

Oponentský posudek dizertační práce

Mgr. Martina Dvořáková: Functional role of Sox2 in inner ear neurosensory development

Školitel: RNDr. Gabriela Pavlínková, PhD.

Oponent: RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Mgr. Martina Dvořáková se ve své dizertační práci podrobně zabývá transkripčním faktorem Sox2, který patří společně s Sox1 a Sox3 do rodiny SoxB1. Ačkoliv Sox2 je aktivní, a jeho role nezastupitelná, už v ranném embryu ve stádiu blastocysty, Martina Dvořáková se zaměřila na jeho funkci při vývoji sensorických nervů a ušního labyrintu vnitřního ucha. Objasnění role Sox2 během vývoje vnitřního ucha je mimořádně důležité. U myší byly popsány minimálně dvě mutace v regulačních oblastech genu Sox2, které vedly k hluchotě. Jelikož celotělní inaktivace Sox2 vede zastavení vývoje během implantace blastocysty, Martina Dvořáková zvolila strategii tkáňově specifické knock-out metody. Za tím účelem použila křížení myší linie Sox2 f/f, obsahující rozpoznávací úseky loxP, s třemi rozdílnými myšími liniemi s Cre rekombinázou: Foxg1-Cre, Neurod1-Cre a Isl1-Cre. Každá linie Cre se liší mírou rekombinace v různých tkáních (např. sensorický epitel a neuroblasty či diferencované neurony) a také načasováním rekombinace během embryonálního vývoje. Zvolení těchto experimentálních modelů je v práci dostatečně zdůvodněno. Morfologické změny cochlely a změny diferenciací sensorických neuronů byly analyzovány pomocí fluorescenční imunohistochemie, konfokální a elektronové mikroskopie, případně pomocí in situ hybridizace mRNA.

Celkově je dizertační práce Martiny Dvořákové velmi kvalitní, experimentální postupy jsou pečlivě a logicky vystavěny a výsledky popsány podrobně. Práce je psána v anglickém jazyce na velmi dobré úrovni. Literární úvod je bohatý a podrobný. Zvláště oceňuji velmi zdařilé obrázky fluorescenčního barvení tkáňových řezů a 3D rekonstrukce. Tato dizertační práce je podložena dvěma publikacemi, které byly uveřejněny v impaktovaných časopisech, a to v Scientific Reports 2016 a Developmental Biology 2020. Na obou článcích je Martina Dvořáková prvním autorem.

Dizertační práci, která je věrohodným základem k udělení titulu PhD, doporučuji k přijetí.

Nicméně jsem si při čtení kladl některé otázky, které bych rád prodiskutoval během obhajoby.

1. Použila jste tři různé Cre linie, které umožňují delecí Sox2 v různých vývojových stadiích a částečně v odlišných buněčných populacích. V práci mi chybí shrnutí srovnání Cre rekombinací například pomocí lineage tracing experimentů s tdTomato reporterovou myší. Můžete porovnat účinnost v různých buňkách a načasování Cre driverů Isl1, Foxg1 and Neurod1?
2. Delece Sox2 v otocystě je v případě použití FoxG1 driveru poměrně časná (E9.5, obr. 39). Přesto nejsou patrné změny v proliferaci neuroblastů až do E11.5. Jak si vysvětlujete roli Sox2 v regulaci buněčného cyklu v nervových prekurzorech vnitřního ucha.
3. Na straně 38 v úvodní části zmiňujete regulaci buněčného cyklu faktorem Sox2 mechanismem aktivace p27Kip1, případně pomocí aktivace neurogenního faktoru Ngn1. Analyzovala jste tyto známé cílové geny Sox2 ve vašem experimentálním modelu?
4. Máte nějakou hypotézu pro masivní zvýšení apoptózy u mutantů Foxg1-Cre/Sox2. Byly pozorovány podobné účinky v literatuře, například v předním mozku?

V Praze, 14.8.2020

Ondřej Machoň