

Oponentský posudek diplomové práce.

Název práce: Autokrinní signalování u lidských embryonálních kmenových buněk

Autor práce: Bc. Iva Kubíková

Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Dvořák, CSs.

Místo a rok vypracování diplomové práce: České Budějovice 2007

Shrnutí diplomové práce

Předložená diplomová práce se zabývá studiem úlohy mikrovesikulů u lidských embryonálních kmenových buněk. Primárním cílem práce je zjistit, zda kultivované embryonální kmenové buňky vůbec mikrovesikuly produkují a pokud ano jaký je jejich aktivní obsah. Odvozeným cílem pak má být zjištění, zda mikrovesikuly mají nějaký vliv na proliferaci a diferenciaci embryonálních kmenových buněk a zda nejsou možným mechanismem transportu signálních proteinů postrádajících sekreční sekvenci, jako je např. fibroblastový růstový faktor.

V první fázi se diplomantka soustředila na izolaci mikrovesikulů z kultivačního media kondicionovaného lidskými embryonálními buňkami. Na extrahované proteinové frakci pak prováděla test na přítomnost fibroblastového růstového faktoru pomocí imunoelktroforetické analýzy. Proteinová frakce byla také rozseparována na dvou-dimensionální elektroforéze a charakterizována pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro určení přítomnosti mikrovesikulů, diplomantka vyvinula originální způsob jejich fluorescenčního značení. Za využití průtokové cytometrické analýzy se diplomantka snažila charakterizovat počet částic produkovaných buňkami v průběhu času, určit dobu potřebnou k jejich externalizaci, poločas rozpadu, stejně jako ztráty způsobené různými metodami izolace. V poslední fázi projektu pak diplomantka testovala vliv mikrovesikulů na proliferaci a diferenciaci embryonálních kmenových buněk

Poznámky k předložené práci

Formální nedostatky

Ačkoliv je text přehledně a logicky členěn je často obtížné se v něm orientovat. Tato skutečnost je především dána vynecháváním přídavných jmen ve větách, např.

Str. 9. Cíle práce: „Najít vhodný izolační postup“ – čtenář už se bohužel nedozví čeho. Dovtípit se sice lze, ale náhrává to spekulacím a možným nedorozuměním. V odborných textech by se věty měli dokončovat.

Osobně bych se snažil v odborných textech vyvarovat poznámek typu „... i když osobně bych preferovala poetičtější název“

Jazyk a sloh je neurovnaný, autor zbytečně používá cizích slov namísto vhodných českých ekvivalentů, např. „Nebyla nastavena žádná „gate“

Dotazy a poznámky:

1) Diplomantka popisuje, že v mikrovesikulech byla sice detegována RNA, ale že její množství nebylo dostatečné pro analýzu pomocí PCR. Zajímalo by mne, co si diplomantka myslí o možnosti analýzy RNA izolované z mikrovesikulů pomocí hmotnostní spektrometrie.

2) Velkým očekáváním od hmotnostně spektrometrické analýzy bylo potvrzení přítomnosti proteinů signálních drah, jako např. FGF-2, TGF b, BMP-4 nebo Wnt. Bohužel však ani jeden z nich nebyl pomocí hmotnostní spektrometrie identifikován. Souhlasím s diplomankou, že největší omezení plyne z separace proteinové frakce pomocí 2D elektroforézy a chtěl bych doporučit zopakování experimentu na systému LC-MS/MS.

3) Problematickou částí projektu se také ukázala analýza na průtokovém cytometru. Zde bych chtěl doporučit provedení analýzy pomocí techniky dynamického rozptylu světla, které nevyžaduje fluorescenční značení a požadované informace může být získána s daleko větší spolehlivostí.

4) Chtěl bych také doporučit vizuální kontrolu stavu mikrovesikulů po jednotlivých purifikačních krocích pomocí elektronové mikroskopie. Tato analýza navíc může poskytnout nezávislou informaci o velikosti, tvaru, ale i počtu mikrovesikulů.

Hodnocení práce

Jak je patrné z diplomové práce, naplnění cílů vyžadovalo od diplomantky aktivní zvládnutí širokého spektra experimentálních metod a kreativní a samostatný způsob práce. Osobně tuto práci považuji za velmi nadprůměrnou. Diplomovou práci Bc. Ivy Kubíkové doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou.

V Českých Budějovicích 30. ledna 2007

Lukáš Trantírek, PhD.



Oponentský posudek na diplomovou práci
Autokrinní signálování u lidských embryonálních kmenových buněk

Autorka: Iva Kubíková

Školitel: doc. Ing. Petr Dvořák, Csc.

Téma diplomové práce je velmi aktuální. Autorka se v práci zabývá základním výzkumem lidských embryonálních kmenových buněk (hESC), jež jsou objektem intenzivního zájmu jak vědecké, tak i laické veřejnosti, především kvůli jejich potenciální medicínské významnosti. Zaměřuje se na molekulární mechanismy signálních drah regulujících mimo jiné i sebeobnovu, proliferaci a diferenciaci hESC. Mikrovezikuly uvolňované buňkami do média mohou obsahovat některé růstové faktory a zprostředkovávat autokrinní signálování buněk.

Práce má 40 stran a je členěna obvyklým způsobem. Úvod do problematiky je obsáhlý a přehledný. Použité metody jsou popsány velmi detailně. Výsledky a diskuse jsou uvedeny stručně a jasně, s množstvím názorných vyobrazení. Seznam literatury obsahuje 91 citací. Jediné, co jsem v práci postrádala, byly závěry obsahující odpovědi na jednotlivé cíle práce.

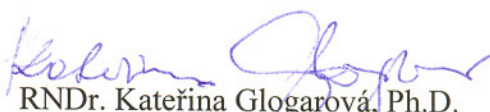
Konkrétními úkoly diplomové práce bylo: 1) zjistit, zda hESC za běžných kultivačních podmínek produkují mikrovezikuly, 2) najít jejich vhodný izolační postup, 3) identifikovat aktivní obsah mikrovezikulů s důrazem na signální molekuly s neznámým způsobem externalizace a 4) zjistit, zda mikrovezikuly ovlivňují proliferaci a diferenciaci hESC a zda se podílejí na udržování mikroprostředí uvnitř kolonie.

Tyto úkoly byly v zásadě splněny. Autorce se podařilo zavést vhodnou metodu pro izolaci mikrovezikulů produkovaných buňkami do kultivačního média. Oceňuji volbu metodiky pro velice obtížnou analýzu proteinové složky izolovaných mikrovezikulů. Pomocí kombinace dvou různých technik hmotnostní spektrometrie se podařilo i přes vysoký obsah bovinního albuminu pocházejícího z kultivačního média identifikovat několik proteinů pocházejících pravděpodobně z mikrovezikulů, např. kolagen typu X, annexiny typu II a V, kofilin a G-protein. Nebyl nalezen žádný z očekávaných proteinů signálních drah, FGF-2, TGF- β , BMP-4 či Wnt, autorka však přesvědčivě diskutuje pravděpodobné technické příčiny.

Přínosem práce je vyvinutí techniky pro fluorescenční vizualizaci mikrovezikulů. Poprvé tak bylo prokázáno, že mikrovezikuly jsou produkovány lidskými embryonálními kmenovými buňkami za běžných kultivačních podmínek. Zároveň byl u nich detekován pozitivní signál na FGF-2, annexin V a nukleové kyseliny, ukazující na aktivní obsah mikrovezikulů. Z kultivačních experimentů vyplývá, že aktivní složky mikrovezikulů mají pozitivní vliv na mikroprostředí uvnitř kolonie, ale přesto je k udržení proliferace a nediferencovaného stavu embryonálních kmenových buněk zapotřebí ještě dalších signálních molekul, např. microRNA, antisense RNA, či nedávno objevené SPARC proteiny.

Předložená práce je vynikající. Je dobře dokumentována a výborně napsána. Domnívám se, že diplomová práce naplnila zadání a řešení tématu a doporučuji proto její přijetí.

V Praze, 26. 1. 2007


RNDr. Kateřina Glogarová, Ph.D.
Odd. kmenových buněk, ÚEM AV ČR