

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Veronika Merc

Vliv NEUROD1 transkripční regulace na vývoj
a funkci neuronů vnitřního ucha

Role of NEUROD1 transcriptional network on the development
and function of inner ear neurons

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

.....

Bc. Veronika Merc

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem členům Laboratoře molekulární patogenetiky, kteří za mnou od počátku mé práce v laboratoři stáli, trpělivě a ochotně mi pomáhali zvládnout všechny laboratorní metody a tvořili skvělý a přátelský kolektiv, ve kterém byla radost na diplomovém projektu pracovat. Jmenovitě děkuji své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph.D., Mgr. Ivě Filové, Ph.D. a Ing. Romaně Bohuslavové Ph.D. za veškerou pomoc, rady, odborný a zároveň vstřícný a přátelský přístup, pod jejichž vedením jsem se mnohému naučila, získala cenné zkušenosti a bez nichž by tato práce nevznikla. V neposlední řadě děkuji své rodině, a především pak svému manželovi za veškerou podporu, pomoc, trpělivost a důvěru, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Identifikace a pochopení funkce transkripčních faktorů zapojených v komplexní síti regulujících vývoj neurosenzorických buněk vnitřního ucha je klíčovým bodem pro pochopení patofyziologie ztráty sluchu a rozvoj nových terapeutických nástrojů pro neurosenzorickou regenerační terapii a prevenci. Cílem předložené práce bylo objasnit funkci transkripčního faktoru NEUROD1 ve vývoji vnitřního ucha a senzorických neuronů. Pomocí rekombinačního systému Cre-loxP byl vytvořen unikátní myší model s tkáňově specifickou delecí *Neurod1* v NEUROD1-Cre exprimujících buňkách (*Neurod1ST*). Ve vnitřním uchu byl *Neurod1* eliminován pouze v neuronech, což umožnilo zhodnotit sekundární účinky *Neurod1* delece na vývoj senzorického epitelu. Ukázali jsme, že časný vývoj vnitřního ucha ani formace statoakustického ganglia nebyla delecí *Neurod1* významně ovlivněna. Primární důsledek *Neurod1* delece se projevil zvýšeným odumíráním neuronů v důsledku apoptózy, což vedlo k defektům během formace spirálního ganglia a růstu kochleární inervace. Spirální a vestibulární ganglia byly u mutantů menší a na jejich rozmezí se nacházelo množství neuronů, což ukazuje na jejich narušenou migraci a segregaci. Senzorický epitel kochley byl zkrácen pravděpodobně v důsledku sníženého množství neuronů uvnitř spirálního ganglia. Rovněž jsme zaznamenali signifikantní zmenšení senzorického epitelu všech vestibulárních orgánů. Molekulární analýzy ukázaly sníženou expresi vybraných genů, kódující transkripční faktory, signální molekuly, a receptory, které hrají důležitou úlohu během vývoje vnitřního ucha a neuronů. Dosažené výsledky potvrzují důležitost transkripčního faktoru NEUROD1 pro správnou formaci spirálního ganglia, migraci a přežívání neuronů a také tvorbu kochleární inervace.

Klíčová slova: neurony, vnitřní ucho, bHLH transkripční faktor NEUROD1, Cre-loxP systém, myší model

Abstract

Identification of transcription factors involved in a complex network regulating the development of neurosensory cells in the inner ear is a key point for understanding the pathophysiology of hearing loss, development of new therapeutic tools, and for hearing loss prevention. The aim of this thesis was to elucidate the function of the transcription factor NEUROD1 in the development of the inner ear and sensory neurons. Using the Cre-loxP recombination system, a unique mouse model was created with tissue-specific deletion of *Neurod1* in NEUROD1-Cre positive cells (*Neurod1ST*). In the inner ear, *Neurod1* was deleted only in neurons permitting to identify the secondary effects of *Neurod1* elimination in neurons on sensory cell development. We showed that neither the early development of the inner ear nor the formation of the statoacoustic ganglia was significantly affected by *Neurod1* deletion. The primary consequence of the deletion was manifested by increased neuronal death due to apoptosis, which resulted in a reduced number of differentiated neurons in the inner ear. Spiral and vestibular ganglia were smaller in the mutants, and there was a number of neurons misplaced, indicating impaired migration. The cochlear sensory epithelium was shortened probably due to the reduced number of neurons within the spiral ganglion. Correspondingly, the size of all vestibular organs was smaller in the inner ear of *Neurod1* mutant. Furthermore, decreased expression of selected genes encoding transcription factors, signaling molecules, and receptors that play an important role during the development of the inner ear and inner ear neurons have been identified. These results confirm an important role of the transcription factor NEUROD1 in the formation of spiral ganglion, migration and survival of neurons, as well as the formation of cochlear innervation.

Key words: neurons, inner ear, bHLH transcription factor NEUROD1, Cre-loxP system, mouse model

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 3 |
| Úvod | 5 |
| 1 Morfologie vnitřního ucha | 6 |
| 1.1 Kochlea | 7 |
| 1.2 Vestibulární systém | 11 |
| 2 Morfologický vývoj vnitřního ucha myši domácí | 13 |
| 3 Molekulární regulace a specifikace buněčných typů | 15 |
| 3.1 Specifikace prosenzorické linie | 16 |
| 3.2 Specifikace proneurální linie | 17 |
| 3.2.1 NEUROD1 transkripční regulace | 18 |
| 3.2.2 Další významné regulační molekuly | 23 |
| 4 Cíle práce | 26 |
| 5 Materiál a metody | 27 |
| 5.1 Materiál | 27 |
| 5.1.1 Chemikálie | 27 |
| 5.1.2 Enzymy | 28 |
| 5.1.3 Primery | 29 |
| 5.1.4 Protilátky | 30 |
| 5.1.5 Roztoky | 30 |
| 5.1.6 Komerční soupravy | 31 |
| 5.1.7 Přístroje | 31 |
| 5.1.8 Počítačové programy | 32 |
| 5.2 Modelový organismus | 33 |
| 5.3 Metody | 34 |
| 5.3.1 Extrakce myších embryí a fixace tkáně | 34 |
| 5.3.2 Genotypizace | 34 |
| 5.3.3 Příprava vzorků na imunohistochemické barvení | 36 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3.4 | Imunohistochemické barvení | 36 |
| 5.3.5 | Izolace RNA | 36 |
| 5.3.6 | Reverzní transkripce | 37 |
| 5.3.7 | Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR) | 38 |
| 6 | Výsledky | 40 |
| 6.1 | Externí fenotyp experimentálního myšního modelu <i>Neurod1ST</i> | 40 |
| 6.2 | Efektivita delece <i>Neurod1</i> v buňkách statoakustického ganglia | 41 |
| 6.3 | Zvýšená apoptóza buněk ve statoakustickém gangliu | 43 |
| 6.4 | Defekty při tvorbě spirálního ganglia a v organizaci kochleární inervace | 45 |
| 6.5 | Nesprávná migrace a snížený počet neuronů spirálního ganglia | 48 |
| 6.6 | Zkrácení sensorického epitelu v kochley a zmenšené vestibulární orgány | 49 |
| 6.7 | Změny v relativní expresi vybraných genů v E14,5 | 52 |
| 7 | Diskuze | 54 |
| 7.1 | Mutanti <i>Neurod1ST</i> nejsou po narození životaschopní | 54 |
| 7.2 | NEUROD1 je v neuronech vnitřního ucha eliminován efektivně, ale se zpožděním 55 | |
| 7.3 | Delece <i>Neurod1</i> v neuronech vede ke zvýšené apoptóze | 55 |
| 7.4 | NEUROD1 reguluje tvorbu spirálního ganglia, migraci neuronů a organizaci kochleární inervace | 56 |
| 7.5 | Senzorický epitel kochley a vestibulárních orgánů je zmenšený v absenci NEUROD1 v neuronech | 58 |
| 7.6 | <i>Neurod1</i> je klíčový regulační faktor ve vývoji neuronů | 59 |
| | Závěr | 61 |
| | Seznam literatury | 63 |

Seznam zkratek

| | | |
|---------|--|--|
| ATOH1 | Atonal homologue 1 | Atonální homolog 1 |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor | Mozkový neurotrofní faktor |
| bHLH | Basic helix-loop-helix | Strukturní motiv zásadité šroubovice-smyčka-šroubovice |
| BHLHE22 | Basic Helix-Loop-Helix Family Member E22 | Transkripční faktor BHLHE22 |
| Casp3 | Caspase 3 | Kaspáza 3 |
| cDNA | Complementary DNA | Komplementární DNA |
| CRE | Cre recombinase | Cre rekombináza |
| DLL1 | Delta-like protein 1 | Ligandový protein DLL1 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | Deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | Deoxyribonukleosidtriphosphate | Deoxyribonukleosidtrifosfát |
| E | Embryonic day | Embryonální den |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | Kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EFNB2 | Ephrin B2 | Efrin B2 |
| EPHA5 | Ephrin type-A receptor 5 | Efrinový receptor typu A 5 |
| EYA1 | Eyes absent homolog 1 | Transkripční faktor EYA1 |
| F | Forward | Přímý |
| FGF8 | Fibroblast growth factor 8 | Fibroblastový růstový faktor 8 |
| FOXP1 | Forkhead box protein G1 | Transkripční faktor FOXP1 |
| HES | Hairy and enhancer of split-1 | Transkripční faktor HES |
| HMG | High-mobility group | Skupina proteinů s vysokou pohyblivostí v elektroforetickém poli |
| HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | hypoxantin fosforibosyltransferáza 1 |
| IGSB | Intraganglionic spiral bundle | Intraganglionický spirální svazek |
| ISL1 | Insulin gene enhancer protein ISL-1 | Transkripční faktor ISL1 |
| JAG2 | Protein jagged 2 | Ligandy JAG signalační dráhy Notch |
| LIM | LIN-11, Isl-1 and MEC-3 | LIN-11, Isl-1 a MEC-3 |
| NeuN | Neuronal nuclei antigen | Jaderný marker neuronů |

| | | |
|---------|---|--|
| NEUROD1 | Neurogenic differentiation factor 1 | Neurogenní diferenciační faktor 1 |
| NEUROG1 | Neurogenin 1 | Neurogenin 1 |
| NHLH1 | Nescient helix-loop-helix 1 | Transkripční faktor Nhlh1 s motivem šroubovice-smyčka-šroubovice |
| NOTCH | Neurogenic locus notch homolog protein | Homologní protein Notch s neurogenním lokusem |
| NT3 | Neurotrophic factor 3 | Neurotrofin 3 |
| NTRK2/3 | Neurotrophic tyrosine receptor kinase 2/3 | Neurotrofinová receptorová tyrozinkináza 2/3 |
| P | Postnatal day | Postnatální den |
| PAX2 | Paired domain gene 2 | Párová doména transkripčního faktoru 2 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | Fosfátový pufr |
| PCR | Polymerase chain reaction | Polymerázová řetězová reakce |
| PFA | Paraformaldehyde | Paraformaldehyd |
| POU4F1 | POU class 3 homeobox 4 | POU třída 3 homeoboxový gen 4 |
| qPCR | Quantitative PCR | kvantitativní PCR |
| R | Reverse | Zpětný |
| RNA | Ribonucleic acid | Ribonukleová kyselina |
| RT | Reverse transcription | Reverzní transkripce |
| RT-qPCR | Quantitative real-time PCR | Kvantitativní PCR v reálném čase |
| SHH | Sonic hedgehog | Protein Sonic hedgehog |
| SIX1 | Sineoculis homeobox homolog 1 | Transkripční faktor SIX1 |
| SOX2 | Sex determining region Y-box factor 2 | Transkripční faktor SOX2 |

Úvod

Vnitřní ucho savců představuje vysoce komplexní orgán zajišťující sluch, rovnováhu a prostorové vnímání. Za tyto funkce jsou zodpovědné senzorycké vláskové buňky a neurony vnitřního ucha. Ztráta sluchu patří podle Světové zdravotnické organizace mezi 10 nejčastějších zdravotních postižení dnešní společnosti a postihuje přibližně 6 % světové populace. Poruchy sluchu mohou být způsobeny mnohými faktory a mohou být jak vrozené, tak získané.

U mnohých případů vrozených sluchových vad, poruch sluchu během života či přirozené nedoslýchavosti v důsledku stáří můžeme defekty sluchu částečně korigovat prostřednictvím naslouchadel či v krajních případech kochleárními implantáty. V případě poškození neuronů a sluchového nervu jsou však tyto pomůcky neúčinné. Neurosenzorycká ztráta sluchu je trvalá a je důsledkem poškození, degenerace či smrti neuronů, které inervují vláskové buňky a pomocí sluchového nervu předávají informaci dále do mozku. Tyto buňky nemají u savců schopnost regenerace, a tak je jejich poškození, či úplná ztráta nevratná.

Současný výzkum ukazuje, že prevence ztráty neuronů a zlepšení dlouhodobé podpory neuronů jsou nejdůležitějšími cíli pro nejbližší budoucnost. V posledních letech dochází k prudkému rozvoji výzkumů zabývajících se biologickou léčbou a kmenovými buňkami. Jedná se o nediferencované buňky, které jsou schopné diferencovat v různé typy buněk, tedy i v senzorycké neurony. Zároveň se v rámci regeneračních terapií objevuje také možnost indukce regenerace poškozených buněk pomocí jejich reprogramace a následné transdiferenciace.

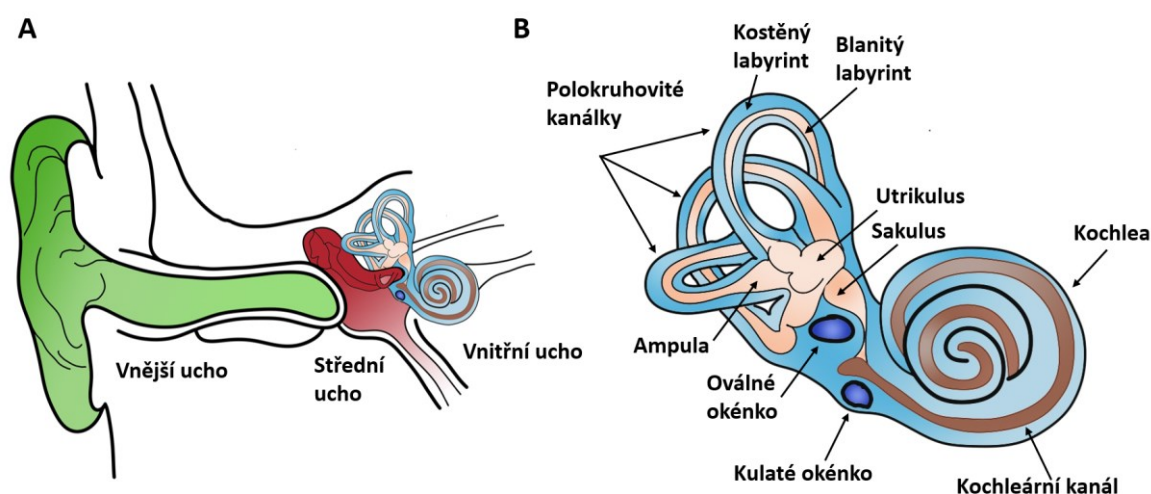
Využití těchto terapeutických nástrojů a technik však vyžaduje dokonale porozumět procesům a molekulárním hráčům, které se podílejí na regulaci a vývoji vnitřního ucha, včetně senzoryckých neuronů, které jsou klíčové pro přenos sluchové informace dále do mozku. V posledních několika dekádách byla tato problematika předmětem mnoha výzkumů. Přestože již bylo na tomto poli mnoho objasněno a byla objevena řada molekul, genů a jejich vzájemných interakcí, je regulační síť podílející se na řízení vývoje vnitřního ucha velice komplexní, rozsáhlá a dosud zcela neobjasněna.

Transkripční faktor NEUROD1 se při vývoji vnitřního ucha jeví jako důležitý faktor a stejně jako u dalších faktorů ani jeho funkce nebyla dosud zcela objasněna. Dosavadní výzkumy však poukazují na jeho přímou i nepřímou roli během vývoje vnitřního ucha i samotných neuronů. Bylo prokázáno, že je jeho absence spojená se ztrátou sluchu, proto je zajímavým cílem pro podrobnější výzkum, analýzy a objasnění jeho role ve vývoji neuronů a jejich inervace ve vnitřním uchu.

Tato diplomová práce se zabývá objasněním role transkripčního faktoru NEUROD1 s ohledem na regulaci vývoje neuronů vnitřního ucha, jejich proliferaci, přežívání a inervaci. Předmětem této práce je také molekulární analýza změn v genové expresi vybraných genů.

1 Morfologie vnitřního ucha

Vnitřní ucho představuje nejkomplexnější část ucha savců. Jedná se o složitý smyslový systém, který zajišťuje detekci zvuku, prostorové vnímání a rovnováhu (tzv. sluchově-rovnovážný orgán). Je uloženo uvnitř kosti skalní a skládá se z měkkých váčků a kanálků (Čihák, 2016). Tento komplex se nazývá blanitý labyrint, jenž je vyplněn tekutinou endolymfou, která se svým složením velice podobá intracelulární tekutině – nízká koncentrace sodných iontů a vysoká koncentrace draselných iontů (Sterkers a kol., 1988; Payan a kol., 1997; Patuzzi, 2011). Blanitý labyrint je obklopen a chráněn kostěným labyrintem (Obr. 1) vyplněným perilymfou s vysokou koncentrací sodných iontů a nízkou koncentrací draselných iontů (Sterkers a kol., 1988; Ehteler a kol., 1994). Tímto složením se podobá krevní plazmě.

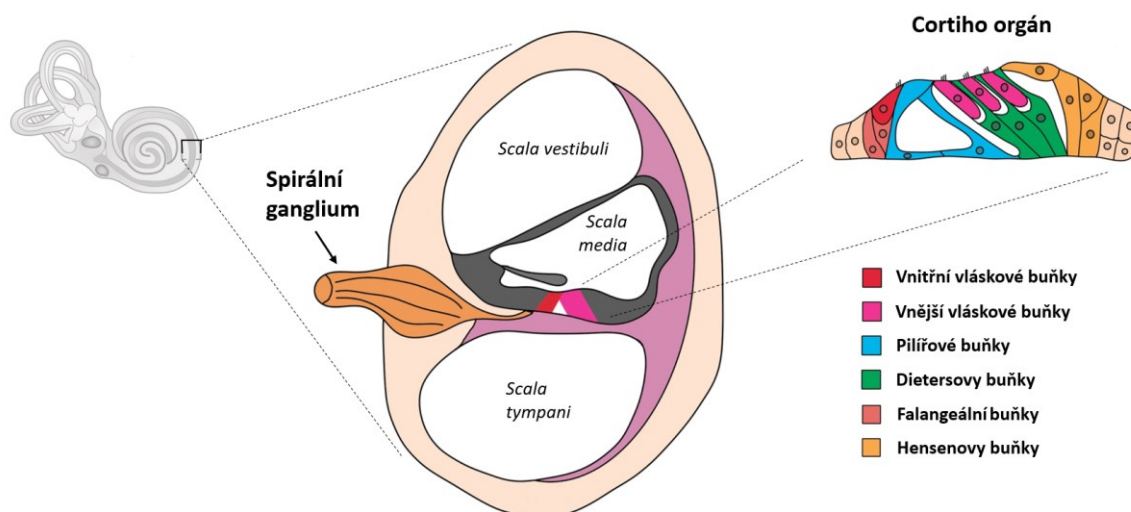


Obr. 1: Schématické znázornění lidského ucha. A: Zvukové vlny jsou zachytávány boltcem a dále vedeny zvukovodem k bubínku (zeleně). Na membránu bubínku nasedá systém tří středoušních kůstek; kladívko, kovadlinka a třmínek (červeně), které vedou signál až do vnitřního ucha. B: Vnitřní ucho se skládá ze dvou částí. Sluchovou část představuje kochlea, rovnovážný tzv. vestibulární systém je tvořen třemi polokruhovitými kanálky zakončenými ampulami a dvěma váčky; utrikulem a sakulem. Vlastní tvorba podle Davies (2020).

Vnitřní ucho se skládá ze dvou funkčních částí (Obr. 1). První z nich je kochlea (*cochlea*), ve které je uložen Cortiho orgán detekující zvuk (Slepecky, 1996; Mysliveček, 2009). Druhou funkční část představuje vestibulární neboli rovnovážný systém. Ten je tvořen třemi polokruhovitými kanálky (*ductus semicircularis*) s kristami pro detekci úhlového zrychlení a dvěma na sebe kolnými blanitými váčky – utrikulem (*utrículus*) a sakulem (*sacculus*), které detekují zrychlení lineární (Van Egmond a kol., 1949; Latash, 2008; Ekdale, 2013).

1.1 Kochlea

Kochlea je spirálovitě stočená trubice umístěná ve ventrální části vnitřního ucha, kde funguje jako primární orgán pro vnímání zvuku (Slepecky, 1996; Mysliveček, 2009). Lidská kochlea je dlouhá 35 mm a kolem kostěného kužele modiolu vytváří 2,5 otáčky (Walby, 1985; Phelps, 1992; Biedron a kol., 2009). V případě myši domácí je kochlea kratší, dosahuje délky 7 mm a kolem modiolu vytváří pouhou jednu a tři čtvrtě otáčky (Sher, 1971). Trubice kochley savců je dvěma membránami podélně rozdělena na tři části (Obr. 2). Reissnerova membrána rozděluje trubici na *scala vestibuli* a *scala media*. Bazilární membrána se pak nachází mezi *scala media* a *scala tympani*. *Scala vestibuli* a *scala tympani* jsou na vrcholku kochley (apexu) propojeny tzv. *helikotremou* a jsou vyplněny perilymfou. Prostřední částí trubice (*scala media*) probíhá blanitý labyrint vyplněn endolymfou, obsahující senzory epitel Cortiho orgánu, který je uložen na bazilární membráně (Kralíček, 2011). Ten zde stejně jako u senzory orgánů vestibulárního systému představují především specializované vláskové buňky (Obr. 2), které jsou zodpovědné za detekci mechanických akustických vibrací a jejich přeměnu na elektrický signál. Vláskové buňky Cortiho orgánu mají velice specifické uspořádání. Tvoří je vždy jedna řada vnitřních vláskových buněk a tři řady vnějších vláskových buněk (Kikuchi & Hilding, 1965; Slepecky, 1996).



Obr. 2: Příčný řez kochleou a uspořádání Cortiho orgánu. Kochleární kanál je rozdělen na tři části; *scala tympani*, *scala media* a *scala vestibuli*. V prostřední části (*scala media*) se nachází Cortiho orgán se senzory epitelem. Ten je tvořen jednou řadou vnitřních vláskových buněk a třemi řadami vnějších vláskových buněk. Mezi těmito buňkami se nacházejí různé typy podpůrných buněk, které jsou klíčové pro udržení struktury Cortiho orgánu, ale i funkce vláskových buněk. Vlastní tvorba podle Driver & Kelley (2020).

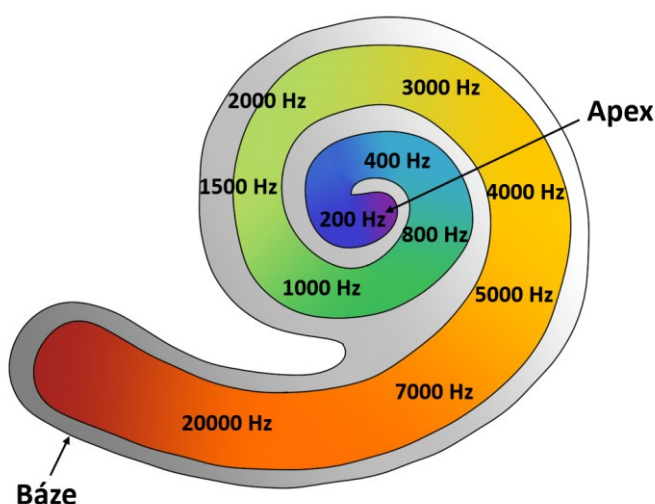
Žádná vlásková buňka však přímo nesousedí s jinou vláskovou buňkou, ale je obklopena několika typy podpůrných buněk, které jsou součástí sensorického epitelu a mají esenciální roli pro zachování rigidní struktury Cortiho orgánu díky velkému množství těsných a adhezních spojů. Podpůrné buňky také produkují složky tektoriální membrány, zajišťují potřebnou homeostázi iontů a v případě potřeby jsou pomocí fagocytózy schopny samy odstranit poškozené a nefunkční vláskové buňky. Jedná se především o Hensenovy buňky, Deitersovy buňky, pilířové buňky, falangeální buňky a hraniční buňky (Forge & Wright, 2002). Mezi vláskovými a podpůrnými buňkami probíhá aktivní komunikace díky mezerovým spojům „gap junctions“ (Chang a kol., 2008).

Vláskové buňky jsou polarizované a na apikální straně se nachází tenké výběžky (vlásky) zvané stereocilie. Jedná se o aktinem protkané modifikované a rigidní mikrokly, které jsou v případě vnějších vláskových buněk upevněny k tektoriální membráně. Každá vlásková buňka na svém apikálním povrchu nese svazek 20-300 stereocilií, přičemž jsou uspořádány do řad se zvětšující se výškou (Hudspeth, 1989). Nejdelší stereocilie se nazývá kinocilium (Sobkowicz a kol., 1995). Jedná se o jediné pravé cilium, které ale v případě vláskových buněk Cortiho orgánu u myši během vývoje po narození zaniká (Kindt a kol., 2012). Pozůstatek kinocilií u maturovaných vláskových buněk kochley nacházíme pouze ve formě bazálního tělíska (Leibovici a kol., 2005). Oproti tomu kinocilie vláskových buněk ve vestibulárním systému přetrvávají po celý život jedince a k degradaci nedochází. Stereocilie v řadě nejbližší kinocilia jsou nejvyšší, zatímco stereocilie v sousedních řadách jsou kratší, což vytváří vzor schodiště (Frishkopf & DeRosier, 1983; Holton & Hudspeth, 1983). V případě vnitřních vláskových buněk tvoří stereocilie jednu téměř rovnou či lehce zaoblenou řadu a několik dalších nižších řad. U vnějších vláskových buněk stereocilie formují několik řad tvarem připomínající písmeno W (Hudspeth, 2008). Počet stereocilií na každé vnější vláskové buňce lineárně klesá se vzdáleností od báze k apexu kochley, oproti tomu délka stereocilií má opačný gradient a v apexu nalezneme nejdelší stereocilie, zatímco v bázi ty nejkratší (Tilney & Saunders, 1983; Wright, 1984). Sousední stereocilie na jedné vláskové buňce jsou vzájemně propojeny pomocí extracelulárních proteinových vláken tzv. „tip links“ (Goodyear a kol., 2005), které jsou důležité v procesu mechanotransdukce.

Mechanotransdukce je klíčovou úlohou vnitřních vláskových buněk, kdy dochází k přeměně mechanických vln na elektrické impulzy (Hudspeth, 1989; Kozlov a kol., 2007). Zvuková vlna zachycená boltcem vnějšího ucha putuje zvukovodem, kde rozpohybuje bubínek. Vlna se dále přenáší pomocí středoušních kůstek až k oválnému okénku. Vzniklé vibrace rozpohybují perilymfu a v reakci na pohyb perilymfy se rozpohybuje také bazilární membrána a na ní spočívající Cortiho

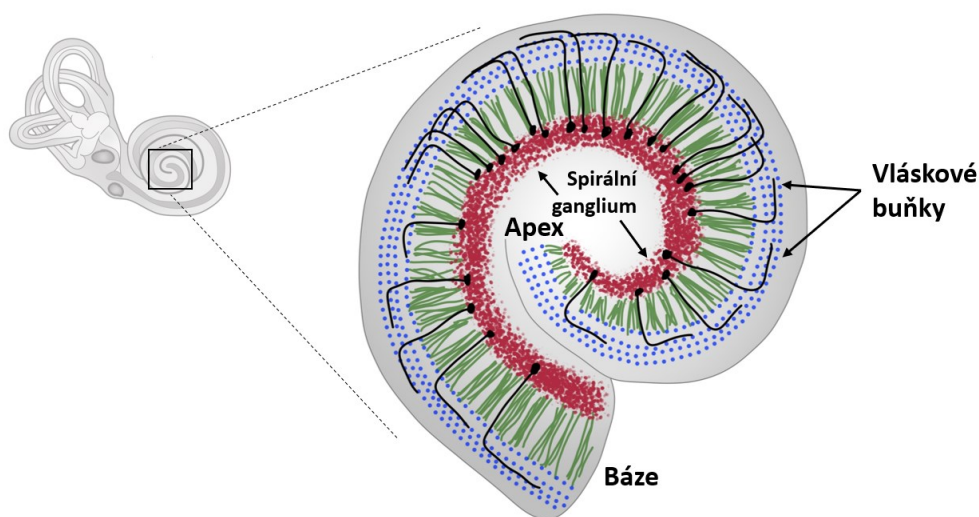
orgán s vláskovými buňkami. Tento pohyb vede k ohybu sterocilií zanořených do tektoriální membrány směrem k bazálnímu tělísku, čímž dochází k otevření mechanicky ovládaných iontových kanálů na apikální straně vnitřních vláskových buněk a k přílivu draselných iontů do cytoplazmy sensorických buněk. Příliv těchto iontů způsobuje depolarizaci a tím i změnu membránového potenciálu (Králíček, 2011). Na tuto změnu reagují otevřením napěťově řízené kanály umístěné na bazolaterální straně vláskových buněk, díky čemuž do cytoplazmy začnou proudit vápenaté ionty (Robertson & Paki, 2002). Jejich příliv do buňky způsobí vylití neurotransmiteru glutamátu ze synaptických váčků vnitřní vláskové buňky na synaptická nervová zakončení a dochází k přenosu vzruchu na aferentní bipolární neurony spirálního ganglia, odkud je signál sluchovou dráhou přenesen až do mozkové kůry (Glowatzki & Fuchs, 2002).

Celý tento proces zajišťují vnitřní vláskové buňky kochley, zatímco vnější vláskové buňky plní mechanickou úlohu kochleárního zesilovače vibrací díky transmembránovému proteinu prestinu (Lieberman a kol., 2002; Cheatham a kol., 2004). Na vnímání zvuku se kromě vnitřních a vnějších vláskových buněk podílí také bazilární membrána. Ta po celé délce kochley nemá stále stejnou stavbu. V bazální části je užší a tužší, zatímco v apexu širší a pružnější. Tato jedinečná struktura bazilární membrány umožňuje vláskovým buňkám rozdílné vnímání frekvencí a jejich depolarizaci podle místa, kde se v kochleě nachází. Jedná se o tzv. tonotopické uspořádání (Obr. 3), kdy jsou vyšších frekvence detekovány v bázi a nižší frekvence v apexu kochley (Ehret, 1978; Mysliveček, 2009).



Obr. 3: Tonotopické uspořádání lidské kochley. Díky rozdílné šířce a tuhosti bazilární membrány v různých částech kochley detekují vláskové buňky sensorického epitelu rozdílné tóny podle místa, kde se nacházejí. V apexu kochley detekují vláskové buňky tóny o nízké frekvenci, naopak vláskové buňky v bázi detekují vysokofrekvenční tóny. Vlastní tvorba podle Lahav & Skoe (2014).

Inervaci vláskových buněk kochley zajišťují dva typy neuronů spirálního ganglia a jejich aferentní vlákna, které vytvářejí v kochlee svazky tzv. radiálních vláken (Perkins & Morest, 1975). Těla těchto neuronů se nacházejí ve spirálním neboli tzv. Rosenthalově kanále. Sensorické neurony I. typu tvoří naprostou většinu spirálních neuronů (90-95 %). Jedná se o bipolární neurony s jedním axonem a jedním denritem. Prostřednictvím svých periferních myelinových dendritů inervují výhradně vnitřní vláskové buňky a přenášejí sluchovou informaci do mozkového kmene prostřednictvím centrálních axonových vláken. Každý spirální neuron I. typu inervuje vždy pouze jednu vláskovou buňku, ale zároveň se na jedné vláskové buňce nachází nervová zakončení z 5-30 neuronů I. typu (Dannhof & Bruns, 1993). Synapse mezi vnitřní vláskovou buňkou a spirálním neuronem I. typu se nazývají „ribbon“ synapse. Zbýlých 5-10 % tvoří sensorické pseudounipolární neurony II. typu, jejichž vlákna jsou nemyelinovaná a inervují pouze vnější vláskové buňky (Weisz a kol., 2009). Jedno vlákno těchto neuronů inervuje několik vnějších vláskových buněk zároveň a na rozdíl od neuronů I. typu, nejsou tyto neurony aktivovány zvukovými vjemy ani se nepodílejí na přenosu zvukové informace do mozku. Pravděpodobně však hrají roli ve vnímání poškození vnějších vláskových buněk a signalizaci bolesti (Flores a kol., 2015; Liu a kol., 2015). Uspořádání vláskových buněk a jejich inervace neurony spirálního ganglia je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Uspořádání spirálního ganglia. Inervaci vláskových buněk zajišťují aferentní vlákna sensorických neuronů spirálního ganglia, které se táhne po celé délce kochley od báze po apex. Těla těchto neuronů jsou na obrázku vyznačena červeně. Vláškové buňky jsou znázorněny modrou barvou. Vnitřní vláskové buňky jsou inervovány radiálními vlákny neuronů I. typu (zelená vlákna), naopak tři řady vnějších vláskových buněk inervují radiální vlákna neuronů II. typu (černá vlákna). Vlastní tvorba podle Druckendrod & Goodrich (2015).

Kromě těchto dvou typů vláken aferentních neuronů spirálního ganglia se na inervaci vláskových buněk kochley podílejí také eferentní vlákna z mozkového kmene, konkrétně z olivárních jader (*oliva superior*). Tato vlákna zpětně kontrolují synapse aferentních vláken se všemi vláskovými buňkami, moduluji jejich senzitivitu a vytváří charakteristický intraganglionický svazek (IGSB), který se obtáčí podél spirálního ganglia (Mescher, 2010).

1.2 Vestibulární systém

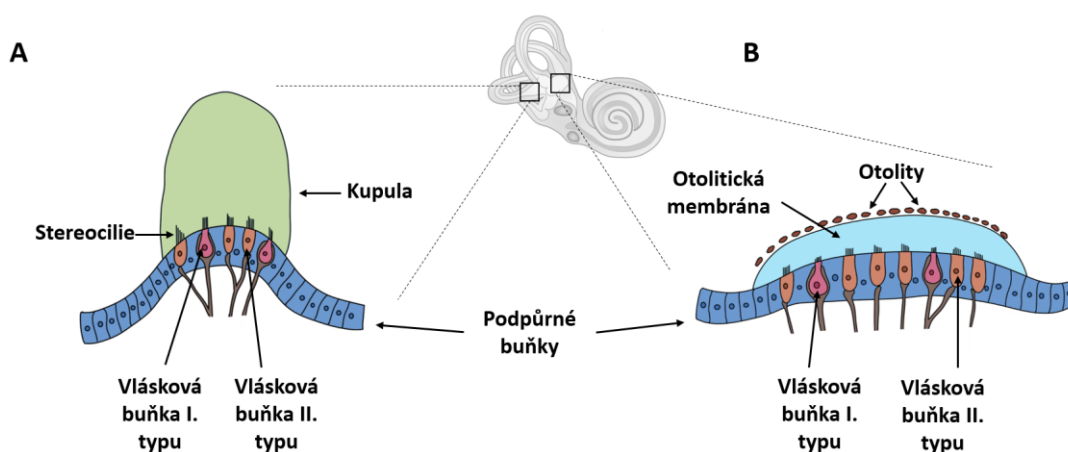
Vestibulární neboli rovnovážný systém je u savců druhou funkční a nezbytnou částí vnitřního ucha. Skládá se z pěti blanitých orgánů vyplněných endolymfou (Obr. 1). Jedná se o dva na sebe kolmé váčky sakulus a utrikulus a tři polokruhovitě kanálky s lahovitými rozšířeními zvanými ampuly (Forge & Wright, 2002; Angelaki & Cullen, 2008). Esenciální úlohou vestibulárního systému je detekce úhlového a lineárního zrychlení, které zajišťují vnímání polohy hlavy vůči tělu a udržení rovnováhy (Van Egmond a kol., 1949; Latash, 2008). Stejně jako v případě kochley jsou i zde za udržení funkce zodpovědné vláskové buňky sensorického epitelu.

Apikální strana vestibulárních vláskových buněk podobně jako v případě vláskových buněk kochley nese výběžky zvané stereocilie. Na povrchu vláskových buněk se nachází 70-100 stereocilií protkaných aktinem a pouze jediné tubulinové kinocilium převyšující stereocilie. Na rozdíl od vláskových buněk Cortiho orgánů zde kinocilium přetrvává i po narození a v průběhu vývoje nezaniká (Silver a kol., 1998; Khan & Chang, 2013). Vláškové buňky vestibulárního ústrojí jsou dvojího typu. Méně zastoupený I. typ vláskových buněk má kulatou bázi obklopenou kalichem (*calyx*) aferentního nervového vlákna. Výrazně pak převažuje II. typ vláskových buněk cylindrického tvaru, na jejichž bazální část navazuje nervové vlákno s knoflíkovým (*bouton*) synaptickým zakončením (Mescher, 2010).

Vestibulární systém má dva typy sensorického epitelu. První typ sensorického epitelu je uložen v ampulách (*ampulla membranacea*) polokruhovitých kanálků. Všechny tři ampuly obsahují kristu (*crista ampullaris*), ve které se nachází sensorický epitel tvořený vláskovými a podpůrnými buňkami. Jedná se o orgán zajišťující detekci úhlového zrychlení (Latash, 2008). Buňky jsou v kristách zanořeny do gelové membrány (Obr. 5), kupuly (*cupula ampullaris*). Rotací hlavy dochází k přelévání endolymfy polokruhovitými kanálky, čímž dochází k vychýlení kupuly ze své osy a stimulaci vláskových buněk (Králiček, 2011). V případě váček sakulu a utrikulu se jedná o orgány zvané makuly (*maculae staticae*), kde je sensorický epitel uspořádán obdobně jako v kristách (Obr. 5). Obě makuly spolu svírají pravý úhel, a zatímco makula utrikulu zaznamenává pohyb v horizontální rovině, makula sakulu detekuje pohyb v rovině vertikální (Flock, 1964; Latash, 2008). Kinocilie a stereocilie vláskových buněk obou makul jsou překryté gelovou vrstvou. Jedná

se o otolitickou membránu, na které se na rozdíl od kupuly krist nacházejí krystalky uhličitanu vápenatého tzv. otolity. Při lineárním pohybu nebo naklonění hlavy dochází vlivem gravitace k přesunutí otolitů po otolitické membráně a následnému ohybu stereocilií vláskových buněk (Lins a kol., 2000; Jaeger a kol., 2002).

Vláskové buňky vestibulárního systému jsou inervovány aferentními vlákny vestibulárního ganglia, která společně s vlákny spirálního ganglia opouštějí vnitřní ucho jako tzv. sluchově rovnovážný (VIII.) hlavový nerv (*nervus vestibulocochlearis*) (Wilson, 1979; Čihák, 2016).



Obr. 5: Uspořádání senzického epitelu ve vestibulárních orgánech. A: Senzorický epitel ve třech kristách vestibulárního systému je zanořen do gelové membrány, kupuly. **B:** V makulách utrikulu a sakulu je senzický epitel překryt gelovou otolitickou membránou, nad kterou jsou uloženy krystalky uhličitanu vápenatého (otolity). Vlastní tvorba podle de Lahunta & Glass (2009); Jiang a kol. (2021).

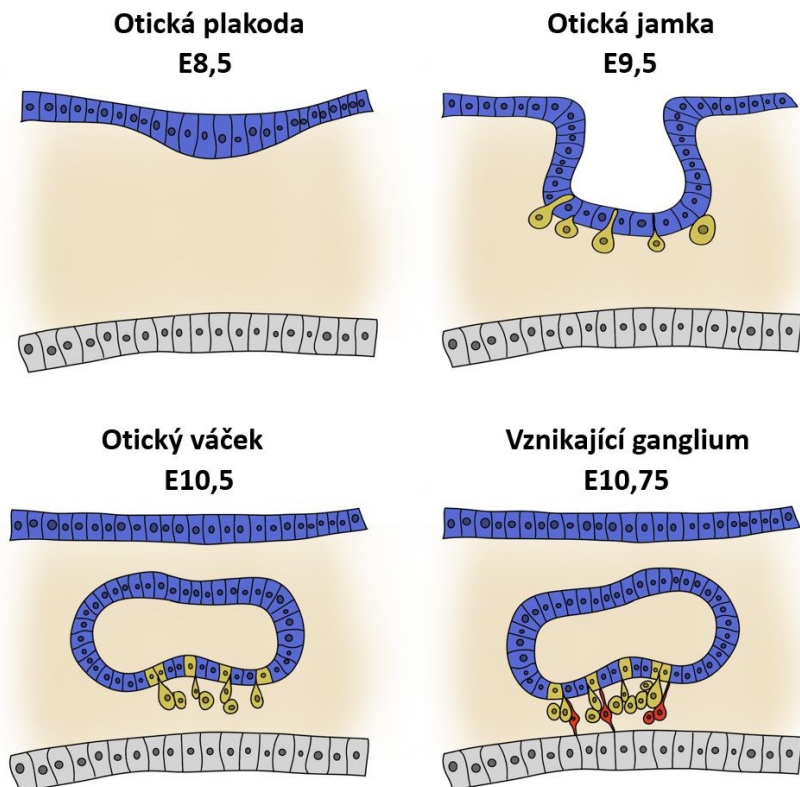
2 Morfologický vývoj vnitřního ucha myši domácí

Nejenom z hlediska morfologické struktury, ale také po vývojové stránce jsou si sluchově-rovnovážné orgány ucha myši domácí (*mus musculus*) a člověka velice podobné. Skutečnost, že model myši domácí disponuje krátkým vývojovým cyklem, poměrně početným potomstvem, ale také představuje relativně nenáročný organismus k chovu, činí z myši domácí jeden z nejčastěji volených modelových organismů ke studiu problematiky vnitřního ucha savců. Existuje zde v neposlední řadě také velká genetická homologie s člověkem a z těchto důvodů byl pro studium a účely této diplomové práce zvolen modelový organismus myši domácí. Následující kapitoly jsou proto věnovány vývoji vnitřního ucha u myši.

Vnitřní ucho se začíná formovat ze zesílené části ektodermu v blízkosti zadního mozku, tzv. otické plakody (Obr. 6) kolem embryonálního dne 8,5 (E8,5). Postupnou invaginací buněk otické plakody z okolního ektodermu vzniká nejprve otická jamka a následně po jejím uzavření otický váček neboli otocysta v embryonálním věku E10,5 (Streit, 2001). Během invaginačního procesu dochází k ustanovení anterior-posteriorní osy vznikajícího vnitřního ucha (Bok a kol., 2011). Při uzavírání a vzniku otického váčku je ustanovena taktéž dorzo-ventrální osa, která otický váček rozděluje na část vestibulární (místo vzniku rovnovážných orgánů) a část sluchovou (místo vzniku kochley).

Prostřednictvím procesu delaminace se z epitelu otické jamky a posléze otického váčku (Obr. 6) již v E9 postupně oddělují neurální prekurzorové buňky tzv. neuroblasty a migrují do místa, kde vytváří základ tzv. statoakustického ganglia (předchůdce spirálního a vestibulárního ganglia). Tyto buňky dále diferencují v neurony a mezi E9,5 a E14,5 dochází k separaci původního společného ganglia na dvě samostatná ganglia; vestibulární a spirální (Ma a kol., 2000).

Poměrně jednoduchá epiteliální struktura otického váčků dále prochází četnými procesy a komplexními změnami, které ji až do postnatálního dne 15 (P15) přeměňují na sofistikovaný labyrint vnitřního ucha se vznikem všech orgánů sluchu a rovnováhy. Jeden z těchto procesů je vznik kochleárního kanálu na ventrální části prodlužujícího se otického váčku kolem E11,5 a jeho růst a prodloužování až do doby po narození. Nejdrastičtější prodloužením však kochlea prochází mezi E11,5 a E15,5 (Kopecky a kol., 2012). Dále kolem E12 se začíná formovat základ polokruhovitých kanálků vestibulárního systému v dorzální části jako rozšiřující se primordium. Následnou resorpcí okolní tkáně vznikají všechny tři polokruhovité kanálky (E13) a ve stejnou dobu již můžeme rozeznat také váčky utrikulus a ventrálně od něj sakulus (Morsli a kol., 1998).



Obr. 6: Časný vývoj vnitřního ucha u myšního modelu. Z otické plakody, zesílené části ektodermu (modře), se procesem invaginace vytváří otická jamka. Po jejím uzavření vzniká otický váček (otocysta), ze kterého delaminují neuroblasty (žlutě). Postupnou migrací a diferenciací neuroblastů dochází k vytvoření statoakustického ganglia tvořeného neurony (červeně). Šedé buňky znázorňují neurální trubici. Vlastní tvorba podle Magariños a kol. (2012).

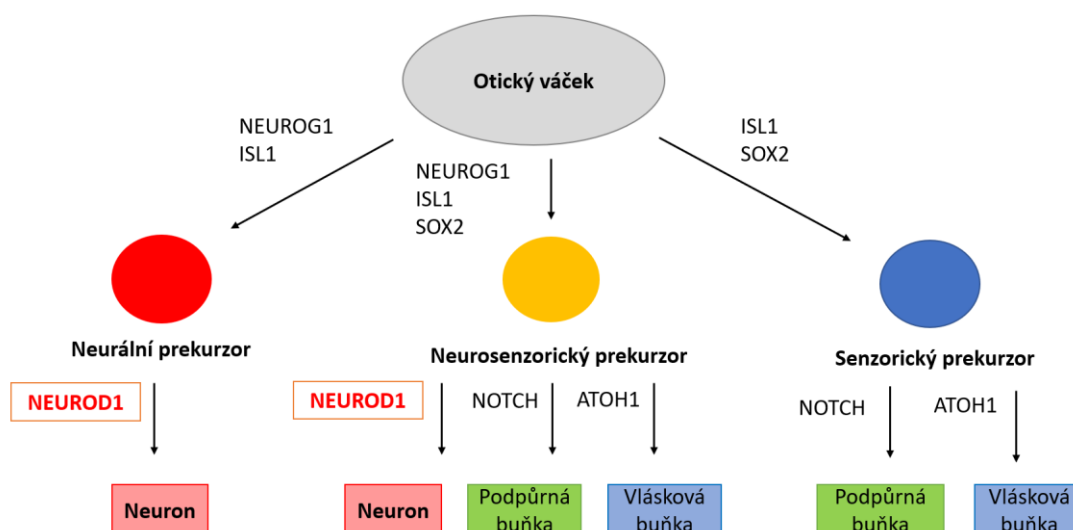
Všechny orgány se dále vyvíjejí a získávají finální podobu. Kochlea se prodlužuje a v E15 má již délku jeden a půl otáčky. V tuto dobu jsou patrné také kupulovité ampuly, ve kterých vznikají krysty. Ve věku E17 je kochlea prodloužena do konečné jedné a tři čtvrtě otáčky (Morsli a kol., 1998), přesto je v tuto dobu kochlea nezralá. Až do přibližně jedenáctého dne po narození (P11) v případě báze a do P15 v případě apexu (Kopecky a kol., 2012) dochází k transformaci nezralého kochleárního kanálku na kanálek obsahující zcela funkční Cortiho orgán. V této periodě začínají myši slyšet. Během této doby dochází rovněž ke konečné maturaci a růstu buněk ve všech ostatních senzorních orgánech (Morsli a kol., 1998).

3 Molekulární regulace a specifikace buněčných typů

Morfologický vývoj úzce souvisí se specifikací a diferenciací neurosenzorických buněk, které jsou klíčové pro zpracování jak akustického, tak pohybového signálu, a tedy za kompletní zajištění správného fungování vnitřního ucha. Tento vývoj je regulován a řízen širokou sítí transkripčních faktorů a signálních molekul, které jsou nezbytné jak pro vývoj vnitřního ucha obecně, tak pro správnou specifikaci, proliferaci a diferenciaci všech typů buněk, ze kterých se vnitřní ucho skládá.

Všechny esenciální buněčné komponenty vnitřního ucha, tedy podpůrné buňky, vláskové buňky a sensorické neurony, které je inervují, vznikají z jednoho společného multipotentního progenitoru v otickém váčku již během časného embryonálního vývoje (Sapède a kol., 2012). Z tohoto společného epiteliálního progenitoru se formují tři linie buněk: prosenzorická, jež dává vznik podpůrným a vláskovým buňkám, dále proneurální, ze které naopak diferencují neurony vnitřního ucha, a nakonec neurosenzorická linie prekursorových buněk, ze které vznikají jak neurony, tak sensorické buňky vnitřního ucha (Fritzsche a kol., 2006).

Diferenciace a vývoj sensorických vláskových buněk, nesenzorických podpůrných buněk a neuronů je ve vnitřním uchu řízená a regulovaná především tzv. bHLH (basic helix–loop–helix) transkripčními faktory (Obr. 7), tedy faktory obsahujícími motiv α -šroubovice-smyčka- α -šroubovice. Jsou jimi ATOH1 („Atonal homologue 1“) pro formaci vláskových buněk (Millimaki a kol., 2007), NEUROG1 („Neurogenin 1“) pro determinaci neuronů (Andermann a kol., 2002) a NEUROD1 („Neurogenic differentiation factor 1“) pro diferenciaci a přežití neuronů (Jahan a kol., 2010a).



Obr. 7: Specifikace buněk vnitřního ucha. Na obrázku je ukázáno schématické znázornění základních transkripčních faktorů nutných pro vývoj jednotlivých buněčných komponent vnitřního ucha (Fritzsche a kol., 2006; Magariños a kol., 2012; Sapède a kol., 2012; Elliott a kol., 2021).

3.1 Specifikace proenzorické linie

Formace senzorického epitelu a vývoj vláskových buněk je s ohledem na vznik neuronů a formaci ganglií opožděn. Mezi zásadní transkripční faktory a první markery pro vývoj senzorického epitelu patří SOX2 („Sex determining region Y-box factor 2“), řadí se mezi HMG („High Mobility Group“) transkripční faktory. *Sox2* je v otocystě exprimován již od E8,5 a ve vyvíjejícím se kochleě detekujeme přítomnost SOX2 od E12,5 (Dabdoub a kol., 2008). Experimenty zabývající se delecí *Sox2* ukázaly, že nepřítomnost nebo snížená exprese *Sox2* ve vyvíjejícím se vnitřním uchu vede k narušení vývoje senzorického epitelu (nedochází k diferenciaci jak vláskových, tak ani podpůrných buněk) a následné ztrátě sluchu (Kiernan a kol., 2005). Dříve se také myslelo že je *Sox2* zásadní i pro vývoj neuronů a jeho delece vede k eliminaci všech senzorických neuronů (Puligilla a kol., 2010; Steevens a kol., 2017), jelikož se předpokládalo, že je jeho exprese nutná pro upregulaci neurálních bHLH genů jako jsou *Neurog1* (Ma a kol., 1998; Ma a kol., 2000) a *Neurod1* (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001; Jahan a kol., 2010a). Ukázalo se však, že SOX2 není zásadní v časném vývoji vnitřního ucha a exprese NEUROG1 (tedy následně i NEUROD1) je zachovaná i v nepřítomnosti SOX2 (Dvorakova a kol., 2020). Na druhou stranu, jelikož bez exprese *Sox2* nedochází k vývoji senzorického epitelu a produkci zásadních neurotrofinových ligandů nutných pro přežití neuronů, dochází k jejich masivní apoptóze. *Sox2* je tak nepřímo důležitý pro vývoj a přežití neuronů v pozdějších stádiích vývoje (Dvorakova a kol., 2020).

Mezi embryonálním dnem E13,5 a E18,5 se buňky v Cortiho orgánu rostoucí kochleě diferencují na vláskové a podpůrné buňky a jeden z nejdříve identifikovatelných diferenciačních markerů vláskových buněk je výše zmiňovaný bHLH transkripční faktor ATOH1. Ten je ve vnitřním uchu detekován již od věku E12,5 v případě vestibulárního systému a v kochleě je jeho přítomnost poprvé zaznamenána o den později; mezi E13,5 a E14,5 (Chen a kol., 2002). Úplná delece *Atoh1* vede ke kompletní ztrátě vláskových buněk, neboť bylo ukázáno, že transkripční faktor ATOH1 je esenciální pro aktivaci diferenciace vláskových buněk (Birmingham a kol., 1999). V důsledku nepřítomnosti vláskových buněk dochází také ke ztrátě buněk podpůrných (Woods a kol., 2004).

Za expresi *Atoh1* je zodpovědný především SOX2 v kooperaci s dalšími důležitými transkripčními faktory např. EYA1 („Eyes absent homolog 1“) a SIX1 („Sineoculis homeobox homolog 1“) (Ahmed a kol., 2012). Následně v již diferencovaných vláskových buňkách musí být exprese *Sox2* inhibována a zachována zůstává pouze v podpůrných buňkách, pro které je zachování vysoké exprese *Sox2* klíčové (Dabdoub a kol., 2008).

Rozhodnutí, zda se z buňky proenzorické linie stane buňka vlásková, nebo podpůrná, je řízeno procesem laterální inhibice v rámci signalizační dráhy NOTCH. Tato juxtakrinní dráha (probíhající mezi dvěma sousedícími buňkami) je evolučně konzervovaná a řídí široké spektrum

procesů napříč organismy (Neves a kol., 2013). Vlásokvé buňky s expresí *Atoh1* během dalšího vývoj iniciují expresi genů pro transmembránové proteiny JAG2 („Protein jagged-2“) a DLL1 („Delta-like protein 1“), které jsou ligandy receptoru NOTCH1 („Neurogenic locus notch homolog protein 1“) na plazmatických membránách sousedních buněk (Lanford a kol., 1999). Vazbou těchto ligandů na receptor NOTCH1 je spuštěna signalizační kaskáda, při které dochází ke zvýšení exprese genů *Hes1* a *Hes5* („*Hairy and enhancer of split-1/5*“), které působí jako negativní regulátory pro expresi *Atoh1* (Zine & de Ribaupierre, 2002). Buňka, ve které je NOTCH signalizační dráha aktivovaná, tedy buňka sousedící s vláskovou buňkou, tak nemůže exprimovat klíčový marker vláskových buněk *Atoh1* a stává se tedy podpůrnou buňkou.

Díky tomuto procesu disponuje epitel kochley svou vysoce organizovanou a unikátní strukturou, kdy je každá vlásková buňka obklopena podpůrnými buňkami, a tedy dvě vláskové buňky spolu nikdy přímo nesousedí (Lanford a kol., 1999; Zine a kol., 2000; Petrovic a kol., 2014).

3.2 Specifikace proneurální linie

Již během invaginace otické plakody a formace otického váčku dochází k zahájení neurogeneze prostřednictvím bHLH transkripčního faktoru NEUROG1 („Neurogenin1“). NEUROG1 reguluje delaminaci neuroblastů z otického váčku a zahajuje specifikaci a diferenciaci neuronů vnitřního ucha. Nejenom že delece genu *Neurog1* vede k narušení schopnosti delaminace neuroblastů, a tedy úplné ztrátě neuronů vnitřního ucha (Ma a kol., 1998; Ma a kol., 2000), absence *Neurog1* má dopad i na vývoj senzorického epitelu a tvorbu vláskových buněk v důsledku změny v expresi genu *Atoh1*. Mutanti s delecí genu *Neurog1* vykazují zkrácení kochley, a tedy i senzorického epitelu s mnohonásobnými řadami vnitřních a vnějších vláskových buněk v apexu kochley (Ma a kol., 2000; Matei a kol., 2005).

Mezi funkcí NEUROG1 a ATOH1 existuje vzájemný antagonistický vztah. *Neurog1* je exprimován v prekurzorech neuronů vnitřního ucha ještě před expresí genů nutných pro diferenciaci prosenzorické linie. Přestože je aktivita ATOH1 patrná již na počátku vývoje, úroveň hladiny proteinu ATOH1 je během neurogeneze v neuronech vnitřního ucha snížena až do pozdějších vývojových fází. Z tohoto důvodu se neurony vnitřního ucha vyvíjejí dříve než vláskové buňky. NEUROG1 zprostředkovává represi ATOH1 prostřednictvím narušení stability *Atoh1* mRNA, a tím brání tvorbě senzorického epitelu (Raft a kol., 2007; Gálvez a kol., 2017).

3.2.1 NEUROD1 transkripční regulace

Krátce po delaminaci prvních neuroblastů, tedy vznikajících neuronů, dochází k poklesu exprese *Neurog1*. Přítomnost NEUROG1 v E8,5 iniciuje expresi dalšího klíčového bHLH transkripčního faktoru NEUROD1 (Jahan a kol., 2010b).

Expresi Neurogenního diferenciačního faktoru 1 (*Neurod1*) není omezena pouze na centrální a periferní nervovou soustavu, jak by mohlo jeho pojmenování naznačovat. Tento transkripční faktor je také nezbytný pro vývoj slinivky břišní (*pancreas*), kde jeho expresi detekujeme již ve věku E9,5 ve všech endokrinních prekurzorech. Mutantní jedinci s globální delecí *Neurod1* jsou postiženi těžkou hyperglykemií a ketonurií (tedy typickými příznaky nemoci *diabetes mellitus*), v důsledku čehož krátce po narození umírají (Naya a kol., 1997).

Podstatnou roli však *Neurod1* sehrává také během vývoje vnitřního ucha a sensorických neuronů. Na aktivaci jeho exprese se podílí transkripční faktor NEUROG1 a v delaminujících neuroblastech byla exprese *Neurod1* zaznamenána již v embryonálním věku E8,75 (Liu a kol., 2000). V průběhu vývoje hladina exprese *Neurod1* klesá a v plně maturovaných neuronech se stává nedetekovatelná (Deng a kol., 2014). Ve vestibulárním sensorickém epitelu je exprese *Neurod1* zahájena s počátkem diferenciace vláskových buněk mezi E13 a E14 a přetrvává do doby, než je sensorický epitel dobře definován, kdy je exprese patrná v utrikulu, sakulu i kristách. Oproti tomu exprese ve vláskových buňkách Cortiho orgánu je detekovatelná až od věku E15,5 a je také slabší v porovnání s ostatními oblastmi vnitřního ucha, ve kterých je NEUROD1 přítomen (Liu a kol., 2000).

Na rozdíl od úplné delecce *Neurog1*, která vede ke ztrátě všech neuronů ve vnitřním uchu, má delecce *Neurod1* na neurony mírnější dopad, kdy je menší množství především vestibulárních neuronů u tohoto mutantu zachováno. V porovnání s kontrolními jedinci je snížení počtu vestibulárních neuronů 85%, zatímco ztráta neuronů spirálního ganglia představuje 95 % (Liu a kol., 2000). Zbývající neurony jsou lokalizovány v centrální části kochley blízko modiolu mimo obvyklé pozice ganglia (Kim a kol., 2001). Tyto výsledky vysvětlují zaznamenanou kompletní ztrátu sluchu, narušení rovnovážných funkcí a dále cerebrální ataxii v souvislosti s delecí *Neurod1* v mozečku (Miyata a kol., 1999; Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001). Zároveň u mutantů s úplnou delecí *Neurod1* dochází k masivní redukci neurální inervace v kochlee, kdy dochází téměř k úplné ztrátě aferentních vláken a většiny eferentních vláken (Kim a kol., 2001).

Obdobně jako mutantů s delecí *Neurog1*, vykazují mutantů s úplnou delecí *Neurod1* signifikantní zkrácení a rozšíření kochleární trubice, a tedy i sensorického epitelu s narušenou organizací vláskových buněk v apexu (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001).

K předcházení časné letality u *Neurod1* deficientních jedinců, byly pro výzkumy v této oblasti využity také tzv. tkáňově specifické delece *Neurod1* s využitím rekombinázy Cre („Cre recombinase“). Výzkum zabývající se delecí *Neurod1* pouze v buňkách exprimující *Pax2* („Paired domain gene 2“; *Pax2-Cre; Neurod1^{ff}*) ukázal, že časná delece *Neurod1* způsobuje signifikantní ztrátu spirálních a vestibulárních neuronů, zkrácení sensorického epitelu a vede k podstatným změnám exprese několika genů, které mohou přímo nebo nepřímo ovlivnit určení buněčného osudu prekursorových buněk. Expresi *Neurod1* v neurosensorických prekurzorech potlačuje expresi „downstream“ genů např. *Atoh1*, *Pou4f3* („POU class 3 homeobox 4“), *Nhlh1* („Nescient helix-loop-helix 1“), *Fgf8* („Fibroblast growth factor 8“) a *Sox2*, které jsou nezbytné pro obecnou neurosensorickou a specifickou diferenciaci vláskových buněk. Chybějící NEUROD1 inhibice vede k předčasné expresi těchto genů v apikální části kochley u mutantů, a zároveň dochází k diferenciaci ektopických vláskových buněk uvnitř sensorických ganglií z důvodu exprese *Atoh1*. Zvýšením exprese *Fgf8* v důsledku delece *Neurod1* dochází k přeměně vnějších vláskových buněk na vnitřní vláskové buňky. Přestože bazální část kochley nevykazovala známky narušení uspořádání vláskových buněk, v apikální polovině kochley autoři studie zaznamenali zmnožené řady vnitřních a vnějších vláskových buněk. V nejapikálnější části apexu kochley pak byly detekovány částečně zdvojené řady vnitřních vláskových buněk, zatímco vnější vláskové buňky úplně chyběly (Jahan a kol., 2010b).

Jak ukazují výsledky další studie těchto autorů, *Neurod1* není nutný pouze pro vznik a přežití většiny spirálních a vestibulárních neuronů, ale je také esenciální pro jejich správnou migraci do ganglií a následnou segregaci aferentních neurálních vláken. Při absenci *Neurod1* ve vnitřním uchu u *Pax2-Cre; Neurod1^{ff}* mutantů se zbývající kochleární a vestibulární aferentní vlákna nedokážou oddělit a vstupují do další části sluchové dráhy (tedy kochleárního jádra) jako jediný smíšený nerv namísto dvou samostatných. Tato zjištění jsou v souladu s detekcí smíšené populace přežívajících vestibulárních a spirálních neuronů tvořící společné ganglion, které je uloženo mimo svou obvyklou pozici v porovnání s kontrolními jedinci (Jahan a kol., 2010a).

Současně mají mutanti výrazně redukováná radiální vlákna a inervace kochley je podstatně omezena. U těchto mutantů navíc spirální vlákna I. typu inervují několik vnitřních vláskových buněk a zbylá eferentní vlákna nikdy neformují typický intraganglionický spirální svazek jako kontrolní jedinci (Jahan a kol., 2010a).

Později se ukázalo, že delece *Neurod1* u *Pax2-Cre; Neurod1^{ff}* mutantů je ve vnitřním uchu neúplná (Pan a kol., 2011). Bylo zjištěno, že aktivita *Pax2-Cre* v průběhu embryonálního vývoje klesá (Duncan & Fritsch, 2013). Proto je možné, že využitím tohoto mutantu se nepodařilo odhalit

všechny funkce *Neurod1* pro vývoj vnitřního ucha, a z tohoto důvodu byly pro následné analýzy využity jiné rekombinační modely.

Využitím nového rekombinačního modelu s podmíněnou delecí *Neurod1* pouze v buňkách exprimující *Isl1* („Insulin gene enhancer protein ISL-1“; *Isl1-Cre; Neurod1^{ff}*) byl vytvořen mutant s opožděnou podmíněnou delecí *Neurod1* pouze ve vnitřním uchu, přičemž exprese *Neurod1* v kochleárních jádrech a středním mozku zůstala zachována (Macova a kol., 2019). Tito mutanti nevykazovali žádné defekty či abnormality v motorické aktivitě, které by naznačovaly poškození vestibulárního systému. Rovněž v postnatálním věku P0 (tedy v den narození) zůstala zachována i struktura Cortiho orgánu s třemi řadami vnějších vláskových buněk a jednou řadou vnitřních vláskových buněk. Struktura Cortiho orgánu v postnatálním věku P7 však odhalila dezorganizaci vnějších vláskových buněk a podpůrných pilířovitých buněk v apexu kochley. Kochlea byla u mutantů zkrácena o 40 % a některé vnější vláskové buňky byly přeměny na vnitřní vláskové buňky. Tento fenotyp zaznamenané transdiferenciace vnějších vláskových buněk Cortiho orgánu na vnitřní vláskové buňky byl porovnatelný s výsledky předchozích studií delecí *Neurod1* (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001; Jahan a kol., 2010a).

Největší defekty této delecí autoři zaznamenali v souvislosti s neurony spirálního ganglia (Macova a kol., 2019). Počet těchto neuronů byl signifikantně redukován, neurony byly různě rozptýleny a v některých částech ganglia úplně chyběly (např. v nejapikálnější části apexu), což souvisí s jejich poškozenou migrací. V P0 byl úbytek spirálních neuronů v kochlee 80% a zbylé neurony byly bez změny udržovány během postnatálního vývoje až do dospělosti. Radiální vlákna byla zredukována, prodloužena a mezi jednotlivými svazky těchto vláken byly detekovány větší mezery. Zároveň se nezformoval intraganglionický svazek eferentních vláken. Nesprávně lokalizované spirální neurony u mutantních jedinců vytvořily společně s vestibulárními neurony zvětšené sluchově-vestibulární ganglion. Segregace centrálních axonů byla rovněž ztracena, protože aferentní vlákna neuronů z báze a apexu se zcela překrývala s vestibulárními axony ve sluchově-vestibulárním nervu. Tato data rovněž potvrzují již dříve zaznamenanou neobvyklou migraci a tvorbu společného sluchově-vestibulární ganglia u *Pax2-Cre; Neurod1^{ff}* mutantů (Jahan a kol., 2010a). Jednotlivé neurony ganglia vykazovaly také mnohočetné rozvětvení v kochlee.

Výsledky této studie ukázaly, že absence *Neurod1* nemá vliv pouze na přežívání neuronů, ale ovlivňuje také tonotopickou organizaci kochley, což má za následek narušení a dezorganizaci primární tonotopické mapy a změnu rysů sluchové dráhy u mutantních myší. NEUROD1 má tedy mimořádně významnou funkci v regulaci neurálního větvení, organizaci aferentních a eferentních vláken a v celkové tonotopické organizaci sluchového systému (Macova a kol., 2019).

Další pokroky na poli studia funkce *Neurod1* ve vnitřním uchu přinesly dvojité podmíněné delece genu *Neurod1* a zároveň *Atoh1* ve všech ISL1 pozitivních buňkách (Filova a kol., 2020). Kombinovaná delece *Atoh1* a *Neurod1* má za následek ztrátu všech sensorických vláskových buněk i podpůrných buněk a vede k vytvoření neobvykle husté a propletené sítě neurálních vláken v kochle. Přeživší neurony postrádající *Neurod1* jsou schopny inervovat nevyvinutý epitel v oblasti předpokládaného Cortiho orgánu bez diferencovaných sensorických buněk, což naznačuje, že nevyžadují pro růst axonů přítomnost vláskových buněk. Zároveň byly tyto neurony masivně redukovány a hustá vlákna byla detekována především v apexu kochley. Kochlea u dvojitého *Atoh1/Neurod1* mutanta je ještě více zkrácená ve srovnání s mutanty s jinými podmíněnými delecemi *Neurod1*, což naznačuje další dosud nepopsané genové interakce mezi těmito dvěma bHLH transkripčními faktory.

Některé spirální neurony byly translokovány a společně s neurony vestibulárního ganglia vytvořily aberantní sluchově-vestibulární ganglium podobně jako v předešlém výzkumu (Macova a kol., 2019). V souvislosti s tím nebyly centrální axony segregovány do dvou samostatných nervů, ale překrývající se vlákna vytvořila společný sluchově-vestibulární nerv. Data této studie ukazují, že *NEUROD1* reguluje migrační schopnosti neuronů a také správné zapojení spirálních neuronů do kochleárního jádra nezávisle na *ATOH1*, o čemž svědčí chybná migrace spirálních neuronů a stejná dezorganizace centrálních axonů v kochleárním jádře jak u podmíněné delece *Neurod1* (Macova a kol., 2019), tak u kombinované delece *Atoh1/Neurod1* (Filova a kol., 2020).

Zmíněné výzkumy však stále neobjasnily detailnější poznatky o účincích časné delece *Neurod1* ve vyvíjejících se neuroblastech a vzniku vnitřního ucha. Pro hlubší pochopení této problematiky se nejnovější studie (Filova a kol., 2022) zaměřila na podmíněnou deleci *Neurod1* ve všech *Foxg1* („Forkhead box protein G1“) pozitivních buňkách (*Foxg1-Cre; Neurod1^{ff}*). Bylo totiž dokázáno, že transgen *Foxg1-Cre* vede ještě k dřívější rekombinaci, a tedy i dřívější eliminaci *Neurod1* v porovnání s již dříve zkoumanými *Cre* rekombinačními modely v otické plakodě a vznikajícím vnitřním uchu (Duncan & Fritsch, 2013; Dvorakova a kol., 2020). Zároveň *Foxg1-Cre* není exprimován ve sluchových a vestibulárních jádrech, čímž se vyloučila možnost, že by absence *Neurod1* v těchto jádrech mohla ovlivnit životaschopnost neuronů ve vnitřním uchu (Hébert & McConnell, 2000; Bérubé a kol., 2005).

Mutantní jedinci (*Foxg1-Cre; Neurod1^{ff}*) se rodili signifikantně menší, což značí abnormality během embryonálního vývoje a ani v postnatálním období tito jedinci neprospívali a trpěli závažnou ataxií v porovnání s kontrolami. Kochlea mutantů byla v embryonálním věku E18,5 výrazně zkrácena a sensorický epitel Cortiho orgánu těchto jedinců dosahoval pouze 47% délky epitelu kontrolních embryí. V apexu dospělců byla detekovaná také narušená struktura

senzorického epitelu s větším množstvím řad vnějších vláskových buněk, ektopickými vnitřními vláskovými buňkami mezi vnějšími a dvě řady vnitřních vláskových buněk, zatímco v bázi některé vnější vláskové buňky chyběly. Redukce velikosti sensorických epitelů byla detekována rovněž u vestibulárních orgánů a inervace sensorického epitelu v kochleee byla signifikantně narušena. Radiální vlákna byla silně redukována a dezorganizována, s čímž souvisí detekce pouze rudimentálního spirálního ganglia v blízkosti kochleární báze a vestibulárního váčku sakulu. Některé neurony byly navíc zapletené mezi radiální vlákna, tedy mimo obvyklé pozice uvnitř spirálního ganglia.

Zmenšené bylo taktéž vestibulární ganglium tvořeno mixem vestibulárních a spirálních neuronů. Tyto výsledky naznačují významnou ztrátu neuronů, závažné abnormality při tvorbě spirálního ganglia, segregaci vestibulárního a spirálního ganglia, inervaci a migraci neuronů. V embryonálním věku E10,5 autoři výzkumu porovnávali velikost vznikajícího ganglia a zjistili závažnou 53% redukci velikosti ganglia u mutantů v porovnání s kontrolami. Zároveň byl o 80 % snížen také počet ISL1 pozitivních buněk (charakteristický buněčný marker neuronů ganglia). Proliferace neuroblastů postrádajících NEUROD1 nebyla u mutantních jedinců ovlivněna, což naznačuje, že NEUROD1 není, alespoň v embryonálním věku E10,5, potřebný k proliferaci neuronů ve vyvíjejícím se vnitřním uchu (Filova a kol., 2022). U mutantů však byla detekována masivní apoptóza, a tyto výsledky potvrzují, že NEUROD1 je důležitý pro přežití neuronů už v raných fázích jejich vývoje (Liu a kol., 2000; Filova a kol., 2022) .

Neurony, které u těchto mutantů zůstaly zachovány vytvářely silně redukována, nesegregovaná a dezorganizovaná centrální vlákna (Filova a kol., 2022), a tyto abnormality se shodují s abnormalitami rozdílných delecí *Neurod1* (Kim a kol., 2001; Jahan a kol., 2010a; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020). Stejně jako u jiných mutantů s delecí *Neurod1* se však nepodařilo oddělit sekundární účinky delece *Neurod1* v neuronech vnitřního ucha na vývoj sensorických buněk kvůli aktivitě *Foxg1-Cre* nejenom v neuronech, ale také v sensorických prekurzorech. Nicméně některé účinky této delece vykazovaly výraznější charakter než u mutantů s opožděnou delecí *Neurod1*, což naznačuje časovou závislost eliminace *Neurod1* (Filova a kol., 2022).

Dalším klíčovým krokem, který by mohl významně přispět k ještě komplexnějšímu pochopení role *Neurod1* ve vývoji sensorických neuronů vnitřního ucha, by mohlo být vytvoření experimentálního myšího modelu s omezenou delecí *Neurod1* pouze v sensorických neuronech bez ovlivnění okolního sensorického epitelu.

3.2.2 Další významné regulační molekuly

Ve vývoji neuronů vnitřního ucha je zapojená celá řada dalších transkripčních faktorů a molekul. Opět zde existují vzájemné vztahy a komplexní sítě interakcí, jejichž kombinovaným a vzájemným působením dochází k vysoce přesné regulaci vývoje nejenom sensorických neuronů vnitřního ucha. Níže je stručně zmíněno několik z nich, které jak se ukazuje, mají úzkou souvislost s transkripční regulací *NEUROD1* a byly proto zvoleny jako součást výzkumu této diplomové práce.

Prvním transkripčním faktorem, o kterém je známo, že se specificky podílí na pozdní diferenciaci sensorických neuronů vnitřního ucha, je transkripční faktor *POU4F1*. Patří do rodiny transkripčních faktorů s homeodoménou *POU* a je důležitý pro časnou neurogenезi, migraci neuronů a počáteční navádění axonů spirálních neuronů (Fariñas a kol., 2001). Jeho delece má za následek podstatné snížení velikosti neuronů, abnormální migraci neuronů a absence tohoto faktoru vede k selhání přežívání již maturovaných neuronů, protože pozitivně reguluje expresi neurotrofinových receptorů (McEvelly a kol., 1996; Huang a kol., 1999; Huang a kol., 2001).

ISL1 je transkripční faktor patřící do rodiny LIM-homeodoménových proteinů („*LIN-11, Isl-1 and MEC-3*“). Jeho exprese je důležitá během vývoje neurálních i jiných typů buněk, včetně motorických, sensorických a sympatických neuronů (Sun a kol., 2008; Bohuslavova a kol., 2019), endokrinních buněk slinivky břišní (Ahlgren a kol., 1997) a srdečních buněk (Cai a kol., 2003). Během vývoje ucha je *Isl1* exprimován v diferencujících neuronech ve vznikajícím statoakustickém gangliu a v prosenzorických prekurzorech v uchu (Radde-Gallwitz a kol., 2004; Dvorakova a kol., 2016; Filova a kol., 2020). Bylo ukázáno že *ISL1* má pravděpodobně důležitou roli při udržování funkce neuronů a vláskových buněk a může mít i roli během samotné specifikace a diferenciaci neuronů a sensorických buněk (Huang a kol., 2001; Chumak a kol., 2016; Bohuslavova a kol., 2017).

NHLH1 patří mezi bHLH transkripční faktory exprimované v diferencujících neuronech a ve vnitřních a vnějších vláskových buňkách Cortiho orgánu. Je pravděpodobné, že *NHLH1* se ve spolupráci s *NEUROD1* podílí na udržení a diferenciaci vestibulárních neuronů, a zřejmě přispívá k přežití mnoha vestibulárních a několika spirálních neuronů u myších mutantů s delecí *Neurod1* (Jahan a kol., 2010a). Kombinovaná delece *Neurod1* a *Nhlh1* ukázala ztrátu téměř všech sensorických neuronů, což naznačuje určitou zastupitelnost obou transkripčních faktorů. Protože je *NHLH1* aktivní pouze v postmitotických neuronech, je možné, že hraje roli taktéž v migraci neuronů (Krüger a kol., 2006).

Další z rodiny bHLH transkripčních faktorů stěžejních pro neurogenезi je *BHLHE22* („Basic Helix-Loop-Helix Family Member E22“), také známý jako *BHLHB5*. Dosud nebyly přesně a detailně objasněny vztahy mezi *BHLHE22* a dalšími transkripčními faktory, které jsou známé svou klíčovou rolí v neurální diferenciaci. Přesto je z lokalizace jeho exprese během neurogenезe

pravděpodobné, že BHLHE22 patří mezi klíčové hráče v tomto procesu (Brunelli a kol., 2003). Kromě toho experimenty odhalily, že BHLHE22 je exprimovaný v dorzálních kochleárních jádrech během vývoje a že je nezbytný pro jejich správný vývoj, protože myši postrádající BHLHE22 vykazovaly dramaticky snížený počet neuronů v těchto jádrech (Cai a kol., 2016).

Morfogen SHH („Sonic hedgehog“) je důležitý už v raných stádiích morfogeneze vnitřního ucha. Jeho exprese je detekovaná v blízkosti otického váčku již od embryonálního věku E10,5 a podílí se na specifikaci neuronů, tvorbě kochley a také vytváření chrupavčitého obalu vnitřního ucha, který v postnatálním období osifikuje a mění se na kostěný labyrint, který chrání vnitřní ucho (Liu a kol., 2002).

Ephrin-B2 je protein kódovaný genem *Efnb2* („*Ephrin B2*“), patřící do EPH skupiny genů. Samotné efriny a jejich receptory tvoří největší podrodinu receptorových tyrozinkináz a jsou zapojeny do zprostředkovávání vývojových procesů, především pak v nervovém systému. Signalizace mezi ephriny a jejich receptory zprostředkovává navádění axonů, migraci a proliferaci buněk, tvorbu tkáňového rozhraní, a synaptogenezi. Bylo ukázáno, že tato signalizace je nutná pro normální homeostázu endolymfy, vestibulární funkce a morfogenezi endolymfatického epitelu vnitřního ucha (Raft a kol., 2014).

EPHA5 neboli „Ephrin type-A receptor 5“ patří do podrodiny efrinových receptorů z rodiny protein-tyrozinkináz. Receptory Eph se podílejí na migraci neuronů a navádění axonů během časného vývoje sluchové dráhy (Cramer, 2005) a samotný EPHA5 je ve zvýšené míře detekován v neuronech spirálního ganglia (Lu a kol., 2011). Bylo také ukázáno, že snížená exprese *Epha5* a také *Pou4f1* koreluje s abnormalitami v periferních a centrálních projekcích spirálních neuronů u mutantů s podmíněnou delecí *Neurod1* (Filova a kol., 2020).

Neurony vnitřního ucha v závislosti na jejich poloze exprimují na svém povrchu dva neurotrofinové receptory, tyrozinový receptor B (NTRK2) a tyrozinový receptor C (NTRK3). Oba receptory a jejich příslušné ligandy neurotrofiny BDNF („Brain-derived neurotrophic factor“) a NT3 („Neurotrophic factor 3“), které jsou exprimované sensorickým epitelem a slouží k navádění rostoucích nervových vláken, jsou důležité pro samotné přežití aferentních neuronů vnitřního ucha, tvorbu synapsí a navádění axonů (Fritzsche a kol., 1997; Yang a kol., 2011). Zatímco NTRK2 a neurotrofin BDNF se podílejí především na regulaci vestibulární neuronů, NTRK3 a jeho ligand neurotrofin NT3 jsou esenciální v regulaci přežívání neuronů ve spirálním gangliu (Fariñas a kol., 2001). Ztráta obou neurotrofinových receptorů (NTRK2, NTRK3) nebo obou neurotrofinů (NT3, BDNF) vede ke kompletní ztrátě všech neuronů, což má za následek také úbytek vláskových buněk (Silos-Santiago a kol., 1997; Kersigo & Fritzsche, 2015). Delece genu *Neurod1* vedla k úplné ztrátě exprese receptoru NTRK3 ve statoakustickém gangliu u mutantních embryí ve věku E10,5

a k významnému snížení exprese receptoru NTRK2, která zůstala zachována pouze v několika buňkách ganglia. Oproti tomu exprese neurotrofinových ligandů BDNF a NT3 zůstala nezměněna. Tyto výsledky ukazují, že sensorické neurony vnitřního ucha jsou závislé na aktivitě genu *Neurod1*, který je klíčový pro regulaci exprese neurotrofinových receptorů, NTRK2 a NTRK3, jejichž absence či nedostatečná exprese vede k buněčné smrti neuronů (Kim a kol., 2001).

4 Cíle práce

Ačkoliv bylo o důležitosti transkripčního faktoru NEUROD1 ve vývoji vnitřního ucha především v posledních dvou dekáдах již mnoho objasněno, stále zůstává neodhalena jeho přesná role ve specifikaci a diferenciaci neuronů vnitřního ucha. Za tímto účelem byl pomocí rekombinačního systému Cre-loxP vytvořen nový myší model s delecí genu *Neurod1* pouze v buňkách s jeho endogenní expresí (*Neurod1-Cre, Neurod1^{ff}*), bez ovlivnění exprese *Neurod1* v okolním sensorickém epitelu. Dílčími cíli pak byly:

- Popis a charakterizace fenotypu mutantního myšího modelu *Neurod1ST* (*Neurod1-Cre, Neurod1^{ff}*)
- Vyhodnocení morfologických a buněčných změn během vývoje kochley a spirálního ganglia
- Detekce změn v expresi vybraných genů

5 Materiál a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie

Agaróza, Sigma-Aldrich, USA

AquaPolyMount

Azid sodný (NaN_3), Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta, Česká republika

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich, USA

Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, USA

Ethylakohol, Penta, Česká republika

Fetální bovinní sérum (FBS), Sigma-Aldrich, USA

DNA standard molekulových hmotností - GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo, USA

Glycerol, Amresco, USA

Glykogen (20 mg/ml), Sigma-Aldrich, USA

Hoechst 33258, Thermo, USA

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Penta, Česká republika

Chlorid draselný, Penta, Česká republika

Chlorid lithný, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid sodný, Penta, Česká republika

Chloroform, Penta, Česká republika

Izopropanol, Penta, Česká republika

Kozí sérum

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich, USA

Kyselina boritá, Sigma-Aldrich, USA

Methanol, Sigma-Aldrich, USA

Oslí sérum, Jackson ImmunoResearch, USA

Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich, USA

n-Propylgalát, Sigma-Aldrich, USA

Tris, Sigma-Aldrich, USA

Triton X-100, Sigma-Aldrich, USA

Trizol Reagent, Invitrogen, USA

Tween20, Amresco, USA

Voda bez DNáz a RNáz, Sigma-Aldrich, USA

5.1.2 Enzymy

Proteináza K (20 mg/ml), Sigma-Aldrich, USA

5.1.3 Primery

Tab. 1: Seznam primerů

| Název primeru | Sekvence | Použití |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| <i>Neurod1-Cre F</i> | CCATTTTGCAGTGGACTCCT | genotypizace |
| <i>Neurod1-Cre R</i> | ACGGACAGAAGCATTTTCCA | genotypizace |
| <i>Neurod1-Flox F</i> | ACCATGCACTCTGTACGCATT | genotypizace |
| <i>Neurod1-Flox R</i> | GAGAACTGAGACTCATCTG | genotypizace |
| <i>Hprt1 F</i> | GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG | qPCR |
| <i>Hprt1 R</i> | CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT | qPCR |
| <i>Neurod1 F</i> | ATGACCAAATCATACAGCGAGAG | qPCR |
| <i>Neurod1 R</i> | TCTGCCTCGTGTTCTCTCGT | qPCR |
| <i>Nhlh1 F</i> | ATGATGCTCAACTCCGATACCA | qPCR |
| <i>Nhlh1 R</i> | CTCCTCACGACTCAAGTGCTG | qPCR |
| <i>Bhlhe22 F</i> | TGAACGACGCTCTGGATGAG | qPCR |
| <i>Bhlhe22 R</i> | CCTGGCCTTGTTGAGGTAG | qPCR |
| <i>Isl1 F</i> | CTATTTGCCACCTAGCCACAG | qPCR |
| <i>Isl1 R</i> | CACAGGGAAATCAGACGTTTT | qPCR |
| <i>Shh F</i> | AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA | qPCR |
| <i>Shh R</i> | TTCGGAGTTTCTTGTGATCTTCC | qPCR |
| <i>Pou4f1 F</i> | CGCGCAGCGTGAGAAAATG | qPCR |
| <i>Pou4f1 R</i> | CGGGGTTGTACGGCAAAATAG | qPCR |
| <i>Ntrk3 F</i> | CTGAGTGCTACAATCTAAGCCC | qPCR |
| <i>Ntrk3 R</i> | CACACCCCATAGAACTTGACAAT | qPCR |
| <i>Epha5 F</i> | CTGGCGGACGGAAAGATGT | qPCR |
| <i>Epha5 R</i> | TTCAGGCCGATTTGCTGGG | qPCR |
| <i>Efnb2 F</i> | AGATGCAAGTTCTGCTGGATC | qPCR |
| <i>Efnb2 R</i> | TGCCATCGGTGCTAGAACCT | qPCR |

5.1.4 Protilátky

Tab. 2: Seznam primárních protilátek

| Primární protilátka | Typ | Hostitel | Výrobce | Katalogové číslo | Ředění |
|---------------------|--------------|----------|--------------------------|------------------|--------|
| Cre | polyklonální | králík | BioLegend | 908001 | 1:500 |
| Neurod1 | polyklonální | koza | Santa Cruz Biotechnology | sc-1084 | 1:100 |
| Isl1/2 | monoklonální | myš | DHB, Iowa City | 39.4D5 | 1:200 |
| Ki67 | monoklonální | králík | Cell Signaling | 9129 | 1:400 |
| Cleaved Caspase3 | polyklonální | králík | Cell Signaling | 9661 | 1:100 |
| NeuN | monoklonální | králík | Abcam | ab177487 | 1:500 |
| Acetylated Tubulin | monoklonální | myš | Sigma | T6793 | 1:400 |
| Myosin VIIa | polyklonální | králík | Proteus Biosciences Inc | 25-6790 | 1:500 |

Tab. 3: Seznam sekundárních protilátek

| Sekundární protilátka | Hostitel | Výrobce | Katalogové číslo | Ředění |
|------------------------------|----------|------------------------|------------------|--------|
| Alexa Fluor® 488 Anti-mouse | koza | Jackson ImmunoResearch | 115-545-146 | 1:400 |
| Alexa Fluor® 594 Anti-Rabbit | koza | Jackson ImmunoResearch | 111-585-144 | 1:400 |
| Alexa Fluor® 488 Anti-Goat | osel | Jackson ImmunoResearch | 705-545-003 | 1:400 |
| Alexa Fluor® 594 Anti-Goat | osel | Jackson ImmunoResearch | 705-585-003 | 1:400 |
| Alexa Fluor® 488 Anti-Mouse | osel | Jackson ImmunoResearch | 715-545-150 | 1:400 |
| Alexa Fluor® 594 Anti-Rabbit | osel | Jackson ImmunoResearch | 711-585-152 | 1:400 |

5.1.5 Roztoky

Antifade:

21,2% (w/v) n-propylgalát, 2M Tris (pH = 8,0), 90% (v/v) glycerol

Blokační roztok (koza):

2,5% (v/v) koží sérum; 0,5% (v/v) Tween®20, 0,1% (v/v) TritonX-100 v PBS

Blokační roztok (osel):

2,5% (v/v) oslí sérum; 0,5% (v/v) Tween®20, 0,5% (v/v) TritonX-100 v PBS

Elektroforetický pufr 0,5krát TBE:

45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH = 8,0

Fosfátový pufr (PBS):

10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Disociační pufr:

93,1% (v/v) voda bez DNáz a RNáz, 50mM chlorid sodný, 10mM Tris-HCl (pH = 8,3), 0,45% (v/v) TritonX-100, 0,45% (v/v) Tween®20

5.1.6 Komerční soupravy

Komerční souprava pro polymerázovou řetězovou reakci, 5x HOT FIREPol Blend Master Mix RTL 10mM with BSA, Solis BioDyne OÜ, Estonsko

Komerční souprava pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci, TATAA SYBR® GrandMaster® Mix, TATAA Biocenter, Švédsko

Komerční souprava pro reverzní transkripci, Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase, Thermo Scientific, USA

5.1.7 Přístroje

Analytické váhy 154AI, Bel engineering, Itálie

Centrifuga Z216 MK, Hermle, Německo

Elektroforéza Mini Gel System B1, Owl Separation systems, Velká Británie

Fotoaparát SP- 565 UZ, Olympus, Japonsko

Konfokální mikroskop Zeiss CZ LSM880 2P, Německo

Konfokální spinning disk mikroskop Nikon CSU-W1, Japonsko

Kývačka Biosan 3D Sunflower, Lotyšsko

Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E400, Nikon, Japonsko

Mikrovlnná trouba MCE30, Hitachi, Japonsko

Pipety P39604P, Gilson, Labnet International, USA

Spektrofotometr N1000, NanoDrop Technologies, USA

Stolní třepačka Vortex V-1 plus, Labnet International, USA

Stolní centrifuga FVL-2400N, Biosan, USA

Termoblok BioTDB-100, LabnetInternational, USA

Termocykler CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, USA

Termocykler, Biometra, Německo

Transiluminátor, Herolab UVT-28 M, Německo

Vibratom, Leica Biosystems, Německo

Vortex MIXER S0200, LabnetInternational, USA

5.1.8 Počítačové programy

ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA

ND-1000 V.3.3.0, NanoDrop Technologies, USA

NIS Elements D 3.2, Nikon, Japonsko

Bio-Rad CFX Manager 3.0, USA

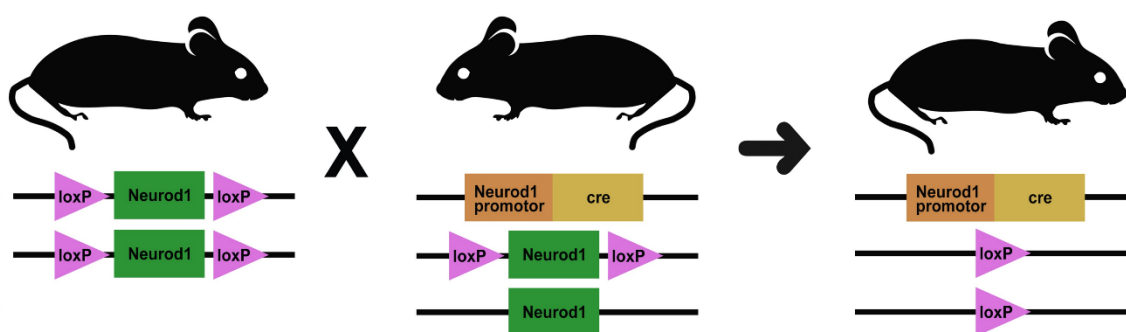
Adobe Photoshop 22.1.0, USA

Sketch book 8.7.1, USA

5.2 Modelový organismus

Pro účely diplomového projektu byla jako modelový organismus zvolena myš domácí (*Mus musculus*). S modelovým organismem bylo zacházeno dle zákona č. 246/1992 Sb. a vyhlášky č. 419/2012 Sb. Myši byly chovány s 12hodinovými intervaly světla a tmy s neomezeným přístupem ke krmivu a vodě. Březost myší byla posuzována podle tzv. vaginální zátky. Tu u samic nacházíme vzápětí po kopulaci a indikuje tak proběhlé páření. Přítomnost zátek byla kontrolována časně ráno a v případě nalezení zátky byl v poledne téhož dne stanoven věk embryí na 0,5 embryonálního dne (E0,5).

Pro získání experimentálního myšího modelu s podmíněnou delecí genu *Neurod1* (*Neurod1-Cre, Neurod1^{ff}*) byl použit rekombinační systém Cre-loxP (Obr. 8). Transgenní myš, která má homozygotně ohraničen exon 2 genu *Neurod1* místy loxP (*Neurod1^{ff}*) (Goebbels a kol., 2005) byla křížena s myší, která má exon 2 genu *Neurod1* ohraničen loxP místy heterozygotně, a zároveň má pod *Neurod1* promotor vložen gen pro Cre rekombinázu (*Neurod1-Cre, Neurod1^{f/+}*) (The Jackson Laboratory #028364). Cre kódující sekvence byla vložena do translačního iniciačního ATG genu *Neurod1* (Li a kol., 2012). Tímto je zajištěna exprese Cre rekombinázy ve všech *Neurod1* pozitivních buňkách a křížením těchto dvou myší vznikli heterozygotní potomci *Neurod1-Cre, Neurod1^{f/+}*, potomci bez transgenu *Cre* a homozygotní potomci *Neurod1-Cre, Neurod1^{ff}*, tedy mutantní jedinci *Neurod1ST* s podmíněnou delecí genu *Neurod1*.



Obr. 8: Schématické znázornění Cre-loxP systému pro vytvoření mutantu *Neurod1ST* u myšího modelu.

5.3 Metody

5.3.1 Extrakce myších embryí a fixace tkáně

Březí samice myší byly usmrceny cervikální dislokací. Z dělohy pak byla vyjmuta embrya v plodových obalech. Jednotlivá embrya byla pomocí pinzet pod binolupou zbavena plodových obalů a část ocasní tkáně byla odebrána pro následnou genotypizaci. Embryo či jeho část bylo vloženo do zkumavky se 4% (w/v) roztokem paraformaldehydu (PFA) v PBS a fixováno 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Následně byly vzorky inkubovány v PBS po dobu 30 minut a poté vzestupnou methanolovou řadou (25%, 50%, 75% (v/v) methanol v PBS a 100% methanol) odvodněny pro dlouhodobé uchování ve 100% methanolu při -20 °C.

Pro další využití embryí či jednotlivých částí k experimentální části je nutná rehydratace vzorků sestupnou methanolovou řadou (75%; 50%, 25% (v/v) methanol v PBS) do konečného PBS.

5.3.2 Genotypizace

K izolaci DNA embryí byla využita metoda rychlé extrakce DNA. Embryonální tkáň podléhá lyzi rychleji, proto je možné provést tzv. rychlou lyzi DNA a následně její extrakci využít k relativně rychlému zjištění genotypů jednotlivých embryí.

Tkáň embrya byla vložena do mikrozukavky s 50 μ l disociačního pufru a 1 μ l proteinázy K. Vzorky byly následně vloženy do PCR cycleru na dobu 5 minut při teplotě 55 °C a následně ještě dalších 10 minut při teplotě 95 °C.

Pro polymerázovou řetězcovou reakci byl připraven PCR mix podle Tab. 4. Pro jeden vzorek bylo 19 μ l PCR mixu napipetováno do jedné mikrozukavky a byl přidán také 1 μ l dané extrahované DNA. V závislosti na počtu vzorků bylo připraveno odpovídající množství PCR mixu a mikrozukavek. Vzorky byly v mikrozukavkách promíchány, odstředěny a následně vloženy do termocykleru na 35 cyklů (týká se kroků 2-4). Průběh jedné reakce je znázorněn v Tab. 5.

Výsledné PCR produkty byly detekovány pomocí horizontální gelové elektroforézy. Gel byl připraven z 2% agarózy v 0,5x zředěném TBE pufru s ethidiumbromidem (0,4 μ g/ml). Po polymeraci gelu bylo do první jamky napipetováno 3 μ l „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“, který slouží jako marker pro stanovení velikosti dvouřetězové DNA. Do dalších jamek bylo napipetováno 8 μ l PCR produktů z každého vzorku. Následně byly vzorky elektroforeticky rozděleny při stálém napětí 130 V po dobu přibližně 30 minut.

5.3.3 Příprava vzorků na imunohistochemické barvení

Při přípravě celých orgánů tzv. „wholemount“ vzorků bylo vnitřní ucho nejprve pod binolupou za pomoci pinzet vypreparováno z hlavy embrya. Následnou pečlivou mikrodisekcí bylo vnitřní ucho očištěno od chrupavky a bylo rozebráno na jednotlivé orgány. Kochlea pak byla rozdělena ještě na dvě části – apex a bázi, které byly zbaveny tektoriální membrány.

K přípravě řezů bylo vypreparované celé vnitřní ucho, případně celé mladší embryo uloženo do plastové misky a zalito 4% (w/v) agarózovým gelem. Vzorky byly ponechány ke ztuhnutí a následně byly na vibratomu připraveny řezy o tloušťce 80 μm .

5.3.4 Imunohistochemické barvení

Připravené vzorky ve 12jamkové destičce byly nejprve alespoň 1 hodinu inkubovány v blokačním roztoku obsahující buď kozí nebo oslí sérum. Poté byl blokační roztok za pomoci pipety odsát a ke vzorkům byly přidány primární protilátky. Destička byla důkladně obalena parafilmem a umístěna na kývačku ve 4 °C na 72 hodin. Poté byly protilátky odsáty a vzorky byly 5× po 30 minutách promyty PBS. Po odsátí posledního PBS byly vzorky opět 1 hodinu inkubovány ve stejném blokačním roztoku. Ten byl poté odsát a ke vzorkům byly přidány sekundární protilátky. Od této chvíle již byla destička uchovávána v hliníkové fólii, aby nedocházelo k excitaci fluoroforů. Destička byla opět umístěna na kývačku ve 4 °C do druhého dne.

Sekundární protilátky byly následující den odsáty a vzorky byly dále 1 hodinu inkubovány v roztoku PBS a barviva Hoechst 33258 v poměru 2000:1. Vzorky byly následně 5× po 30 minutách promyty PBS. V případě řezů byly vzorky přeneseny na podložní sklíčko s médiem Antifade. Pro přípravu „wholemount“ vzorků bylo na podložní sklíčko přidáno komerční médium Aqua-Poly/Mount. Vzorky na podložním sklíčku byly překryty krycím sklíčkem a uchovány ve tmě při 4 °C. Následně byly vzorky snímány konfokálním mikroskopem (Zeiss CZ LSM880 2P a Nikon CSU-W1) a získané obrázky byly dále zpracovány a vyhodnoceny v programu ImageJ.

5.3.5 Izolace RNA

Kochley z jednotlivých myších embryí ve věku E14,5 byly očištěny od veškeré chrupavčité tkáně a vloženy do zkumavek s 300 μl TriReagentu. Vzorky byly 5 minut inkubovány při teplotě 55 °C. Následně byla tkáň homogenizována pomocí injekčních stříkaček s jehlami o průměru 0,60 mm v prvním kroku a poté jehlami o průměru 0,45 mm. Vzorky byly opět zahřáty při teplotě 55 °C po dobu 3 minut a následně byly promíchány. Tento krok byl proveden třikrát. Po posledním promísení byly vzorky odstředěny ve stolní centrifuze. Ke vzorkům bylo následně přidáno 60 μl

chloroformu a vzorky byly opět po dobu 15 vteřin promíchány a poté ponechány 5 minut stát při laboratorní teplotě. Po této inkubaci byly vzorky 15 minut centrifugovány při 14000 G ve 4 °C.

Během tohoto procesu došlo k rozdělení roztoku na dvě vizuálně rozlišitelné fáze, kdy se organická růžová část nacházela ve spodní části zkumavek a vodná průhledná část obsahující RNA v horní části zkumavky. Tato průhledná vrstva obsahující RNA byla pomocí pipety odebrána do nových zkumavek. Ke vzorkům bylo přidáno 0,5 µl glykogenu a 135 µl isopropanolu. Vzorky byly promíchány, krátce odstředěny a po dobu minimálně 30 minut uloženy do -80 °C, aby proběhla precipitace RNA. Poté byly vzorky na 30 minut centrifugovány při 14000 G ve 4 °C, díky čemuž se na dně zkumavky vytvořily pelety RNA. Supernatant byl pečlivě odstraněn, pelety RNA byly promyty 500 µl 75% ethanolu a následně opět centrifugovány po dobu 5 minut při 7500 G a 4 °C. Tento proces omývání a následné centrifugace vzorků byl proveden třikrát. Po poslední centrifugaci byl supernatant odstraněn, pelety v otevřených zkumavkách byly sušeny v termobloku při 55 °C a následně resuspendovány ve 20 µl vody bez RNáz.

Ke vzorkům byl přidán 1 µl DNázy, vzorky byly krátce odstředěny a 30 minut inkubovány při 37 °C. Po 30 minutách byly vzorky inkubovány dalších 10 minut při teplotě 65 °C, aby došlo k deaktivaci enzymu. Pro izolaci kvalitnější a čistější RNA byly vzorky purifikovány přidáním 1 µl 8M LiCl. Následně byl přidán absolutní ethanol o objemu 56 µl. Vzorky byly opět promíchány a krátce odstředěny, a přes noc ponechány při teplotě -80 °C. Druhý den byly vzorky po dobu 30 minut centrifugovány při 14000 G a 4 °C, aby došlo k opětovnému vytvoření pelet RNA. Pelety byly 3x promyty 75% ethanolem a mezi jednotlivými promýváními byly vždy 5 minut centrifugovány při 7500 G a 4 °C. Po poslední centrifugaci byl supernatant odstraněn, pelety v otevřených zkumavkách byly sušeny v termobloku při 55 °C a následně resuspendovány ve 12 µl vody bez RNáz. Koncentrace získané RNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 1000.

5.3.6 Reverzní transkripce

Jednotlivé vzorky izolované RNA byly po změření koncentrace naředěny tak, aby jednotlivé vzorky obsahovaly 350 ng RNA na jednu reakci. Podle počtu vzorků byl podle Tab. 6 do zkumavky připraven mix primerů, dNTP a vody. Reakční směs byla promíchána a rozpipetována po 5 µl do mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 10 µl RNA příslušného vzorku. Obsah mikrozkušavek byl promíchán, mikrozkušavky byly odstředěny a následně inkubovány v termocykleru při 65 °C po dobu 5 minut. Po této inkubaci byly vzorky uloženy na led a ochlazeny, aby nedošlo ke vzniku sekundárních struktur. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 5 µl směsi podle Tab. 7. Vzorky byly opět jemně promíchány, odstředěny a inkubovány nejdříve 10 minut při

25 °C, následně 15 minut při 50 °C a nakonec 5 minut při 85 °C. Výsledná cDNA byla 15x naředěná vodou a uchována v -80 °C pro kvantitativní PCR.

Tab. 6: Složení směsi primerů a dNTP

| Složka | Objem [μl] |
|---------------------------------|------------|
| Oligo (dT) ₁₈ primer | 0,25 |
| Random hexamer primer | 0,25 |
| 10mM dNTP mix | 1 |
| Voda bez DNáz a RNáz | 3,5 |

Tab. 7: Složení směsi pro reverzní transkripci

| Složka | Objem [μl] |
|---------------------------|------------|
| 5X RT Buffer | 4 |
| Maxima H minus Enzyme Mix | 1 |

5.3.7 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Pro každý gen byla do zkumavky připravena směs vody, příslušných primerů a TATAA SYBR® GrandMaster® Mix podle Tab. 8. Obsah zkumavky byl promíchán, odstředěn a následně byla tato reakční směs napipetována po 6 μl do 384 jamkové PCR destičky. Do jamek pak byla přidána naředěná cDNA o objemu 4 μl. Destička byla překryta a utěsněna lepidlovou optickou fólií, která byla po centrifugaci a vložena do termocykleru (Termocykler CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, USA). Program v termocykleru byl nastaven podle Tab. 9 na 40 cyklů (krok 2-4). Pro zpracování a vyhodnocení výsledků byl použit program Bio-Rad CFX Manager a programovací jazyk Python.

Tab. 8: Složení směsi pro qPCR

| Složka | Objem [μl] |
|------------------------------|----------------------------------|
| Voda | 0,5 |
| Forward primer | 0,25 |
| Reverse primer | 0,25 |
| TATAA SYBR® GrandMaster® Mix | 5 |

Tab. 9: Schéma průběhu jedné PCR reakce

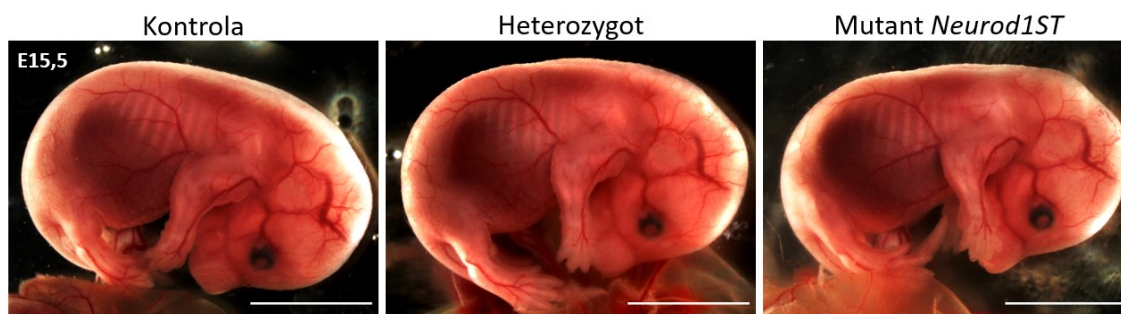
| Krok reakce | Teplota [$^{\circ}$C] | Čas [min] |
|----------------------|---|------------------|
| 1. Iniciační reakce | 95 | 30:00 |
| 2. Denaturace DNA | 95 | 5:00 |
| 3. Nasednutí primerů | 60 | 5:00 |
| 4. Elongace | 72 | 30:00 |

6 Výsledky

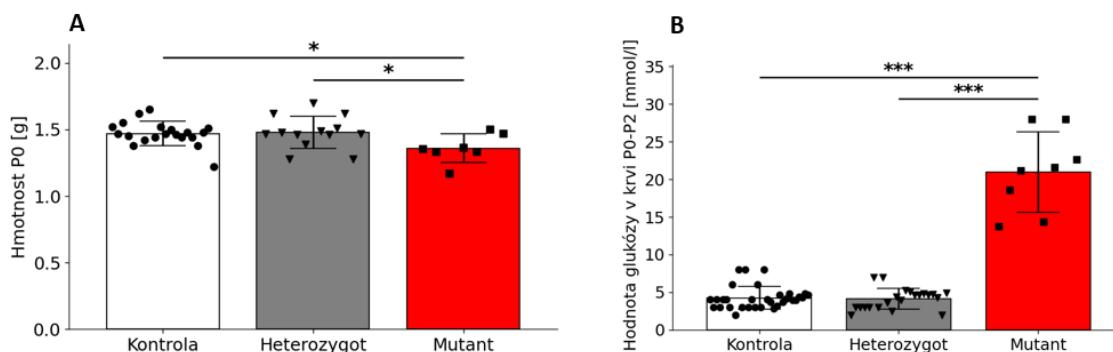
6.1 Externí fenotyp experimentálního myšního modelu *Neurod1ST*

Pro objasnění role NEUROD1 ve specifikaci a diferenciaci neuronů vnitřního ucha byl pomocí rekombinačního systému Cre-loxP (viz kapitola 5.2) vytvořen myšší model s podmíněnou delecí genu *Neurod1* pouze v buňkách exprimujících *Neurod1*. Ke zjištění genotypu jednotlivých embryí byla využita metoda PCR a horizontální gelová elektroforéza (viz kapitola 5.3.2). Myši postrádající obě alely genu *Neurod1* byly označeny jako mutanti *Neurod1ST* (*Neurod1-Cre*, *Neurod1^{fl/fl}*) dále jako „mutanti“. Heterozygotní jedinci pouze s jedinou funkční alelou genu *Neurod1* (*Neurod1-Cre*, *Neurod1^{fl/+}*) se fenotypově nijak nelišili od kontrolních myší bez transgenu *Cre*.

Z hlediska externího fenotypu se nelišila ani embrya mutantů ve věku E15,5 a tato embrya nevykazovala žádné známky vnějších defektů v porovnání s kontrolními jedinci a heterozygoty (viz Obr. 10). Po narození byla u mutantních myší zaznamenána menší hmotnost spojená se závažnou hyperglykemií (viz Obr. 11), což svědčí o rozvoji diabetu a tito jedinci v jeho důsledku krátce po narození umírají. Heterozygoti a kontrolní myši nevykazovali rozdíly v hmotnosti ani hodnotě glukózy v krvi, a naměřené hodnoty odpovídaly normoglykémii. Potvrdili jsme, že jedna funkční alela genu *Neurod1* je dostatečná k plnému zachování jeho funkce.



Obr. 10: Externí fenotyp kontrolních, heterozygotních a mutantních embryí ve věku E15,5. Mutantní jedinci se velikostně neliší od kontrolních a heterozygotních jedinců. Rovněž nebyly detekovány žádné patrné defekty v morfologii jednotlivých částí těla těchto jedinců. Měřítka: 5 mm.



Obr. 11: Graf hmotnosti jedinců v den narození (P0) a hladina glukózy v krvi mezi P0 a P2. Mezi kontrolními a heterozygotními jedinci nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hmotnosti (A) ani v hladině glukózy v krvi (B), která odpovídala normoglykémii. Oproti tomu mutantní myši byly v porovnání s kontrolami a heterozygoty menší a trpěly hyperglykemií, v důsledku čehož taky krátce po narození umíraly. Hodnoty představují aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

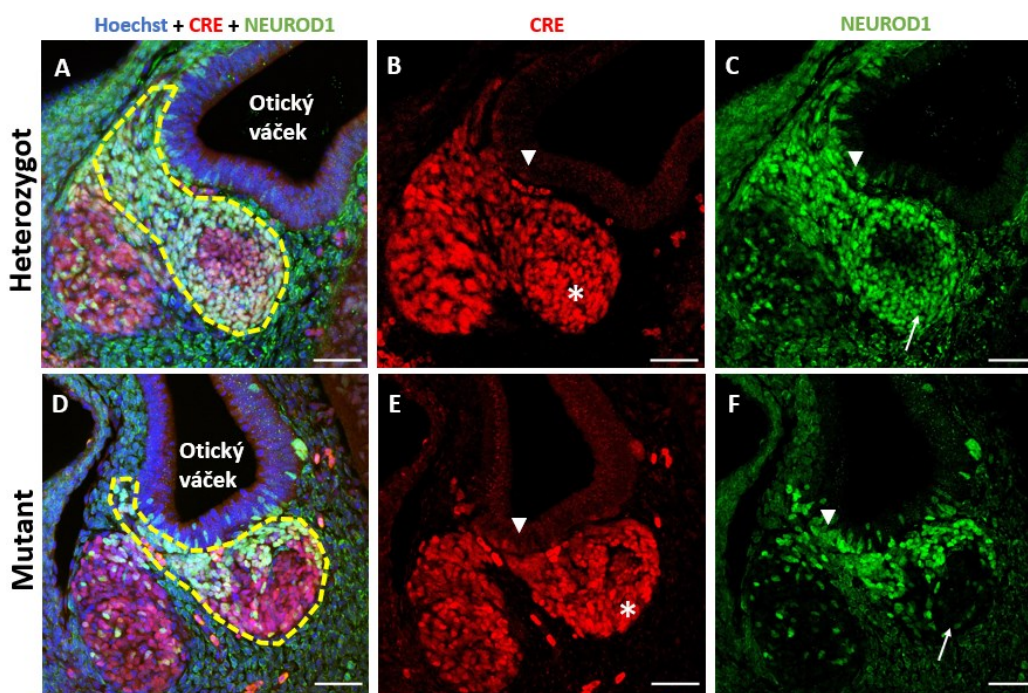
6.2 Efektivita delece *Neurod1* v buňkách statoakustického ganglia

K posouzení efektivity delece *Neurod1* v neuronech vznikajícího statoakustického ganglia byla využita embrya myši ve věku E10,5. V našem experimentálním mutantním modelu by mělo docházet k deleci genu *Neurod1* ve všech NEUROD1 pozitivních buňkách, které zároveň exprimují *Cre* pod *Neurod1* promotorem. Pro tuto analýzu byly využity vzorky z pěti mutantních a šesti heterozygotních jedinců. Heterozygotní jedinci s pouze jedinou funkční alelou genu *Neurod1* (*Neurod1-Cre*, *Neurod1^{f/+}*) se fenotypově nelišili od kontrolních myši bez transgenu *Cre* a mohli být využiti pro zhodnocení exprese *Cre* rekombinázy jako kontrolní srovnávací vzorky v této imunohistochemické analýze.

Ze všech vzorků byly na vibratomu připraveny 80 μ m řezy, které byly následně podrobeny imunohistochemickému barvení za využití primárních a sekundárních protilátek k detekci exprese proteinů NEUROD1 a CRE rekombinázy (viz Obr. 12). K zobrazení jader buněk bylo využito barvivo Hoechst. Jak u kontrol, tak u heterozygotů docházelo k normální formaci statoakustického ganglia a delaminace neuroblastů exprimujících gen *Neurod1* nebyla narušena (detekce proteinu NEUROD1, viz Obr. 12, A). U heterozygotních i mutantních jedinců je NEUROD1 exprimován hojně již v neuroblastech v oblasti epitelu otického váčku (Obr. 12, C, F, trojúhelník), zatímco expresi CRE rekombinázy jsme detekovali ve výrazně menším počtu buněk epitelu otocysty a detekovaný signál byl výrazně slabší (Obr. 12, B, E, trojúhelník).

Imunohistochemické barvení dále ukázalo, že CRE rekombináza je přítomná ve všech buňkách ganglia u heterozygotů i u mutantů (Obr. 12, B, E), a navíc zůstává detekovatelná i po vymizení exprese NEUROD1 ve středu ganglia (Obr. 12, B, E, hvězdička). To naznačuje, že protein

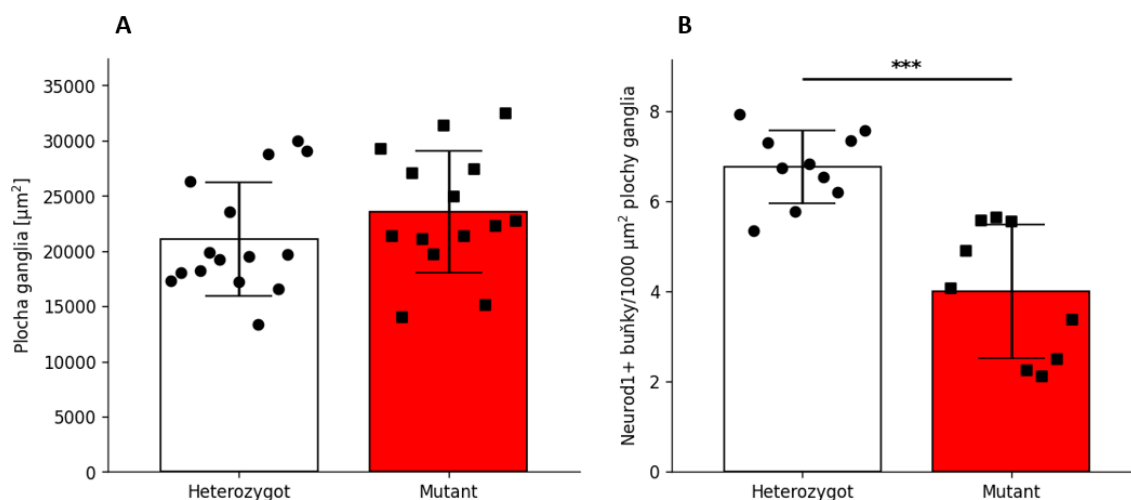
CRE má pravděpodobně delší životnost a zůstává v neuronech déle než NEUROD1. CRE rekombináza zůstala detekovatelná i po vymizení proteinu NEUROD1 na okrajích mutantního ganglia (Obr. 12, E, hvězdička), kde se nacházejí neurony, které z otocysty delaminovaly jako první. Buňky heterozygotních jedinců v tomto místě expresi NEUROD1 stále vykazovaly (Obr. 12, C, F šipka). Jak ukazují výsledky imunohistochemie, došlo k efektivní eliminaci proteinu NEUROD1 v těchto neuronech.



Obr. 12: Expresí proteinů NEUROD1 a CRE rekombinázy v buňkách statoakustického ganglia ve věku E10,5. Expresí CRE rekombinázy (červeně) je detekována ve věku E10,5 v buňkách ganglia jak u heterozygotů, tak u mutantních jedinců, přičemž expresí v neuronech přetrvává i po vymizení expresí NEUROD1 (B, E, hvězdička). Expresí proteinu NEUROD1 (zeleně) je detekována již v epitelu otického váčku (C, F, trojúhelník), zatímco expresí CRE rekombinázy jsme zde detekovali v menším počtu buněk a detekovaný signál byl výrazně slabší (B, E, trojúhelník). V neuronech, které z otického váčku delaminovaly nejdříve protein NEUROD1 již nedetekujeme u mutantních jedinců, což naznačuje opožděnou delecí *Neurod1* (F, šipka). V případě heterozygotů vidíme, že expresí proteinu NEUROD1 je v těchto neuronech zachována (C, šipka). Hoescht (modře) barví buněčná jádra. Oblast ganglia je vyznačena žlutou přerušovanou čarou (A, D). Měřítka: 50 μ m.

Eliminace NEUROD1 v neuronech statoakustického ganglia byla následně kvantifikována v programu ImageJ a bylo využito celkem 10 heterozygotních a 9 mutantních vzorků ganglií. Ve věku E10,5 nebyla změněna velikost statoakustického ganglia u mutantů v porovnání s heterozygotními jedinci. Při nezměněné velikosti ganglií heterozygotních a mutantních embryí (Obr. 13, A) byl počet NEUROD1 pozitivních neuronů u mutantů ve věku E10,5 snížen o 41 % v porovnání s heterozygoty (viz Obr. 13, B). Velikost ganglií byla měřena jako oblast pozitivní

zároveň pro CRE, NEUROD1 a Hoechst, díky čemu jsme mohli dobře určit hranice tohoto ganglia a změřit jeho plochu.

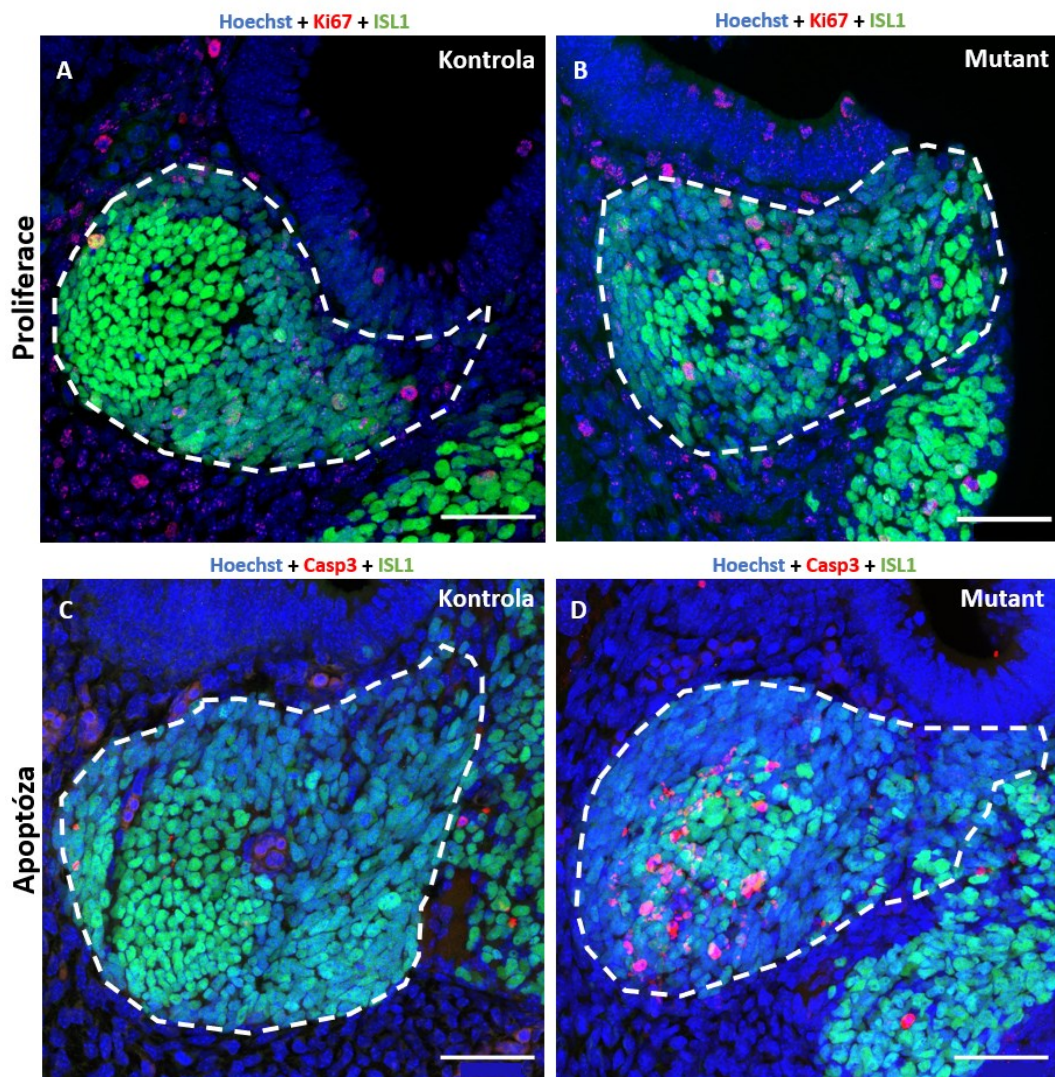


Obr. 13: Velikost statoakustického ganglia a počet NEUROD1 pozitivních buněk v gangliu ve věku E10,5. Ve velikosti ganglia nebyly detekovány rozdíly mezi kontrolami a mutanty (A), zatímco úbytek NEUROD1 pozitivních buněk je mezi těmito jedinci signifikantní a představuje 41% snížení u mutantů v porovnání s heterozygoty (B). Hodnoty představují aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: *** P < 0,001. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

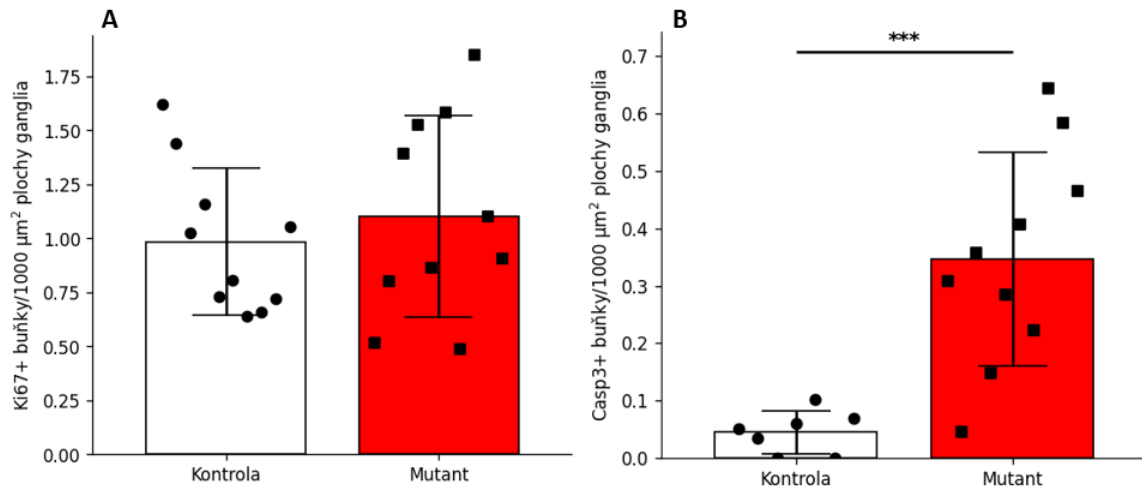
6.3 Zvýšená apoptóza buněk ve statoakustickém gangliu

Po zjištěném signifikantním úbytku NEUROD1 pozitivních buněk, jsme se rozhodli ověřit, zda delece *Neurod1* v těchto neuronech následně ovlivnila proces proliferace či apoptózy. Pro jednotlivé analýzy apoptózy a proliferace bylo využito imunohistochemické barvení na vzorcích z pěti kontrolních a z pěti mutantních embryí (tedy celkem 10 a 10 ganglií). K detekci buněk ganglia byla využita protilátka proti ISL1 a k detekci proliferujících buněk protilátka proti Ki67, což je marker proliferujících buněk (Obr. 14, A, B). V případě detekce apoptózy jsme imunohistochemicky barvili buňky ganglia s využitím protilátky proti ISL1 a apoptizující buňky byly detekovány protilátkou proti aktivní formě Kaspázy 3 (Casp3; Obr. 14, C, D). Buněčná jádra byla opět obarvena barvivem Hoechst.

Bylo zjištěno, že proliferace buněk nebyla u mutantů ovlivněna (Obr. 14, A, B a Obr. 15, A), naopak jsme však detekovali zvýšenou apoptózu v oblasti ganglia u mutantů (Obr. 14, D). Počet apoptických buněk byl téměř 8x vyšší u mutantů než u ganglií kontrolních jedinců ve věku E10,5 (Obr. 15, B).



Obr. 14: Proliferace a apoptóza buněk ve statoakustickém gangliu ve věku E10,5. Buňky statoakustického ganglia jsou na obrázcích zobrazeny pomocí protilátky proti ISL1 (zeleně). Oblast ganglia je vyznačena bílou přerušovanou čarou. Buněčná jádra značí Hoechst (modře). V horním řádku (A, B) je porovnaná proliferace buněk ganglia mezi mutanty a kontrolními jedinci s využitím protilátky proti Ki67 (červeně). Nezaznamenali jsme žádné výrazné změny mezi kontrolami a mutanty. Dolní řádek (C, D) porovnává probíhající apoptózu s detekcí těchto buněk pomocí protilátky proti Kaspáze 3 (červeně). U mutantních jedinců byl zaznamenán nárůst apoptických buněk (D) v porovnání se stejnou oblastí u kontrol (C). Měřítka: 50 μ m.



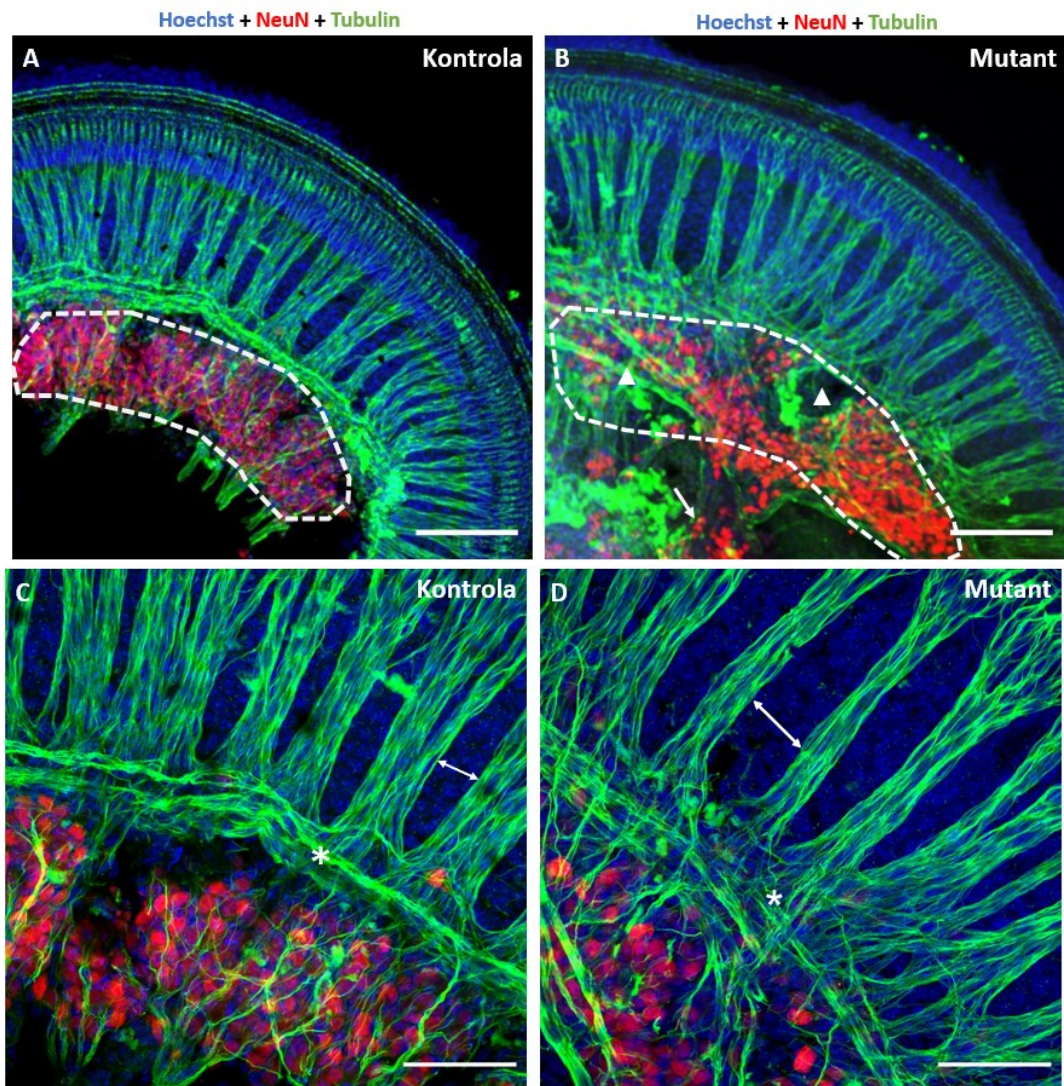
Obr. 15: Grafické znázornění míry proliferace a apoptózy v buňkách statoakustického ganglia ve věku E10,5. Z grafu je patrné, že míra proliferace zůstává mezi kontrolami a mutanty nezměněna (A), zatímco míra apoptózy je u mutantů signifikantně navýšena (B). Hodnoty představují aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: *** P < 0,001. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

6.4 Defekty při tvorbě spirálního ganglia a v organizaci kochleární inervace

Dále jsme se rozhodli posoudit možné odlišnosti v morfologii kochley a její inervace neurony spirálního ganglia ve věku E18,5. Pro tuto analýzu byly využity vzorky tzv. „wholmount“ kochleí, které byly důkladně očištěny od přebytečné chrupavky a membrán a následně podrobeny imunohistochemickému barvení. K vizualizaci spirálního ganglia, tedy jader spirálních neuronů byla využita protilátka proti NeuN, který slouží jako marker již diferencovaných neuronů. K zobrazení nervových vláken jsme použili protilátku proti acetylovanému tubulinu (marker nervových vláken; Tubulin) a k vizualizaci buněčných jader bylo využito barvivo Hoechst (Obr. 16).

Ve věku E18,5 jsou na první pohled viditelné defekty při tvorbě spirálního ganglia u mutantních jedinců v porovnání s kontrolní skupinou. Zatímco spirální ganglium u kontrolních jedinců vytváří kompaktní pás ve tvaru spirály táhnoucí se podél kochley, ganglium mutantů je dezorganizované (Obr. 16, A, B, bílá přerušovaná čára). Některé neurony spirálního ganglia mutantů se navíc nachází mimo své obvyklé pozice v spirálním (Rosenthalově) kanálu (Obr. 16, B, jednoduchá šipka) a na některých místech ganglia neurony zcela chybí (Obr. 16, B, trojúhelníky).

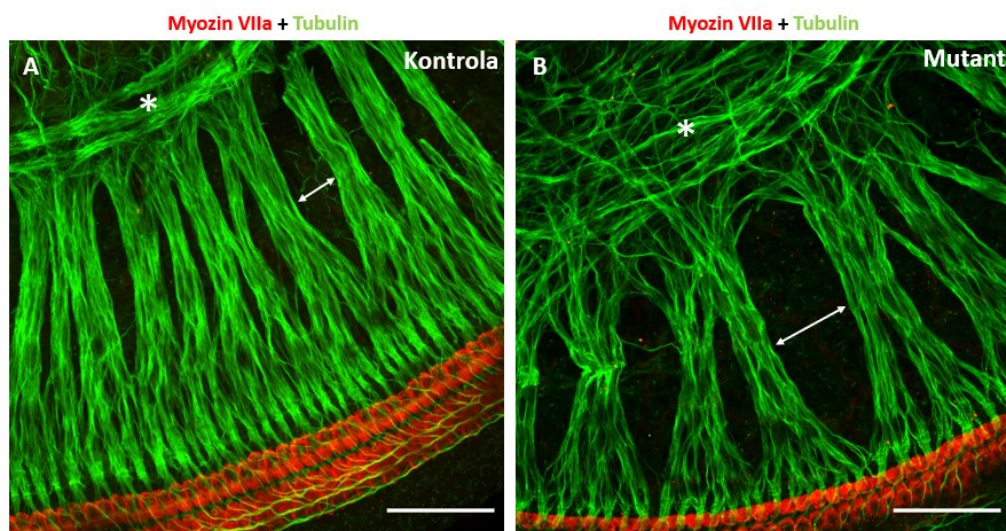
Při detailnějším pohledu jsou také patrné rozdíly v inervaci. Detekovali jsme větší mezery mezi jednotlivými svazky radiálních vláken u mutantů (Obr. 16, C, D, dvojité šipky). V případě kontrolních jedinců je patrný tzv. intraganglionický svazek eferentních vláken, který vytváří kompaktní strukturu kopírující spirální ganglium a závit kochley. U mutantů je formace této struktury narušena a vlákna jsou značně rozptýlena (Obr. 16, C, D, hvězdička).



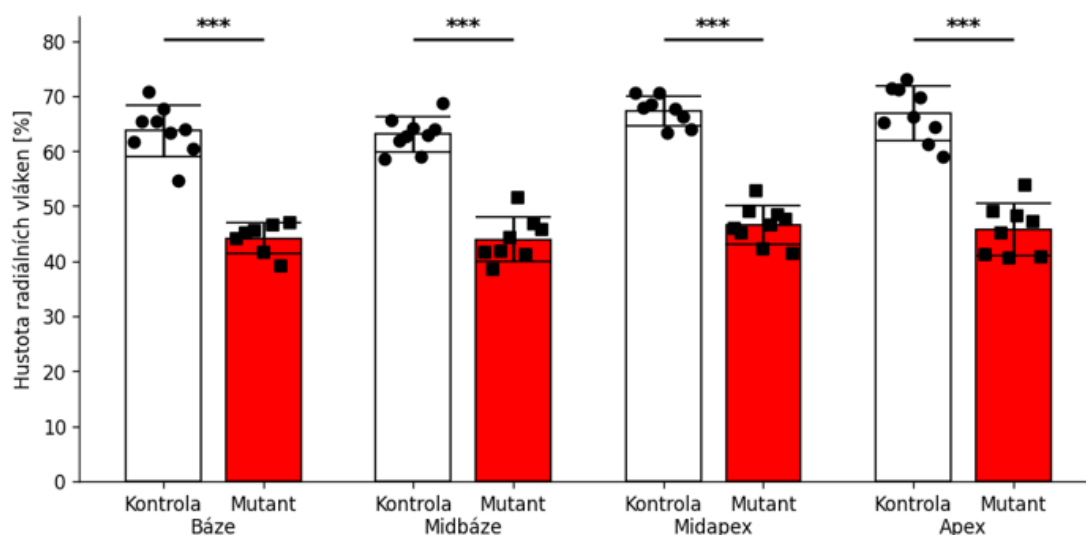
Obr. 16: Defekty spirálního ganglia a uspořádání kochleární inervace ve věku E18,5. U mutantů je patrné narušení formace spirálního ganglia (**B**, bílá přerušovaná čára), zatímco spirální ganglium kontrol vytváří kompaktní pás (**A**, bílá přerušovaná čára). Ganglium mutantů v některých místech neurony zcela postrádá (**B**, trojúhelníky) a také část neuronů se nachází zcela mimo spirální (Rosenthalův) kanál (**B**, jednoduchá šipka). Detailnější pohled ukazuje rozdíl ve vzdálenosti svazků radiálních vláken mezi kontrolami a mutanty (**C**, **D**, dvojité šipky) a narušenou tvorbu intraganglionického svazku eferentního vláken u mutantů (**C**, **D**, hvězdička). Jádra neuronů (červeně), nervová vlákna (zeleně), buněčná jádra (modře). Meřítko A, B: 100 μ m, měřítko C, D: 50 μ m.

Při posuzování morfologie kochley jsme detekovali významné rozdíly v kochleární inervaci. Pro určení rozdílů ve vzdálenosti jednotlivých svazků radiálních vláken, jsme využili další vzorky „wholemout“ kochleí a tentokrát je podrobili imunohistochemickému barvení s protilátkami proti acetylovanému tubulinu (vizualizace nervových vláken; Tubulin) a proti myozinu VIIa (marker diferencovaných vláskových buněk). Na Obr. 17 jsou opět patrné signifikantní rozdíly mezi vzdáleností svazků radiálních vláken v bázi kochley u kontrol a mutantů ve věku E18,5 (Obr. 17, A, B, šipky), a defekty ve formaci intraganglionického svazku eferentních vláken u mutantů (Obr. 17,

B, hvězdička). Rozhodli jsme se změřit hustotu radiálních vláken a výsledky porovnat mezi kontrolami a mutanty. Kochleu jsme proto rozdělili na čtyři části: bázi, midbázi, apex a midapex. Hustotu jsme posléze měřili v programu ImageJ ve vymezené oblasti 152 x 66 μm , což odpovídá ploše 10 032 μm^2 . K analýze bylo využito 7 bází, 8 midbází, 9 midapexů a 8 apexů mutantů. U kontrol bylo využito 9 bází, 9 midbází, 8 midapexů a 9 apexů. Mezi všemi částmi kochley jsme u mutantů detekovali signifikantně nižší hustotu radiálních vláken, než u kontrol (Obr. 18).



Obr. 17: Snížená hustota svazků radiálních vláken v bázi kochley ve věku E18,5. U mutantů byla detekována narušená tvorba intraganglionického eferentního svazku (B, hvězdička) a snížená hustota radiálních vláken (B, šipky). Vlásokové buňky (červeně), nervová vlákna (zeleně). Měřítko: 50 μm .

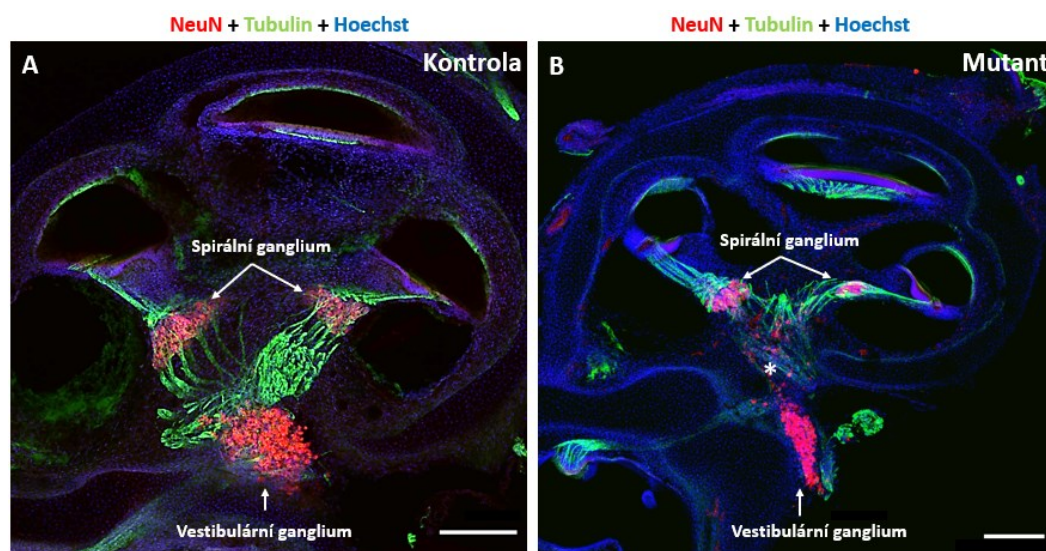


Obr. 18: Graf hustoty radiálních vláken mezi kontrolní a mutantní skupinou ve věku E18,5. Mezi všemi čtyřmi částmi kochley (báze, midbáze, midapex a apex) byla u mutantů detekována signifikantně snížená hustota radiálních vláken. Hodnoty představují aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: *** $P < 0,001$. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

6.5 Nesprávná migrace a snížený počet neuronů spirálního ganglia

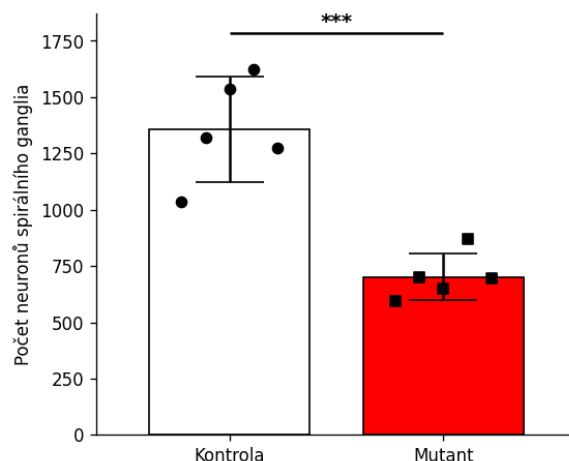
Na základě zjištěných defektů při tvorbě spirálního ganglia jsme se rozhodli posoudit morfologii kochleý na řezech a kvantifikovat změny v počtu neuronů mezi kontrolami a mutanty. Ve věku E18,5 jsme na vibratomu připravili 80 μ m řezy a imunohistochemicky obarvili s využitím protilátek proti NeuN (marker již diferencovaných neuronů) a proti acetylovanému tubulinu (marker nervových vláken). Pro vizualizaci buněčných jader bylo využito barvivo Hoechst.

Na obrázku níže (Obr. 19) je patrný rozdíl ve velikosti jak spirálního ganglia, tak vestibulárního ganglia mezi kontrolami a mutanty. U mutantů jsou ganglia zřetelně menší a je patrné, že mnoho neuronů má narušený proces migrace. Tyto neurony se nacházejí na pomezí obou ganglií (Obr. 19, B, hvězdička) mimo své obvyklé pozice uvnitř ganglií. Oproti tomu jsme u kontrolních vzorků žádné neurony v tomto místě nedetekovali (Obr. 19, A).



Obr. 19: Řezy kochleou ve věku E18,5. Na obrázcích je znázorněn průřez kochleou u kontrolních vzorků (A) a u mutantů (B). Obě ganglia u mutantů (B, šipky) jsou zmenšená a na jejich pomezí se nachází neurony s narušenou migrací do ganglií (B, hvězdička). Jádra neuronů (červeně), nervová vlákna (zeleně), buněčná jádra (modře). Měřítko: 200 μ m

Poté, co jsme zaznamenali zmenšená ganglia u mutantních vzorků, rozhodli jsme se kvantifikovat počet spirálních neuronů. Pro tuto analýzu byly využity kochleý z pěti kontrolních a pěti mutantních embryí, ze kterých byly připraveny řezy. Jednotlivé neurony spirálního ganglia, které se nacházely v obvyklých pozicích uvnitř ganglia, jsme pak počítali na každém řezu příslušného vzorku pomocí programu ImageJ. Výsledky jsme sečetli a porovnali mezi mutanty a kontrolami. Ze získaných dat jsme zjistili 49% snížení počtu neuronů u mutantů (Obr. 20).



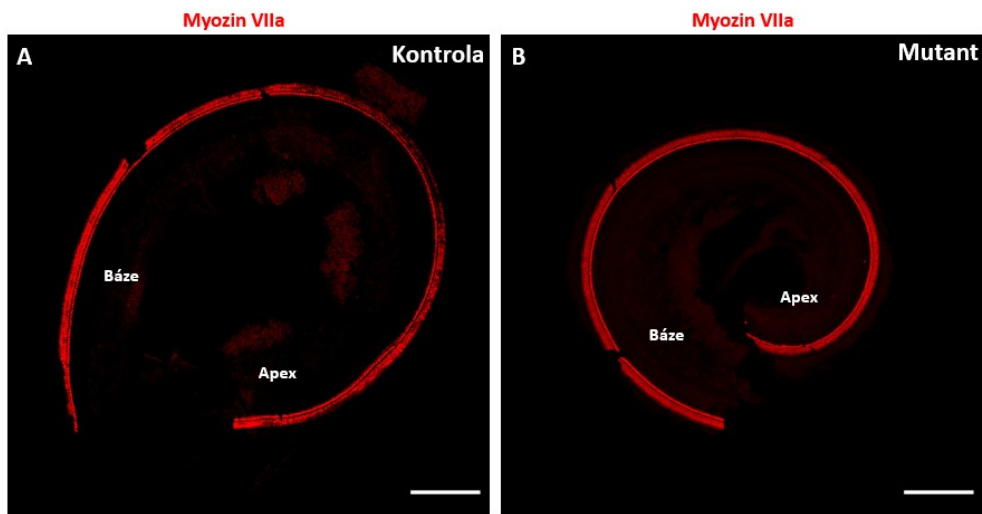
Obr. 20: Graf počtu neuronů u kontrol a mutantů v E18,5. U mutantů jsme detekovali signifikantní úbytek neuronů spirální ganglia, který činil 49 %. Hodnoty představují aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: *** P < 0,001. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

6.6 Zkrácení senzorigického epitelu v kochleji a zmenšené vestibulární orgány

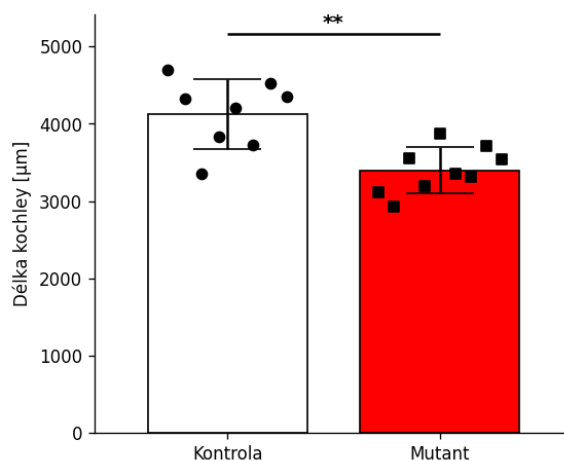
Při poslední morfologické analýze této práce jsme se zaměřili na zhodnocení délky senzorigického epitelu kochleji a na porovnání velikosti všech vestibulární orgánů; tj. utrikulus, sakulus, horizontální krusta, anteriorní krusta a posteriorní krusta mezi kontrolami a mutanty.

Jednotlivé „wholemount“ orgány včetně kochlejí jsme podrobili imunohistochemickému barvení a k vizualizaci vláskových buněk, tedy senzorigického epitelu jak kochlejí (Obr. 21), tak vestibulárních orgánů, jsme použili protilátku proti myozinu VIIa. Díky tomuto barvení byla změřena délka 8 kontrolních a 9 mutantních kochlejí myších embryí ve věku E18,5. Senzorigický epitel kochlejí u mutantů byl oproti kontrolám zkrácen o 18 % (Obr. 22).

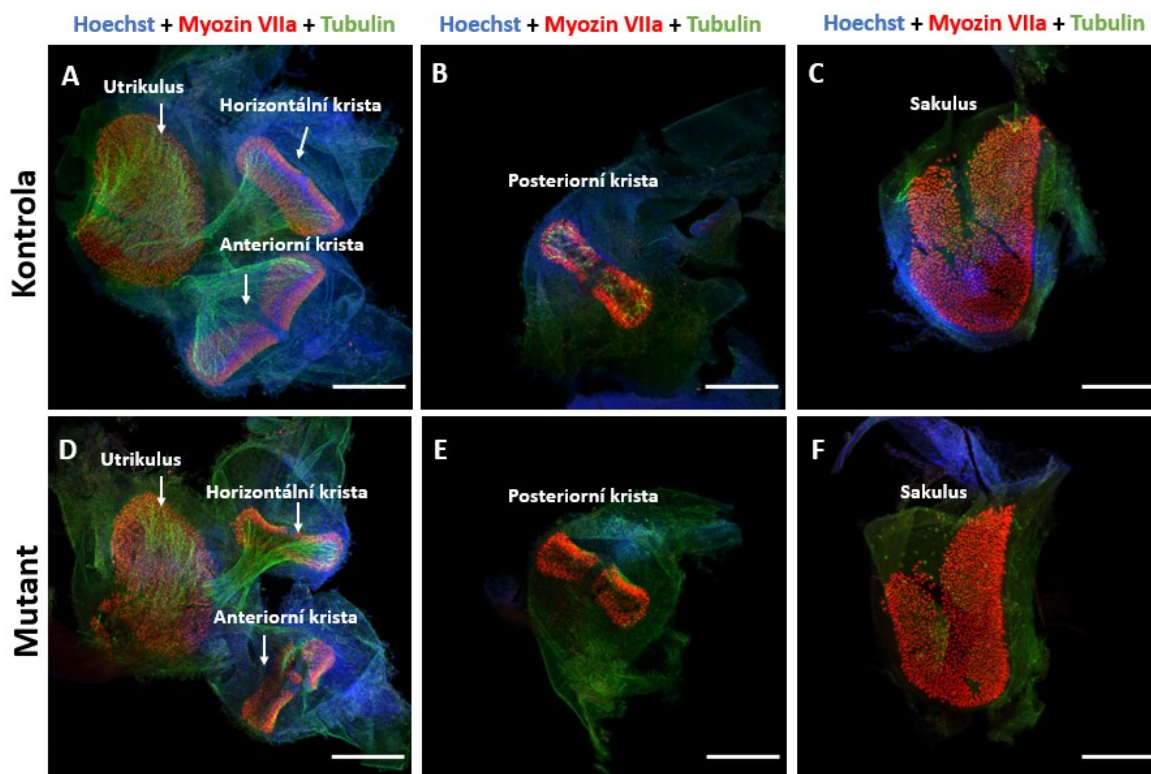
Vizualizací vláskových buněk, které tvoří senzorigický epitel rovněž i u vestibulárních orgánů, jsme byli schopni změřit plochu těchto orgánů (Obr. 23). Zároveň s myozinem VIIa jsme využili protilátku proti tubulinu k zobrazení nervových vláken a k detekci buněčných jader bylo použito barvivo Hoechst. Pro tuto analýzu jsme využili 7 kontrolních a 6 mutantních utrikulů, 7 kontrolních a 6 mutantních sakulů, 9 kontrolních a 8 horizontálních křist, 9 kontrolních a 7 mutantních anteriorních křist a 9 kontrolních a 9 mutantních posteriorních křist. Detekovali jsme signifikantní zmenšení senzorigického epitelu u všech vestibulární orgánů. Konkrétně v případě utrikulu byla plocha u mutantů zmenšená o 25 %, v případě sakulu dokonce o 39 %, u horizontální křisty činilo zmenšení senzorigického epitelu mutantů 36 %, u anteriorní křisty byl epitel zmenšen o 40 % a v případě posteriorní křisty o 28 % (viz Obr. 24).



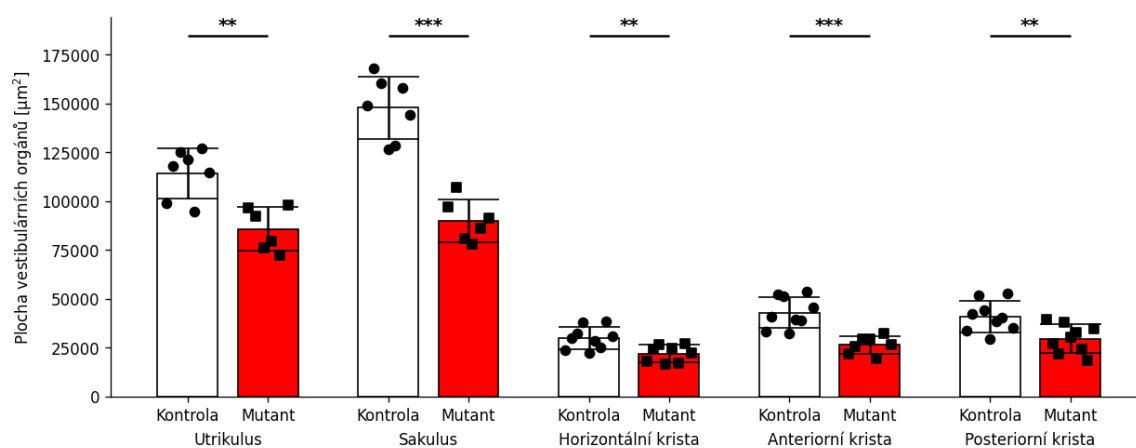
Obr. 21: Délka sensorického epitelu v kochleě v E18,5. Kochleární vláskové buňky v jsou na obrázku vizualizovány protilátkou proti myozinu VIIa (červeně). Délka epitelu byla změřena v prostoru mezi vnitřní řadou vláskových buněk a první řadou vnějších vláskových buněk. Na obrázku je vidět, že sensorický epitel kontrolních kochleí (A) je výrazně delší než u mutantů (B) Měřítka: 200 μm .



Obr. 22: Graf délky sensorického epitelu v kochleě v E18,5. Z grafu je patrné signifikantní zkrácení sensorického epitelu, které představovalo 18 %. Hodnoty představují aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: ** $P < 0,01$. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.



Obr. 23: Znárodnění senzorního epitelu vestibulárních orgánů v E18,5. Vláškové buňky jsou na obrázku vizualizovány protilátkou proti myozinu VIIa (červeně), nervová vlákna protilátkou proti tubulinu (zeleně) a pro zobrazení buněčných jader bylo využito barvivo Hoechst (modře). V horním panelu jsou zobrazeny vestibulární orgány kontrolních jedinců (A: utrikulus, horizontální krísta, anteriorní krísta; B: posteriorní krísta; C: sakulus). V dolním panelu jsou zobrazeny vestibulární orgány mutantů (D: utrikulus, horizontální krísta, anteriorní krísta; E: posteriorní krísta; F: sakulus). Měřítko: 200 μm .



Obr. 24: Grafy velikostí vestibulárních orgánů v E18,5. Z grafu je patrné, že u všech vestibulárních orgánů mutantů došlo ke zmenšení velikosti v porovnání s kontrolními jedinci. Hodnoty představují aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

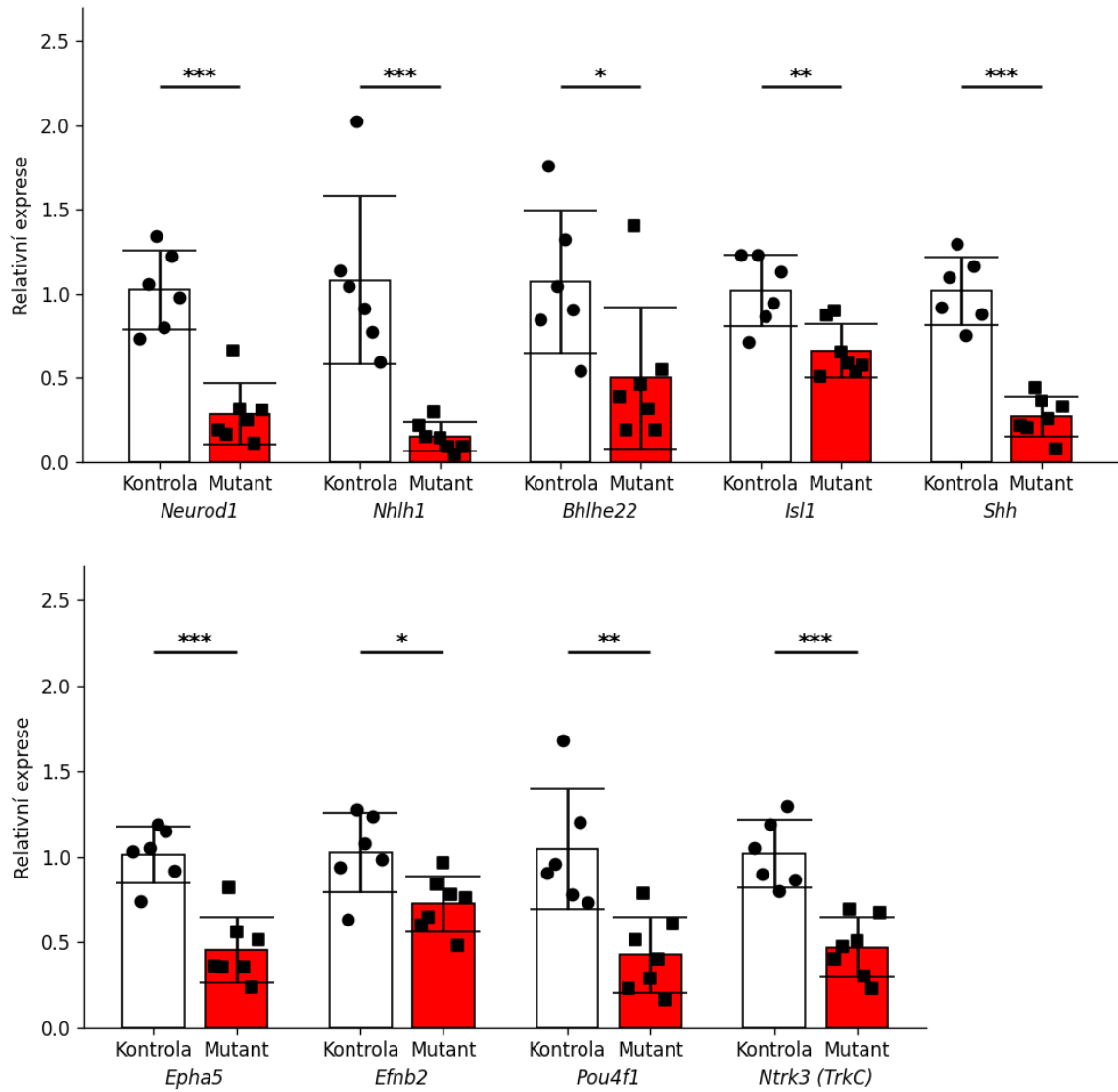
6.7 Změny v relativní expresi vybraných genů v E14,5

Vzhledem k zaznamenaným defektům souvisejícím s delecí genu *Neurod1* u mutantů, jsme se rozhodli charakterizovat změny v genové expresi během embryonálního vývoje vnitřního ucha. Cílové geny byly vybrány s ohledem na výsledky RNA sekvenování, které provedli kolegové z laboratoře molekulární patogenetiky, a s ohledem na jejich známou roli při vývoji vnitřního ucha či samotných neuronů a jejich funkci (viz kapitola 3.2.2). Pro tuto analýzu a ověření získaných výsledků RNA sekvenování byly využity kochlely z šesti kontrolních a sedmi mutantních embryí ve věku E14,5, ze kterých byla izolována RNA (viz kapitola 5.3.5). Z této RNA byla pomocí reverzní transkripce připravena cDNA (viz kapitola 5.3.6) a ta byla dále využita ke qPCR (viz kapitola 5.3.7). Exprese všech genů byla vztažena k expresi kontrolního genu *Hprt1* („Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1“).

Exprese genu *Neurod1* byla u mutantů signifikantně snížena (Obr. 25) a tento výsledek potvrzuje vysokou účinnost delece *Neurod1* v neuronech vnitřního ucha.

Největší rozdíl jsme detekovali mezi kontrolní a mutantní skupinou v expresi genu *Nhlh1*, kdy byla exprese tohoto genu u mutantů více než 7x snížena (Obr. 25). Mezi další geny, které delece *Neurod1* v neuronech vnitřního ucha zasáhla nejvíce patří taktéž *Shh*, kde byla exprese u mutantů snížena 3,8x, dále *Epha5*, kdy snížení u mutantů bylo více než dvojnásobné a *Ntrk3*, kdy byla exprese u mutantů snížena 2,2x (Obr. 25). Menší, ale přesto statistický významný rozdíl byl detekován taktéž v expresích genů *Isl1*, *Bhlhe22* a *Pou4f1*.

Naopak nejméně byla delecí genu *Neurod1* ovlivněna exprese genu *Efnb2*. Jehož exprese byla snížena pouze 1,4x (Obr. 25). Přesto se stále jedná o významné snížení relativní genové exprese.



Obr. 25: Změny v relativní expresi genů ve věku E14,5. Jednotlivé hodnoty kontrolních vzorků jsou znázorněny kolečky. Naměřené hodnoty u mutantů představují čtverečky. Hodnoty jsou normalizované ke kontrolnímu genu *Hprt1*. U mutantů jsme zaznamenali sníženou expresi u všech námi vybraných genů. Hodnoty představují aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. Míra statistické významnosti určena pomocí P-hodnoty: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Vypočteno pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu.

7 Diskuze

7.1 Mutanti *Neurod1ST* nejsou po narození životaschopní

Pro objasnění funkční role transkripčního faktoru NEUROD1 ve vývoji neuronů a jejich inervace ve vnitřním uchu byl pomocí rekombinačního systému Cre-LoxP vytvořen nový myší model *Neurod1-Cre*, *Neurod1^{ff}* (viz kapitola 5.2). Pro delecí *Neurod1^{ff}* byla použita *Neurod1-Cre* rekombináza s Cre kódující sekvencí vloženou do translačního iniciačního ATG genu *Neurod1* (Li a kol., 2012). Analýzy *Neurod1-Cre* exprese ukázaly, že CRE je ve vnitřním uchu exprimována pouze v neuronech bez ovlivnění exprese *Neurod1* v okolním senzorigickém epitelu. Díky tomuto modelu jsme tak byli schopni podrobněji analyzovat specifickou roli genu *Neurod1* během vývoje neuronů vnitřního ucha a oddělit možné sekundární účinky delecí *Neurod1* v senzorigickém epitelu na vývoj neuronů na rozdíl od předchozích studií (Jahan a kol., 2010a; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020; Filova a kol., 2022).

Mutanti s *Neurod1* delecí se rodili s menší hmotností, a navíc trpěli závažnou hyperglykemií, která svědčí o narušení vývoje slinivky břišní. To je zapříčiněno delecí genu *Neurod1* v buňkách slinivky, ve kterých je exprese *Neurod1* k udržení správné funkce orgánu klíčová, jak bylo ukázáno na modelu globální *Neurod1* delecí (Naya a kol., 1997). Brzy po narození tito jedinci umírají, a z důvodu letality mláďat jsme byli v naší studii omezeni na výzkum embryonálního vývoje, bez možnosti pozdějších postnatálních analýz. Tímto se náš model liší od jiných modelů s tkáňově specifickými delecemi *Neurod1*, které letalitě účinně předcházejí (Jahan a kol., 2010a; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2022), nebo od modelů s globálními delecemi *Neurod1*, ve kterých se podařilo letalitu zvrátit re-expresí *Neurod1* ve slinivce prostřednictvím vložení transgenu kódujícího *Neurod1* pod inzulínový promotor (Miyata a kol., 1999; Kim a kol., 2001).

Heterozygoti (*Neurod1-Cre*, *Neurod1^{ff/+}*) nevykazovali změny ve fenotypu, rozdíl v hmotnosti ani v hladině glukózy v krvi. Po narození stejně jako kontrolní jedinci bez transgenu *Cre* přežívají a nebyly detekovány ani žádné změny ve vývoji neuronů vnitřního ucha a ani samotného vnitřního ucha. Tato zjištění dokládají, že pouze jedna funkční alela genu *Neurod1* je dostatečná k udržení jeho správné funkce a že delecí jedné alely nemá vliv na morfologický vývoj vnitřního ucha a ani na vývoj slinivky břišní.

7.2 NEUROD1 je v neuronech vnitřního ucha eliminován efektivně, ale se zpožděním

Expresi NEUROD1 můžeme poprvé detekovat ve vyvíjejícím se otickém váčku již v E8,75 (Liu a kol., 2000) a jeho exprese je ve středu statoakustického ganglia přirozeně snížena, když se neurony stávají maturované (Deng a kol., 2014). Abychom zjistili, jaká je účinnost delece *Neurod1* ve vyvíjejícím se otickém váčku, a zároveň porovnali expresi *Cre* rekombinázy pod *Neurod1* promotorem s expresí samotného genu *Neurod1*, využili jsme mutantní a heterozygotní embrya s expresí *Cre* ve věku E10,5. Naše výsledky ukázaly, že v nejraněji delaminovaných neuronech mutantních ganglií docházelo k eliminaci NEUROD1, zatímco exprese CRE byla zachována v celém gangliu. Díky tomuto výsledku považujeme deleci *Neurod1* v buňkách mutantního modelu *Neurod1-Cre*, *Neurod1^{ff}* za efektivní, ale mírně opožděnou. Zatímco NEUROD1 pozitivní buňky detekujeme hojně již v neuroblastech v epitelu otického váčku, CRE zde detekujeme v menším počtu buněk a detekovaný signál byl výrazně slabší. Naše výsledky ukazují, že dochází k časové prodlevě v eliminaci NEUROD1 ve vyvíjejících neuronech ganglia vnitřního ucha. Exprese NEUROD1 a CRE rekombinázy je v našem modelu řízena stejnou regulací a pod stejným *Neurod1* promotorem. Zároveň je zapotřebí určitá prahová hodnota koncentrace nasyntetizovaného proteinu CRE, aby mohlo dojít k účinné deleci *Neurod1*. Tato skutečnost by vysvětlovala deleci *Neurod1* v nejraněji diferencovaných neuronech na okraji ganglia, a tedy časovým posunem v účinné eliminaci NEUROD1 proteinu.

7.3 Delece *Neurod1* v neuronech vede ke zvýšené apoptóze

Předchozí studie ukázala, že raná delece *Neurod1* vedla k výraznému zmenšení statoakustického ganglia a téměř úplné ztrátě ISL1 pozitivních neuronů z důvodu snížené tvorby neuroblastů a apoptózy ve věku E10,5 (Filova a kol., 2022). V naší práci jsme oproti tomu ukázali, že opožděná delece *Neurod1* během embryonálního vývoje ve věku E10,5 neovlivňuje velikost a formaci statoakustického ganglia ani počet ISL1⁺ neuronů. Tyto výsledky ukazují, že není významně ovlivněna neurogeneze v tomto vývojovém stádiu vnitřního ucha, přestože počet NEUROD1 pozitivních neuronů u mutantů byl snížen o téměř 41 %. Naše výsledky také ukázaly, že ve věku E10,5 se významně navyšuje apoptóza v oblasti statoakustického ganglia mutantů, která přispívá ke snížení počtu neuronů vnitřního ucha u mutantů v pozdějším věku (Obr. 20). To potvrzuje již dřívější tvrzení, že *Neurod1* je nezbytný pro přežití neuronů vnitřního ucha během embryonálního vývoje (Liu a kol., 2000; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2022).

Jedním z důležitých mechanismů pro přežití neuronů je tzv. neurotrofinová signální dráha. Neurotrofin NT3 a jeho receptor NTRK3 jsou esenciální pro regulaci přežívání neuronů spirálního ganglia (Fritzscha a kol., 1997; Yang a kol., 2011). Ztráta neurotrofinu NT3 vede ke ztrátě mnoha spirálních neuronů, především v bázi kochley, což je způsobeno jejich zvýšenou apoptózou (Fariñas a kol., 2001). Exprese neurotrofinového receptoru NTRK3 na povrchu neuronů spirálního ganglia je regulována NEUROD1, v jehož nepřítomnosti dochází k selhání exprese *Ntrk3*, a tudíž i k výše zmiňované zvýšené míře apoptózy neuronů (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001). V této regulační síti je zapojen také transkripční faktor POU4F1, jenž pozitivně reguluje expresi neurotrofinových receptorů (McEvelly a kol., 1996; Huang a kol., 1999; Huang a kol., 2001). Jak ukázaly naše výsledky studie změn genové exprese, byla v případě mutantních jedinců více než 2x snížena exprese neurotrofinového receptoru *Ntrk3* a rovněž signifikantně snižená exprese *Pou4f1*, což poukazuje na přímý důsledek delece *Neurod1* a snížení exprese *Pou4f1* a *Ntrk3*. Snižovaná exprese těchto genů ukazuje na sníženou neurotrofinovou signalizaci v důsledku čehož mají neurony zhoršené schopnosti přežívání, což vede k následné apoptóze (Fritzscha a kol., 1997; Fariñas a kol., 2001; Yang a kol., 2011).

Proliferační neuroblastů nebyla u mutantních jedinců ovlivněna v porovnání s kontrolami. To naznačuje, že NEUROD1 není, alespoň ve věku E10,5, potřebný k proliferaci neuronů ve vnitřním uchu, což je v souladu s výsledky dřívějších studií (Filova a kol., 2022).

7.4 NEUROD1 reguluje tvorbu spirálního ganglia, migraci neuronů a organizaci kochleární inervace

V průběhu embryonálního vývoje dochází k rozdělení původního společného statoakustického ganglia na dvě samostatná ganglia; spirální a vestibulární. Mutanti s globální delecí genu *Neurod1* vykazují téměř úplnou ztrátu spirálních neuronů a podstatný úbytek vestibulární neuronů (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001). V našem mutantním modelu s opožděnou delecí *Neurod1* jsme díky imunohistochemickému barvení řezů kochley zaznamenali téměř 50% úbytek spirálních neuronů ve věku E18,5 v porovnání s kontrolami. Tento úbytek je mírnější než v případě globálních delecí *Neurod1*, kdy dochází k narušení neurogeneze, na rozdíl od našeho experimentálního modelu s opožděnou delecí *Neurod1*, kdy neurony statoakustického ganglia delaminují a proliferují.

Zároveň ani u modelů s globální delecí *Neurod1* nedošlo k úplné eliminaci všech neuronů vnitřního ucha. Významný úbytek mnoha, ale ne všech neuronů u tkáňově specifických delecí *Neurod1* byly detekovány také v předešlých studiích (Jahan a kol., 2010b; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020; Filova a kol., 2022). Můžeme se domnívat, že přežívající neurony mohou být

zachovány v důsledku exprese alespoň jednoho (Krüger a kol., 2006), popřípadě několika jiných bHLH genů (Fritzsche a kol., 2010), které v nepřítomnosti *Neurod1* částečně regulují přežití alespoň některých neuronů.

Analýzy ve věku E18,5 odhalily kromě signifikantního úbytku spirálních neuronů také defekty během tvorby spirálního ganglia související s nesprávnou migrací neuronů a jejich úbytkem. Pomocí imunohistochemického barvení „wholemount“ kochleí jsme detekovali narušenou tvorbu spirálního ganglia u kochleí mutantních jedinců. Větší počet neuronů se u mutantních ganglií nacházel mimo svou obvyklou pozici ve spirálním (Rosenthalově) kanálu a na mnoha místech neurony zcela chyběly.

Defektní lokalizaci a narušenou migraci neuronů, které zůstaly na pomezí obou ganglií, jsme potvrdili také na imunohistochemicky obarvených řezech vnitřního ucha. V práci Krüger a kol. (2006) bylo ukázáno, že bHLH transkripční faktor NHLH1 může fungovat také jako regulátor migrace neuronů. Ačkoliv tato studie poukazuje na možnou vzájemnou zastupitelnost genů *Neurod1* a *Nhlh1*, náš výzkum změn v genové expresi odhalil u mutantů s delecí *Neurod1* významný, téměř sedminásobný pokles exprese genu *Nhlh1*. Sníženou expresi tohoto genu detekovali také ve své studii Jahan a kol. (2010a). Domníváme se tedy, že narušená migrace některých neuronů je způsobena nedostatečnou aktivitou genu *Neurod1* a zároveň *Nhlh1*. V našich molekulárních analýzách jsme zaznamenali signifikantní pokles v expresi genů pro efrinové receptory (EPHA5) a jejich ligandy efriny (EFNB2), které se rovněž podílejí na regulaci správné migrace neuronů (Cramer, 2005; Raft a kol., 2014). Velká část neuronů však do ganglií migrovala správně. Je tedy možné, že částečný kompenzační efekt zajistila možná zvýšená exprese druhého genu z *Nhlh* rodiny; *Nhlh2*, či úplně jiného genu, jejichž genovou expresi jsme v této práci neanalyzovali.

Dále jsme zaznamenali zřetelné změny v inervaci kochley u mutantů v porovnání s kontrolami. U zdravých kontrolních jedinců vytvářejí eferentní vlákna typický intraganglionický svazek, který se formuje podél spirálního ganglia. U mutantních jedinců k formaci intraganglionického eferentního svazku nedocházelo. Jednotlivá eferentní vlákna byla různě rozptýlena, porušena a nevytvářela kompaktní strukturu uceleného svazku. Stejný defekt ve formaci intraganglionického eferentního svazku byl identifikován v případě dřívějších studií (Jahan a kol., 2010a; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020) a také v práci Filova a kol. (2022), kde autoři detekovali pouze rudimentální spirální ganglionium s absencí tvorby těchto eferentních vláken. Tato data podporují hypotézu, že velká část trajektorie eferentních vláken uvnitř spirálního ganglia závisí na distribuci jeho neuronů.

I přes signifikantní úbytek neuronů spirálního ganglia tvořila nervová vlákna zbylých neuronů poměrně komplexní síť radiálních vláken. Tato aferentní vlákna inervují vláskové buňky tvořící sensorický epitel kochley. Mezi kontrolními jedinci a mutanty jsme však zaznamenali výrazné rozdíly v hustotě jednotlivých svazků radiálních vláken. Analýzou hustoty těchto svazků jsme potvrdili výrazné snížení hustoty svazků radiálních vláken u mutantů ve všech částech kochley. Tato data jsou konzistentní s předchozími studiemi tkáňově specifických delecí *Neurod1* (Jahan a kol., 2010a; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020).

7.5 Sensorický epitel kochley a vestibulárních orgánů je zmenšený v absenci NEUROD1 v neuronech

Přestože je exprese genu *Neurod1* detekovatelná již v delaminujících neuroblastech ve věku E8,75, v sensorickém epitelu dochází k expresi *Neurod1* výrazně později. NEUROD1 můžeme v sensorickém epitelu kochley slabě detekovat až od věku E15,5, v případě vláskových buněk sensorických orgánů vestibulárního systému mezi E13 a E14 (Liu a kol., 2000). V případě našeho mutantu nedochází k expresi *Cre* rekombinázy v sensorickém epitelu, a tudíž ani k deleci *Neurod1*, což bylo ukázáno kolegy z Laboratoře molekulární patogenetiky během analýz s využitím reportérového genu *tdTomato*. Náš model tedy umožňuje zhodnocení přímého vlivu *Neurod1* delece v neuronech na vývoj sensorického epitelu.

Ve věku E18,5 jsme analyzovali délku kochley a velikost vestibulárních orgánů u kontrolních a mutantních jedinců. V případě kochley bylo zjištěno zkrácení sensorického epitelu Cortiho orgánů o 18 %. V předešlých modelech došlo ještě k výraznějším zkrácením Cortiho orgánu. V případě studie Macova a kol. (2019) byl epitel Cortiho orgánu zkrácen o 40 % a v případě Filova a kol. (2022) dokonce o 53 %. Tyto výsledky jsou v souladu se zaznamenanou větší ztrátou neuronů v porovnání s naším modelem. Ještě výraznější změny jsme detekovali mezi vestibulárními orgány, kdy byl nejvíce zmenšen sensorický epitel sakulu a anteriorní kristy (téměř o 40 %). Globální delece *Neurod1* vedly také k výraznému zkrácení kochleární trubice a orgány vestibulárního systému vykazovaly značné zmenšení (Liu a kol., 2000; Kim a kol., 2001). V případě tkáňově specifických delecí byla podobně jako v našem případě zkrácená jak kochlea, tak byl výrazně zmenšen i sensorický epitel vestibulárních orgánů (Jahan a kol., 2010b; Macova a kol., 2019; Filova a kol., 2020; Filova a kol., 2022). Ke zkrácení kochley dochází také v případě delecí genu *Neurog1*, kde je efekt zkrácení kochley a zmenšení vestibulárních orgánů ještě výraznější. Jedná se o sekundární důsledek ztráty neuronů, kdy v případě globální delece *Neurog1* nevznikají žádné neurony (Ma a kol., 1998; Ma a kol., 2000). Méně závažný účinek delece *Neurod1* by mohl souviset se

skutečností, že je *Neurod1* lokalizován „downstream“ od genu *Neurog1* a některé běžné prekuzory sensorických neuronů či vlasových buněk se již mohly oddělit, diferencovat a podílet se na tvorbě sensorického epitelu (Jahan a kol., 2010b). Jak jsou ale tyto dva bHLH transkripční faktory NEUROG1 a NEUROD1 propojeny v regulační síti ovlivňující kochleární a vestibulární morfogenezi zůstává doposud stále nejasné. V případě našeho mutanta s *Neurod1* delecí pouze v neuronech vnitřního ucha, sensorický epitel kochley i vestibulárních orgánů může být tedy redukován pouze jako sekundární efekt v důsledku celkového zmenšení spirálního a vestibulární ganglia, způsobený apoptózou buněk v nepřítomnosti NEUROD1.

7.6 *Neurod1* je klíčový regulační faktor ve vývoji neuronů

V druhé části naší práce jsme se rozhodli identifikovat molekulární změny, které jsou ovlivněny delecí *Neurod1*. Pro následnou analýzu relativní genové exprese pomocí RT-qPCR byly vybrány geny kódující transkripční faktory, receptory, ligandy a signální molekuly důležité ve vývoji vnitřního ucha, či neurogenezi a pro funkci samotných neuronů; tedy: *Neurod1*, *Nhlh1*, *Bhlhe22*, *Isl1*, *Shh*, *Epha5*, *Efnb2*, *Pou4f1* a *Ntrk3* (podrobněji viz kapitola 3.2.2).

Změny v genové expresi jsme porovnali mezi kontrolními jedinci a mutanty ve věku E14,5 a srovnali je také s výsledky z RNA sekvenování, které provedli již dříve kolegové z Laboratoře molekulární patogenetiky. Touto analýzou jsme ověřili výsledky RNA sekvenování a detekovali sníženou genovou expresi u všech námi vybraných genů. Pro RNA sekvenování byly pomocí metody FACS nasortovány a využity pouze neurony, bez sensorického epitelu. Pro RT-qPCR analýzy byla použita RNA izolovaná z celé kochley, tedy i s vláskovými a dalšími buňkami, ve kterých není exprese *Neurod1* v případě tohoto mutantního modelu ovlivněna. Analýzy pomocí RT-qPCR potvrdily výsledky RNA sekvenování u všech námi vybraných genů.

Jak již bylo zmíněno výše, delece genu *Neurod1* negativně ovlivnila expresi *Pou4f1* a genu pro neurotrofinový receptor *Ntrk3*. Oba jsou klíčové pro přežívání neuronů a neurotrofinovou signalizaci (McEvelly a kol., 1996; Fritzsche a kol., 1997; Fariñas a kol., 2001), neboť transkripční faktor POU4F1 navíc pozitivně reguluje expresi neurotrofinových receptorů (McEvelly a kol., 1996; Huang a kol., 1999; Huang a kol., 2001) a důsledek poklesu exprese *Pou4f1* a *Ntrk3* v našem mutantním modelu tedy může vést ke zvýšené apoptóze a úbytku neuronů u mutantních jedinců.

Transkripční faktor NHLH1 se společně s NEUROD1 podílí na správné migraci neuronů (Krüger a kol., 2006; Jahan a kol., 2010a). NEUROD1 slouží jako regulátor „downstream“ transkripčního faktoru NHLH1 a je esenciální pro jeho indukci (Kim, 2012). Defekt v migraci neuronů u našeho *Neurod1* mutanta koreluje s poklesem exprese transkripčního faktoru NHLH1.

Nedostatečná signalizace a regulace pomocí těchto transkripčních faktorů mohla narušit migraci neuronů, které zůstaly na pomezí obou ganglií vnitřního ucha a mimo svou obvyklou pozici v Rosenthalově kanálu. Zároveň byla ale snížena exprese dalších proteinů, které jsou aktivně zapojeny do neuronové migrace; efrinový receptor EPHA5 (Cramer, 2005) a jeho ligand efrin EFNB2 (Raft a kol., 2014). Signalizace mezi efriny a jejich receptory, které se nacházejí na povrchu neuronů, je klíčová pro zprostředkování migrace neuronů, navádění axonů a synaptogenezi (Chumley a kol., 2007). Děje se tak prostřednictvím obousměrné intracelulární signalizace, kdy dojde k zapojení receptoru a ligandu na dvou sousedních buňkách. Přenášený signál aktivuje cytoskelet, což indukuje změny v migraci buněk či navádění axonů (Henkemeyer a kol., 1996; Holland a kol., 1996).

Detekovali jsme také změny v genové expresi genů důležitých pro samotný vývoj vnitřního ucha a neurogenezi. Bylo ukázáno, že morfogen SHH je esenciální v časných stádiích morfogeneze vnitřního ucha a podílí se na specifikaci neuronů, tvorbě kochley, ale také na vytvoření ochranného chrupavčitého obalu vnitřního ucha (Liu a kol., 2002). Dalším důležitým transkripčním faktorem je ISL1, který pravděpodobně zastává důležitou roli při diferenciaci a funkci neuronů a během samotné specifikace a diferenciaci neuronů a sensorických buněk, jak bylo ukázáno v předchozích studiích (Radde-Gallwitz a kol., 2004; Chumak a kol., 2016; Bohuslavova a kol., 2017). Stěžejním bHLH transkripčním faktorem pro neurogenezi je BHLHE22. Jak bylo ukázáno z lokalizace jeho exprese, je vysoce pravděpodobné, že hraje důležitou roli v procesu neurogeneze (Brunelli a kol., 2003). Navíc byla odhalena jeho exprese v dorzálních kochleárních jádrech a myši postrádající BHLHE22 vykazovaly dramaticky snížený počet neuronů v těchto jádrech, což svědčí o roli tohoto transkripčního faktoru ve vývoji centrální sluchové dráhy (Cai a kol., 2016).

Výsledky molekulární analýzy změn v expresi vybraných genů v naší práci dokazují, že transkripční faktor NEUROD1 reguluje přímo i nepřímo expresi genů, jejichž produkty jsou důležité pro přežití, migraci a tvorbu inervace. Vývoj neuronů je regulován širokou sítí transkripčních faktorů a signálních molekul, je však zřejmé, že transkripční faktor NEUROD1 je v této regulační síti důležitým hráčem.

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat a objasnit vliv transkripčního faktoru NEUROD1 na vývoj vnitřního ucha, a především na vývoj neuronů spirálního ganglia. K vytvoření mutantního myšího modelu *Neurod1ST* byl využit rekombinační systém Cre-loxP. Jedná se o model s tkáňově specifickou delecí *Neurod1* pouze v NEUROD1⁺ buňkách, díky specifickému vložení genu pro Cre rekombinázu do oblasti *Neurod1* promotoru. CRE rekombináza následně štěpí gen *Neurod1* ohraničen *loxP* místy. V případě vnitřního ucha dochází v tomto modelu k vyštěpení genu *Neurod1* pouze v neuronech, bez ovlivnění jeho exprese v sensorickém epitelu. Díky tomu jsme mohli oddělit možné sekundární účinky delecí *Neurod1* v sensorickém epitelu na vývoj neuronů.

Transkripční faktor NEUROD1 je rovněž klíčový pro vývoj slinivky břišní, kde jeho eliminace vede k letalitě mláďat v důsledku hyperglykémie. Z výsledků této práce je zřejmé, že je NEUROD1 u mutantních jedinců účinně eliminován i v endokrinních buňkách slinivky, což vede k rozvoji hyperglykémie časně po narození. Tito jedinci se zároveň rodí menší a díky vývojovým defektům ve slinivce krátce po narození umírají. Z tohoto důvodu byla role NEUROD1 v této práci studována pouze během embryonálního vývoje do věku E18,5.

Jak ukazují výsledky naší práce, delecí *Neurod1* neovlivnila časný vývoj statoakustického ganglia. Ganglium bylo u mutantů srovnatelně velké s kontrolními jedinci a bylo umístěno ve standardní pozici v blízkosti otického vřáčku v E10,5. Zároveň však byl zaznamenán signifikantní úbytek NEUROD1 v buňkách statoakustického ganglia. Jednalo se o eliminaci NEUROD1 v nejraněji delaminovaných buňkách na okraji ganglia, zatímco v buňkách, které delaminovaly později zůstala exprese proteinu NEUROD1 zachována. Jedná se tedy o opožděnou, ale přesto efektivní delecí *Neurod1* prostřednictvím *Neurod1-Cre* rekombinázy.

Zvýšená apoptóza ve statoakustickém gangliu koreluje se ztrátou neuronů ve spirálním a vestibulárním gangliu ve věku E18,5. Kromě sníženého počtu neuronů, byly neurony v případě mutantních jedinců různě rozptýleny, nacházely se mimo svou obvyklou pozici v Rosenthalově kanálu. Nedochozelo k formaci kompaktního pruhu spirálního ganglia, ale spíše k vytvoření náhodné neucelené struktury ganglia. Neurony mutantů tvořily svazky radiálních vláken inervující sensorické vláskové buňky. Tato aferentní inervace však byla silně redukována. Hustota radiálních vláken byla signifikantně nižší ve všech částech kochley v porovnání s kontrolními jedinci. Zároveň nedocházelo k formaci typického intraganglionického svazku eferentních vláken táhnoucího se podél spirálního ganglia. Eferentní vlákna byla u mutantů různě rozptýlena a nevytvářela strukturu kompaktního svazku. Delecí *Neurod1* ovlivnila také schopnost migrace neuronů a jejich správnou separaci do příslušných ganglií. Mnohé neurony zůstaly na pomezí spirálního a vestibulárního ganglia a kvůli úbytku neuronů byla obě ganglia zmenšená.

Náš mutantní model je unikátní, neboť se jedná o prvního mutantu, kde ve vnitřním uchu dochází k deleci genu *Neurod1* pouze v neuronech. Ztrátou neuronů byl ovlivněn taktéž sensorický epitel, ve kterém ale k deleci *Neurod1* nedochází, proto se jedná o sekundární vliv delece *Neurod1* v neuronech vnitřního ucha. Kochlea byla v případě mutantů zkrácena a rovněž všechny sensorické orgány vestibulárního systému vykazovaly signifikantní zmenšení.

Porovnáním exprese vybraných genů ve věku E14,5 jsme ukázali, že delece *Neurod1* negativně ovlivňuje expresi genů důležitých pro vývoj vnitřního ucha (*Isl1*, *Bhlhe22*, *Shh*), neuronů, jejich migraci (*Nhlh1*, *Epha5*, *Efnb2*) a přežívání (*Pou4f1*, *Ntrk3*). Regulační síť těchto genů je velice komplexní, je však zřejmé, že zde transkripční faktor NEUROD1 představuje klíčový regulační faktor.

Tato práce jasně potvrzuje, že je transkripční faktor NEUROD1 nepostradatelným hráčem ve vývoji vnitřního ucha a neuronů během časného embryonálního vývoje. Jeho absence vede k rozsáhlým defektům jak na buněčné, tak i na molekulární úrovni.

Seznam literatury

- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T., & Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*, *385*(6613), 257-260. doi: 10.1038/385257a0
- Ahmed, M., Wong, E. Y., Sun, J., Xu, J., Wang, F., & Xu, P. X. (2012). Eya1-Six1 interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating Atoh1 expression in cooperation with Sox2. *Dev Cell*, *22*(2), 377-390. doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.006
- Andermann, P., Ungos, J., & Raible, D. W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev Biol*, *251*(1), 45-58. doi: 10.1006/dbio.2002.0820
- *¹Angelaki, D. E., & Cullen, K. E. (2008). Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 125-150. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125555
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A. a kol. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, *284*(5421), 1837-1841. doi: 10.1126/science.284.5421.1837
- Bérubé, N. G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R. J. a kol. (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J Clin Invest*, *115*(2), 258-267. doi: 10.1172/jci22329
- Biedron, S., Westhofen, M., & Ilgner, J. (2009). On the number of turns in human cochleae. *Otol Neurotol*, *30*(3), 414-417. doi: 10.1097/MAO.0b013e3181977b8d
- Bohuslavova, R., Dodd, N., Macova, I., Chumak, T., Horak, M., Syka, J. a kol. (2017). Pax2-Islet1 Transgenic Mice Are Hyperactive and Have Altered Cerebellar Foliation. *Mol Neurobiol*, *54*(2), 1352-1368. doi: 10.1007/s12035-016-9716-6
- Bohuslavova, R., Cerychova, R., Papousek, F., Olejnickova, V., Bartos, M., Görlach, A. a kol. (2019). HIF-1 α is required for development of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(27), 13414-13423. doi: 10.1073/pnas.1903510116
- Bok, J., Raft, S., Kong, K. A., Koo, S. K., Dräger, U. C., & Wu, D. K. (2011). Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(1), 161-166. doi: 10.1073/pnas.1010547108
- Brunelli, S., Innocenzi, A., & Cossu, G. (2003). Bhlhb5 is expressed in the CNS and sensory organs during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns*, *3*(6), 755-759. doi: 10.1016/s1567-133x(03)00135-2
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. a kol. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*, *5*(6), 877-889. doi: 10.1016/s1534-5807(03)00363-0
- Cai, X., Kardon, A. P., Snyder, L. M., Kuzirian, M. S., Minestro, S., de Souza, L. a kol. (2016). Bhlhb5::flpo allele uncovers a requirement for Bhlhb5 for the development of the dorsal cochlear nucleus. *Dev Biol*, *414*(2), 149-160. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.04.028
- *Cramer, K. S. (2005). Eph proteins and the assembly of auditory circuits. *Hear Res*, *206*(1-2), 42-51. doi: 10.1016/j.heares.2004.11.024
- *Čihák, R. (2016). *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání*: Grada Publishing as.
- Dabdoub, A., Puligilla, C., Jones, J. M., Fritzsich, B., Cheah, K. S., Pevny, L. H. a kol. (2008). Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(47), 18396-18401. doi: 10.1073/pnas.0808175105
- Dannhof, B. J., & Bruns, V. (1993). The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear Res*, *66*(1), 8-22. doi: 10.1016/0378-5955(93)90255-y

¹ Hvězdička označuje přehledové práce.

- Davies, K. (2020). The Inner Ear. [cit. 22/02/ 2022]. Dostupné z <https://teachmeanatomy.info/head/organs/ear/inner-ear/>
- de Lahunta, A., & Glass, E. (2009). Vestibular system: special proprioception. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*, 319.
- Deng, M., Yang, H., Xie, X., Liang, G., & Gan, L. (2014). Comparative expression analysis of POU4F1, POU4F2 and ISL1 in developing mouse cochleovestibular ganglion neurons. *Gene Expr Patterns*, 15(1), 31-37. doi: 10.1016/j.gexp.2014.03.001
- *Driver, E. C., & Kelley, M. W. (2020). Development of the cochlea. *Development*, 147(12). doi: 10.1242/dev.162263
- Druckendrod, N. R., & Goodrich, L. V. (2015). Sequential Retraction Segregates SGN Processes during Target Selection in the Cochlea. *J Neurosci*, 35(49), 16221-16235. doi: 10.1523/jneurosci.2236-15.2015
- Duncan, J. S., & Fritzsche, B. (2013). Continued expression of GATA3 is necessary for cochlear neurosensory development. *PLoS One*, 8(4), e62046. doi: 10.1371/journal.pone.0062046
- Dvorakova, M., Jahan, I., Macova, I., Chumak, T., Bohuslavova, R., Syka, J. a kol. (2016). Incomplete and delayed Sox2 deletion defines residual ear neurosensory development and maintenance. *Sci Rep*, 6, 38253. doi: 10.1038/srep38253
- Dvorakova, M., Macova, I., Bohuslavova, R., Anderova, M., Fritzsche, B., & Pavlinkova, G. (2020). Early ear neuronal development, but not olfactory or lens development, can proceed without SOX2. *Dev Biol*, 457(1), 43-56. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.09.003
- Ehret, G. (1978). Stiffness gradient along the basilar membrane as a basis for spatial frequency analysis within the cochlea. *J Acoust Soc Am*, 64(6), 1723-1726. doi: 10.1121/1.382153
- *Echteler, S. M., Fay, R. R., & Popper, A. N. (1994). Structure of the mammalian cochlea *Comparative hearing: mammals* (pp. 134-171): Springer.
- Ekdale, E. G. (2013). Comparative Anatomy of the Bony Labyrinth (Inner Ear) of Placental Mammals. *PLoS One*, 8(6), e66624. doi: 10.1371/journal.pone.0066624
- *Elliott, K. L., Pavlínková, G., Chizhikov, V. V., Yamoah, E. N., & Fritzsche, B. (2021). Development in the Mammalian Auditory System Depends on Transcription Factors. *Int J Mol Sci*, 22(8). doi: 10.3390/ijms22084189
- Fariñas, I., Jones, K. R., Tessarollo, L., Vigers, A. J., Huang, E., Kirstein, M. a kol. (2001). Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci*, 21(16), 6170-6180. doi: 10.1523/jneurosci.21-16-06170.2001
- Filova, I., Dvorakova, M., Bohuslavova, R., Pavlinek, A., Elliott, K. L., Vochoyanova, S. a kol. (2020). Combined Atoh1 and Neurod1 Deletion Reveals Autonomous Growth of Auditory Nerve Fibers. *Mol Neurobiol*, 57(12), 5307-5323. doi: 10.1007/s12035-020-02092-0
- Filova, I., Bohuslavova, R., Tavakoli, M., Yamoah, E. N., Fritzsche, B., & Pavlinkova, G. (2022). Early Deletion of Neurod1 Alters Neuronal Lineage Potential and Diminishes Neurogenesis in the Inner Ear. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10.
- Flock, A. (1964). Structure Of The Macula Utriculi With Special Reference To Directional Interplay Of Sensory Responses As Revealed By Morphological Polarization. *J Cell Biol*, 22(2), 413-431. doi: 10.1083/jcb.22.2.413
- Flores, E. N., Duggan, A., Madathany, T., Hogan, A. K., Márquez, F. G., Kumar, G. a kol. (2015). A non-canonical pathway from cochlea to brain signals tissue-damaging noise. *Curr Biol*, 25(5), 606-612. doi: 10.1016/j.cub.2015.01.009
- *Forge, A., & Wright, T. (2002). The molecular architecture of the inner ear. *Br Med Bull*, 63, 5-24. doi: 10.1093/bmb/63.1.5
- Frishkopf, L. S., & DeRosier, D. J. (1983). Mechanical tuning of free-standing stereociliary bundles and frequency analysis in the alligator lizard cochlea. *Hear Res*, 12(3), 393-404. doi: 10.1016/0378-5955(83)90008-4

- *Fritzsich, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L. M., & Farinas, I. (1997). Effects of neurotrophin and neurotrophin receptor disruption on the afferent inner ear innervation. *Semin Cell Dev Biol*, *8*, 277-284.
- *Fritzsich, B., Beisel, K. W., & Hansen, L. A. (2006). The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: a blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration? *Bioessays*, *28*(12), 1181-1193. doi: 10.1002/bies.20502
- *Fritzsich, B., Eberl, D. F., & Beisel, K. W. (2010). The role of bHLH genes in ear development and evolution: revisiting a 10-year-old hypothesis. *Cell Mol Life Sci*, *67*(18), 3089-3099. doi: 10.1007/s00018-010-0403-x
- Gálvez, H., Tena, J. J., Giraldez, F., & Abelló, G. (2017). The Repression of Atoh1 by Neurogenin1 during Inner Ear Development. *Front Mol Neurosci*, *10*, 321. doi: 10.3389/fnmol.2017.00321
- Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2002). Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci*, *5*(2), 147-154. doi: 10.1038/nn796
- Goebbels, S., Bode, U., Pieper, A., Funfschilling, U., Schwab, M. H., & Nave, K. A. (2005). Cre/loxP-mediated inactivation of the bHLH transcription factor gene NeuroD/BETA2. *Genesis*, *42*(4), 247-252. doi: 10.1002/gene.20138
- Goodyear, R. J., Marcotti, W., Kros, C. J., & Richardson, G. P. (2005). Development and properties of stereociliary link types in hair cells of the mouse cochlea. *J Comp Neurol*, *485*(1), 75-85. doi: 10.1002/cne.20513
- Hébert, J. M., & McConnell, S. K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol*, *222*(2), 296-306. doi: 10.1006/dbio.2000.9732
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J. T., Saxton, T. M., Roder, J., Pawson, T. a kol. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*, *86*(1), 35-46. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80075-6
- Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M., & Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature*, *383*(6602), 722-725. doi: 10.1038/383722a0
- Holton, T., & Hudspeth, A. J. (1983). A micromechanical contribution to cochlear tuning and tonotopic organization. *Science*, *222*(4623), 508-510. doi: 10.1126/science.6623089
- Huang, E. J., Zang, K., Schmidt, A., Saulys, A., Xiang, M., & Reichardt, L. F. (1999). POU domain factor Brn-3a controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating Trk receptor expression. *Development*, *126*(13), 2869-2882. doi: 10.1242/dev.126.13.2869
- Huang, E. J., Liu, W., Fritzsich, B., Bianchi, L. M., Reichardt, L. F., & Xiang, M. (2001). Brn3a is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development*, *128*(13), 2421-2432. doi: 10.1242/dev.128.13.2421
- *Hudspeth, A. J. (1989). How the ear's works work. *Nature*, *341*(6241), 397-404. doi: 10.1038/341397a0
- *Hudspeth, A. J. (2008). Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron*, *59*(4), 530-545. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.012
- Chang, Q., Tang, W., Ahmad, S., Zhou, B., & Lin, X. (2008). Gap junction mediated intercellular metabolite transfer in the cochlea is compromised in connexin30 null mice. *PLoS One*, *3*(12), e4088. doi: 10.1371/journal.pone.0004088
- Cheatham, M. A., Huynh, K. H., Gao, J., Zuo, J., & Dallos, P. (2004). Cochlear function in Prestin knockout mice. *J Physiol*, *560*(Pt 3), 821-830. doi: 10.1113/jphysiol.2004.069559
- Chen, P., Johnson, J. E., Zoghbi, H. Y., & Segil, N. (2002). The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development*, *129*(10), 2495-2505. doi: 10.1242/dev.129.10.2495

- Chumak, T., Bohuslavova, R., Macova, I., Dodd, N., Buckiova, D., Fritzs, B. a kol. (2016). Deterioration of the Medial Olivocochlear Efferent System Accelerates Age-Related Hearing Loss in Pax2-Isl1 Transgenic Mice. *Mol Neurobiol*, 53(4), 2368-2383. doi: 10.1007/s12035-015-9215-1
- Chumley, M. J., Catchpole, T., Silvany, R. E., Kernie, S. G., & Henkemeyer, M. (2007). EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 27(49), 13481-13490. doi: 10.1523/jneurosci.4158-07.2007
- Jaeger, R., Takagi, A., & Haslwanter, T. (2002). Modeling the relation between head orientations and otolith responses in humans. *Hear Res*, 173(1-2), 29-42. doi: 10.1016/s0378-5955(02)00485-9
- Jahan, I., Kersigo, J., Pan, N., & Fritzs, B. (2010a). Neurod1 regulates survival and formation of connections in mouse ear and brain. *Cell Tissue Res*, 341(1), 95-110. doi: 10.1007/s00441-010-0984-6
- Jahan, I., Pan, N., Kersigo, J., & Fritzs, B. (2010b). Neurod1 suppresses hair cell differentiation in ear ganglia and regulates hair cell subtype development in the cochlea. *PLoS One*, 5(7), e11661. doi: 10.1371/journal.pone.0011661
- *Jiang, L., Zheng, Z., & He, Y. (2021). Progress in protecting vestibular hair cells. *Arch Toxicol*, 95(8), 2613-2623. doi: 10.1007/s00204-021-03067-3
- Kersigo, J., & Fritzs, B. (2015). Inner ear hair cells deteriorate in mice engineered to have no or diminished innervation. *Front Aging Neurosci*, 7, 33. doi: 10.3389/fnagi.2015.00033
- *Khan, S., & Chang, R. (2013). Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation*, 32(3), 437-443. doi: 10.3233/nre-130866
- Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., Tang, A. S., Bell, D. M., Tease, C. a kol. (2005). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, 434(7036), 1031-1035. doi: 10.1038/nature03487
- Kikuchi, K., & Hilding, D. (1965). The development of the organ of Corti in the mouse. *Acta Otolaryngol*, 60(3), 207-222. doi: 10.3109/00016486509127003
- Kim, W. Y., Fritzs, B., Serls, A., Bakel, L. A., Huang, E. J., Reichardt, L. F. a kol. (2001). NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development*, 128(3), 417-426. doi: 10.1242/dev.128.3.417
- Kim, W. Y. (2012). NeuroD1 is an upstream regulator of NSCL1. *Biochem Biophys Res Commun*, 419(1), 27-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.100
- Kindt, K. S., Finch, G., & Nicolson, T. (2012). Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell*, 23(2), 329-341. doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.022
- Kopecky, B., Johnson, S., Schmitz, H., Santi, P., & Fritzs, B. (2012). Scanning thin-sheet laser imaging microscopy elucidates details on mouse ear development. *Dev Dyn*, 241(3), 465-480. doi: 10.1002/dvdy.23736
- Kozlov, A. S., Risler, T., & Hudspeth, A. J. (2007). Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nat Neurosci*, 10(1), 87-92. doi: 10.1038/nn1818
- *Králíček, P. (2011). *Úvod do speciální neurofyziologie*: Galén.
- Krüger, M., Schmid, T., Krüger, S., Bober, E., & Braun, T. (2006). Functional redundancy of NSCL-1 and NeuroD during development of the petrosal and vestibulocochlear ganglia. *Eur J Neurosci*, 24(6), 1581-1590. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05051.x
- Lahav, A., & Skoe, E. (2014). An acoustic gap between the NICU and womb: a potential risk for compromised neuroplasticity of the auditory system in preterm infants. *Front Neurosci*, 8, 381. doi: 10.3389/fnins.2014.00381
- Lanford, P. J., Lan, Y., Jiang, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T. a kol. (1999). Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet*, 21(3), 289-292. doi: 10.1038/6804

- *Latash, M. L. (2008). *Neurophysiological basis of movement: Human Kinetics*.
- Leibovici, M., Verpy, E., Goodyear, R. J., Zwaenepoel, I., Blanchard, S., Lainé, S. a kol. (2005). Initial characterization of kinocilin, a protein of the hair cell kinocilium. *Hear Res*, *203*(1-2), 144-153. doi: 10.1016/j.heares.2004.12.002
- Li, H. J., Kapoor, A., Giel-Moloney, M., Rindi, G., & Leiter, A. B. (2012). Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Dev Biol*, *371*(2), 156-169. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.08.023
- Liberman, M. C., Gao, J., He, D. Z., Wu, X., Jia, S., & Zuo, J. (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, *419*(6904), 300-304. doi: 10.1038/nature01059
- Lins, U., Farina, M., Kurc, M., Riordan, G., Thalmann, R., Thalmann, I. a kol. (2000). The otoconia of the guinea pig utricle: internal structure, surface exposure, and interactions with the filament matrix. *J Struct Biol*, *131*(1), 67-78. doi: 10.1006/jsbi.2000.4260
- Liu, C., Glowatzki, E., & Fuchs, P. A. (2015). Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(47), 14723-14727. doi: 10.1073/pnas.1515228112
- Liu, M., Pereira, F. A., Price, S. D., Chu, M. J., Shope, C., Himes, D. a kol. (2000). Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev*, *14*(22), 2839-2854. doi: 10.1101/gad.840500
- Liu, W., Li, G., Chien, J. S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C. a kol. (2002). Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev Biol*, *248*(2), 240-250. doi: 10.1006/dbio.2002.0733
- Lu, C. C., Appler, J. M., Houseman, E. A., & Goodrich, L. V. (2011). Developmental profiling of spiral ganglion neurons reveals insights into auditory circuit assembly. *J Neurosci*, *31*(30), 10903-10918. doi: 10.1523/jneurosci.2358-11.2011
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L., & Anderson, D. J. (1998). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron*, *20*(3), 469-482. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80988-5
- Ma, Q., Anderson, D. J., & Fritsch, B. (2000). Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *J Assoc Res Otolaryngol*, *1*(2), 129-143. doi: 10.1007/s101620010017
- Macova, I., Pysanenko, K., Chumak, T., Dvorakova, M., Bohuslavova, R., Syka, J. a kol. (2019). Neurod1 Is Essential for the Primary Tonotopic Organization and Related Auditory Information Processing in the Midbrain. *J Neurosci*, *39*(6), 984-1004. doi: 10.1523/jneurosci.2557-18.2018
- *Magariños, M., Contreras, J., Aburto, M. R., & Varela-Nieto, I. (2012). Early development of the vertebrate inner ear. *Anat Rec (Hoboken)*, *295*(11), 1775-1790. doi: 10.1002/ar.22575
- Matei, V., Pauley, S., Kaing, S., Rowitch, D., Beisel, K. W., Morris, K. a kol. (2005). Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Dev Dyn*, *234*(3), 633-650. doi: 10.1002/dvdy.20551
- McEvelly, R. J., Erkman, L., Luo, L., Sawchenko, P. E., Ryan, A. F., & Rosenfeld, M. G. (1996). Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature*, *384*(6609), 574-577. doi: 10.1038/384574a0
- *Mescher, A. (2010). Chapter 23. The eye and ear: special sense organs. *Junqueira's basic histology: text & atlas*.
- Millimaki, B. B., Sweet, E. M., Dhasan, M. S., & Riley, B. B. (2007). Zebrafish atoh1 genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development*, *134*(2), 295-305. doi: 10.1242/dev.02734
- Miyata, T., Maeda, T., & Lee, J. E. (1999). NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev*, *13*(13), 1647-1652. doi: 10.1101/gad.13.13.1647

- *Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., & Wu, D. K. (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J Neurosci*, *18*(9), 3327-3335. doi: 10.1523/jneurosci.18-09-03327.1998
- *Mysliveček, J. (2009). *Základy neurověd. 2., rozš. a přeprac. vyd. Praha: Triton.*
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B. a kol. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev*, *11*(18), 2323-2334. doi: 10.1101/gad.11.18.2323
- *Neves, J., Abelló, G., Petrovic, J., & Giraldez, F. (2013). Patterning and cell fate in the inner ear: a case for Notch in the chicken embryo. *Dev Growth Differ*, *55*(1), 96-112. doi: 10.1111/dgd.12016
- Pan, N., Jahan, I., Kersigo, J., Kopecky, B., Santi, P., Johnson, S. a kol. (2011). Conditional deletion of Atoh1 using Pax2-Cre results in viable mice without differentiated cochlear hair cells that have lost most of the organ of Corti. *Hear Res*, *275*(1-2), 66-80. doi: 10.1016/j.heares.2010.12.002
- *Patuzzi, R. (2011). Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential. *Hear Res*, *277*(1-2), 4-19. doi: 10.1016/j.heares.2011.01.010
- Payan, P., Kossmann, H., Watrin, A., Mayer-Gostan, N., & Boeuf, G. (1997). Ionic composition of endolymph in teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *J Exp Biol*, *200*(Pt 13), 1905-1912.
- Perkins, R. E., & Morest, D. K. (1975). A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J Comp Neurol*, *163*(2), 129-158. doi: 10.1002/cne.901630202
- Petrovic, J., Formosa-Jordan, P., Luna-Escalante, J. C., Abelló, G., Ibañes, M., Neves, J. a kol. (2014). Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development*, *141*(11), 2313-2324. doi: 10.1242/dev.108100
- Phelps, P. D. (1992). The basal turn of the cochlea. *Br J Radiol*, *65*(773), 370-374. doi: 10.1259/0007-1285-65-773-370
- Puligilla, C., Dabdoub, A., Brenowitz, S. D., & Kelley, M. W. (2010). Sox2 induces neuronal formation in the developing mammalian cochlea. *J Neurosci*, *30*(2), 714-722. doi: 10.1523/jneurosci.3852-09.2010
- Radde-Gallwitz, K., Pan, L., Gan, L., Lin, X., Segil, N., & Chen, P. (2004). Expression of Islet1 marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol*, *477*(4), 412-421. doi: 10.1002/cne.20257
- Raft, S., Koundakjian, E. J., Quinones, H., Jayasena, C. S., Goodrich, L. V., Johnson, J. E. a kol. (2007). Cross-regulation of Ngn1 and Math1 coordinates the production of neurons and sensory hair cells during inner ear development. *Development*, *134*(24), 4405-4415. doi: 10.1242/dev.009118
- Raft, S., Andrade, L. R., Shao, D., Akiyama, H., Henkemeyer, M., & Wu, D. K. (2014). Ephrin-B2 governs morphogenesis of endolymphatic sac and duct epithelia in the mouse inner ear. *Dev Biol*, *390*(1), 51-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.02.019
- Robertson, D., & Paki, B. (2002). Role of L-type Ca²⁺ channels in transmitter release from mammalian inner hair cells. II. Single-neuron activity. *J Neurophysiol*, *87*(6), 2734-2740. doi: 10.1152/jn.2002.87.6.2734
- Sapède, D., Dyballa, S., & Pujades, C. (2012). Cell lineage analysis reveals three different progenitor pools for neurosensory elements in the otic vesicle. *J Neurosci*, *32*(46), 16424-16434. doi: 10.1523/jneurosci.3686-12.2012
- Sher, A. E. (1971). The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl*, *285*, 1-77.

- Silos-Santiago, I., Fagan, A. M., Garber, M., Fritzsich, B., & Barbacid, M. (1997). Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur J Neurosci*, *9*(10), 2045-2056. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01372.x
- Silver, R. B., Reeves, A. P., Steinacker, A., & Highstein, S. M. (1998). Examination of the cupula and stereocilia of the horizontal semicircular canal in the toadfish *Opsanus tau*. *J Comp Neurol*, *402*(1), 48-61.
- *Slepecky, N. B. (1996). Structure of the mammalian cochlea *The cochlea* (pp. 44-129): Springer.
- Sobkowicz, H. M., Slapnick, S. M., & August, B. K. (1995). The kinocilium of auditory hair cells and evidence for its morphogenetic role during the regeneration of stereocilia and cuticular plates. *J Neurocytol*, *24*(9), 633-653. doi: 10.1007/bf01179815
- Steevens, A. R., Sookiasian, D. L., Glatzer, J. C., & Kiernan, A. E. (2017). SOX2 is required for inner ear neurogenesis. *Sci Rep*, *7*(1), 4086. doi: 10.1038/s41598-017-04315-2
- *Sterkers, O., Ferrary, E., & Amiel, C. (1988). Production of inner ear fluids. *Physiol Rev*, *68*(4), 1083-1128. doi: 10.1152/physrev.1988.68.4.1083
- *Streit, A. (2001). Origin of the vertebrate inner ear: evolution and induction of the otic placode. *J Anat*, *199*(Pt 1-2), 99-103. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19910099.x
- Sun, Y., Dykes, I. M., Liang, X., Eng, S. R., Evans, S. M., & Turner, E. E. (2008). A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci*, *11*(11), 1283-1293. doi: 10.1038/nn.2209
- Tilney, L. G., & Saunders, J. C. (1983). Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. I. Length, number, width, and distribution of stereocilia of each hair cell are related to the position of the hair cell on the cochlea. *J Cell Biol*, *96*(3), 807-821. doi: 10.1083/jcb.96.3.807
- Van Egmond, A. A., Groen, J. J., & Jongkees, L. B. (1949). The mechanics of the semicircular canal. *J Physiol*, *110*(1-2), 1-17. doi: 10.1113/jphysiol.1949.sp004416
- Walby, A. P. (1985). Scala tympani measurement. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *94*(4 Pt 1), 393-397.
- Weisz, C., Glowatzki, E., & Fuchs, P. (2009). The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature*, *461*(7267), 1126-1129. doi: 10.1038/nature08487
- *Wilson, V. J. (1979). *Mammalian vestibular physiology / Victor J. Wilson and Geoffrey Melvill Jones*. New York: Plenum Press.
- Woods, C., Montcouquiol, M., & Kelley, M. W. (2004). Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci*, *7*(12), 1310-1318. doi: 10.1038/nn1349
- Wright, A. (1984). Dimensions of the cochlear stereocilia in man and the guinea pig. *Hear Res*, *13*(1), 89-98. doi: 10.1016/0378-5955(84)90099-6
- *Yang, T., Kersigo, J., Jahan, I., Pan, N., & Fritzsich, B. (2011). The molecular basis of making spiral ganglion neurons and connecting them to hair cells of the organ of Corti. *Hear Res*, *278*(1-2), 21-33. doi: 10.1016/j.heares.2011.03.002
- Zine, A., Van De Water, T. R., & de Ribaupierre, F. (2000). Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development*, *127*(15), 3373-3383. doi: 10.1242/dev.127.15.3373
- Zine, A., & de Ribaupierre, F. (2002). Notch/Notch ligands and Math1 expression patterns in the organ of Corti of wild-type and Hes1 and Hes5 mutant mice. *Hear Res*, *170*(1-2), 22-31. doi: 10.1016/s0378-5955(02)00449-5