

Oponentský posudek dizertační práce

**Mgr. Viktorie Psutková**

Studijní program Vývojová a buněčná biologie, PŘF UK v Praze

**Vývoj buněk neurální lišty u zebřičky (*Danio rerio*)**

Dizertační práce, Školitel: RNDr. Ondřej Machoň, Ph.D., Praha 2024

### **Shrnutí:**

Tato práce se zabývá vývojem neurální lišty, specifické skupiny buněk, které se u obratlovců mění v různé buněčné typy a které migrují do různých částí těla. Autorka se zaměřuje na hlavovou neurální lištu u dánia pruhovaného a její transformaci zejména do chondrocytů a tenocytů, což je klíčový proces pro vývoj lebky. Vývoj neurální lišty je převážně řízen *hox* geny a sítí dalších vzájemně se ovlivňujících faktorů, včetně genů z rodiny *meis*. Autorka zkoumala právě tyto geny pomocí knock-out mutantů pro každý z rybích paralogů *meis* (*meis1a*, *meis1b*, *meis2a* a *meis2b*). Tato práce ukazuje, že u mutantů *meis1b* a u dvojitého mutantu *meis1a* a *meis1b* dochází k deformaci hlavových chrupavek během období jejich růstu (8 dpf) a že neuspořádaná svalová vlákna v *meis1b* mutantních jedincích ovlivňují kondenzaci šlach. V souhrnu autorka prokazuje, že *meis1b* paralog je důležitý pro vývoj několika kraniofaciálních tkání a slouží tak jako možný faktor ovlivňující vývoj prvního a druhého žaberního oblouku.

### **Hodnocení a připomínky:**

Dizertační práce má 40 stran plus přílohy, je psána česky a je rozčleněna do pěti částí: 1. Úvod, 2. Cíle práce, 3. Získaná data zasazená do kontextu současného poznání, 4. Závěrečné shrnutí, 5. Materiál a metody. V práci tak chybí klasické členění (Úvod, Výsledky, Materiál a metody, Diskuze a Závěr). Práce je poněkud krátká. Domnívám se, že zejména chybějící diskuze je na škodu. Zároveň bych však na tomto místě ocenil členění jednotlivých podkapitol v rámci kapitoly „Získaná data zasazená do kontextu současného poznání“, kdy jednotlivé nadpisy výstižně shrnují dílčí výsledky.

Po vědecké stránce je práce dostatečná, bohužel však musím konstatovat, že po stylistické a textové stránce je tomu naopak. K práci mám následující připomínky:

1. Během čtení této dizertační práce bylo poněkud nepřehlednou a nepříjemnou skutečností, že většina obrázků je odkazována na původní publikace. Práce není nikterak rozsáhlá, proto si myslím, že by jí velmi prospěl rozsáhlejší obrazový doprovod a detailnější popis jednotlivých výsledků (spolu s výše zmíněnou diskuzí). Dále nerozumím, proč v práci nebylo použito ani jedno ze schémat z publikovaného přehledového článku (Článek I, Fabik, J. et al., 2021), na jejichž tvorbě se autorka sama podílela. V práci je zároveň v minimální míře zmíněn Článek III (Fabik, J. et al., 2022). Chápu, že hlavním tématem této dizertace bylo studium *meis* genů u

modelového organismu dánío pruhované, o něco širší záběr by však této práci zcela jistě prospěl. Práce obsahuje četné pravopisné a stylistické chyby, často na úkor srozumitelnosti textu:

“...jelikož se jedná pluripotentní populaci buněk“ (strana 2), „...specifikují buňky neurální lišty jako jsou *foxD3*, *snai1*,...“ (čárka před výčtem, strana 2), „Interakcí z okolními tkáněmi“ (strana 2), „poskytuje řadu výhod mezi ně patří rychlý“ (něž, strana 2), „Článek II“ (strana 2), „paraby“ (strana 4), „Larvy triple mutantů opět nedosáhli delšího života než 13 dní“ (y/i, strana 8), „V této práci jsem se zaměřili“ (strana 8), „celo-tělní“ (píše se dohromady, naopak anglické sousloví „whole mount“ se píše s pomlčkou), „přilehající“, „žloutková koule“ (ne „koule“, ale „vak“) atd.

2. V práci se volně mísí anglické a české odborné výrazy. Přestože je někdy obtížné nalézt český ekvivalent některých odborných pojmů, je potřeba se o to pokusit nebo psát konzistentně pomocí anglických termínů, případně používat uvozovky:

„...roli v tomto trimeru transkripčních faktorů“ (strana 8), „Larvy triple mutantů“ (strana 8) s příslušným „forward primerem“ (strana 25) atd.

Dále je nutné být konzistentní v psaní s/z/h v převzatých slovech: „mechanismus“, „mesenchymální“, „mezenchymální“, „senzorické“, „epiteliálních“ atd.

3. Práce často obsahuje nesrozumitelně nebo neobratně formulované věty:

„Ze srovnání rybí lebky a savčí lebky bychom těžko hádali embryonální společný původ.“ (strana 4), „Zároveň jsme odkryli vzájemně propojení kraniofaciálních tkání a přinesli další poznatky vlivu Meis na chondrogenezi a osteogenezi u myši. (strana 6), „Přesto ale se stále objevují nové poznatky na tomto poli bádání, které rozšiřují naše poznání. (strana 8), „...abychom odhalili, zda nedochází ke kompenzaci stran druhého paralogu.“ (strana 8), „Den po vykulení se z ochranných obalů (3 dpf) můžeme pozorovat *meis1b* v chrupavkách.“ (strana 9), „Jestli byl chybně tvarovaný nerv schopný inervace, jsme detekovali skrze nervosvalové spoje.“ (strana 21), „Počet a pozice synapsí si vzájemně odpovídal a utvářel nervosvalové spoje u *meis1b/1ab* KO mutantů.“ (rozumím významu, ale popis je značně zkratkovitý, strana 21), „Uvolněná DNA spolu s příslušným forward primerem, který amplifikuje DNA ve směru 5'-3', a reverse, který značí místo replikace komplementárního vlákna tedy ve směru 3'-5' (Tab.1), a DNA polymerázou (2X DreamTaq Master Mix) byla pomocí PCR amplifikována.“ (zde se naopak jedná o značně komplikovaný popis, strana 25), „*Meis1b/1ab* KO mutantů mají ve stadiu 6 dpf tzn. stadiu čerstvě přijímací potravu z vnějšího okolí, vyvinuté svaly s ektopickými vlákny.“ (chybějící interpunkce na úkor srozumitelnosti, strana 27) atd.

4. V práci nesouhlasí odkazy na některé obrázky v autorčině publikacích:

„Nícméně morfologie nervu u všech mutantů kopírovala tvar svalu (Fig. 8, Článek I).“ (z kontextu vyplývá, že se jedná o Fig. 9, Článek I, strana 21), „Počet a pozice synapsí si vzájemně odpovídal a utvářel nervosvalové spoje u *meis1b/1ab* KO mutantů (Fig. 9, Článek I).“ (z kontextu vyplývá, že se

jedná o Fig. 10, Článek I), „Meckelovy chrupavky byla patrná svalová vlákna, která nebyla zarovnána (Fig. 4B hrot šipky, Článek I).“ (jedná se o Fig. 4A).

#### 5. Další připomínky:

Velmi pozitivně hodnotím kvalitu obrázků *in situ* hybridizace. V práci by však bylo dobré uvádět počty popisovaných fenotypů z celkového počtu (jako je tomu v příložených publikacích). Z abstraktu vyplývá, že *meis1a* mutant neměl žádný fenotyp. Tento fakt by pro lepší přehled a ucelenost bylo dobré zmínit na straně 8, kde se jednotlivé fenotypy popisují. V kapitole „Materiál a metody“ by bylo vhodné zmínit katalogová čísla jednotlivých produktů, dále by bylo správné zmínit konkrétní nástroje („packages“) použité ke statistické analýze - „Statistické analýzy uvedené v Článku I byly zpracované v programu R.“ (strana 32).

#### Otázky oponenta:

1. Z textu na straně 9 vyplývá, že nebyl detekován žádný rozdíl mezi *meis1a* mutantem a mezi *meis1a*, *meis1b* dvojitým mutantem (v práci označovaný jako *meis1ab*):

„Pro analýzy jsme proto využili embryonální materiál jak *meis1b*, tak *meis1a1b* linie, mezi kterými není žádného morfologického rozdílu, abychom urychlili získávání dat.“

Není tedy matoucí provádět v pozadí *meis1a* mutace jakékoli pokusy a zároveň toto pozadí v textu zmiňovat?

2. Jak vypadá fylogenetický strom mezi orthology *Meis/meis* mezi myší a rybou a jejich jednotlivými paralogy? Lze na základě syntenie nebo homologie vyvodit, že orthologem *Meis2* je právě *meis1b*? Podobné schéma by bylo vhodné prezentovat v úvodní kapitole.
3. *Meis2* cKO jedinci (myš) mají nadměrně osifikovanou lebku a zkrácenou čelist. Projevují se u těchto mutantů změny svalů a šlach jako je tomu u ryb?
4. Na straně 23 se píše:

“Z našich dat nemůžeme jasně určit, zda *meis1b* ovlivňuje pouze vývoj chondrocytů a tím moduluje svaly a šlachy nebo opačně *meis1b* skrze vývoj tenocytů ovlivňuje vývoj ostatních kraniofaciálních struktur. Možné vysvětlení může přinést otestování úrovně retinové kyseliny nebo zaměření se na nekanonickou i kanonickou Wnt signální dráhu.“

Je možné, že spolu tyto fenotypy vůbec nesouvisí? Jakým způsobem by se v otázce provázanosti obou fenotypů dalo využít testování pomocí kyseliny retinové nebo zaměření se na ne/kanonickou Wnt signalizaci? Podobné hypotézy a navrhované experimenty by bylo vhodné v dizertační práci diskutovat a popsat.

5. Mutace v *meis1b* je letální (13 dpf). Souvisí pozorované fenotypy v čelistech s letalitou mutantů nebo embrya umírají z jiného důvodu? Jinými slovy, souvisí letalita s omezením příjmu potravy, byly v tomto směru provedeny nějaké experimenty a proč nebyla letalita embryí diskutována?

**Závěrečné shrnutí:**

Tato práce přináší nový a užitečný vhled do role *meis* na kraniofaciální vývoj. V příloze této práce jsou přiloženy dvě publikace uchazečky (jeden původní a jeden přehledový článek), ve kterých je autorka druhým autorem, a jeden prvoautorský původní článek ve formě manuskriptu v recenzním řízení. Svým rozsahem odpovídá předložená dizertace spíše diplomové práci, protože však autorka splnila publikační kritéria vyžadovaná oborovou radou, doporučuji ji k obhajobě.

V Praze 8. 5. 2024

Ondřej Svoboda, Ph.D.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.