozsah koncentrací transkriptů jednotlivých genů může vést k přednostní identifikaci vysoce abundantních transkriptů a transkripty s nízkou abundancí nejsou identifikovány. Jaké je senzitivita detekce mRNA pomocí sekvenování transkriptomu? Je možné tuto metodu modifikovat s cílem detekce nízkoabundantních transkriptů?

Autor se v předložené práci analyzující transkriptom mihule mořské zaměřil zejména na identifikaci mRNA pro receptory, intracelulární signální molekuly a transkripční faktory asociované s hematopoézou. Podařilo se detekovat také homology pro cytokiny, jako jsou v práci zmiňované erytropoetin a trombopoetin?

Erytropoéza je do určité míry regulovaná hypoxií. Mechanismy detekce hypoxie jsou popsané u vyšších obratlovců. Byly při analýze transkriptomu mihule identifikovány i homology genů podílející se na detekci hypoxie a regulaci hypoxií indukované transkripce, např. hypoxia inducible factor (HIF), některé prolyl hydroxylázy (PHD), von Hippel-Lindau (VHL) atp.?

Praha 31. Května, 2017

Doc. MUDr. Jan Živný, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie
1. lékařská fakulta
Univerzita Karlova