

## Diploma thesis review

Author: Bc. Veronika Merc

Title: **Vliv NEUROD1 transkripční regulace na vývoj a funkci neuronů vnitřního ucha**

Opponent: Jan Mašek, Ph.D.

### Evaluation/Hodnocení:

<b>Evaluation criteria</b>	<b>Criteria description</b>	<b>Points (0-3)</b>
<b>1</b>	overall scope of the diploma thesis, balance and structure of its parts	<b>3</b>
<b>2</b>	quality of literary research (number of used original sources, appropriateness of selection)	<b>2</b>
<b>3</b>	aptness of research questions and goals according to thesis assignment and literature research background	<b>1</b>
<b>4</b>	logical sequence of experimental work	<b>2</b>
<b>5</b>	materials and methods	<b>2</b>
<b>6</b>	experimental complexity	<b>2</b>
<b>7</b>	quality of experimental data processing (statistics, sample sizes, exclusion of outliers, choice of statistical/mathematical models)	<b>3</b>
<b>8</b>	interpretation of obtained results	<b>2</b>
<b>9</b>	aptness of results evaluation and comparison in the context of the current workplace and	<b>2</b>
<b>10</b>	Czech and English abstract quality	<b>3</b>
<b>11</b>	graphic design of text, figures, and tables	<b>3</b>
<b>12</b>	language and stylistic level, usage of valid nomenclature	<b>3</b>
<b>13</b>	correctness and completeness of legends for figures and tables (comprehensibility without regard to other text, explanation of abbreviations, units)	<b>3</b>
<b>14</b>	correct use of citation references (presence of non-cited facts, uniformity of the citation style, use of official citation formats)	<b>2</b>
<b>Grade/Points</b>	<b>Sum:</b>	<b>33</b>
1 (42-37)	<b>Excellent/Výborně</b>	
1,5 (36-31)	<b>Very good/Velmi dobře</b>	✓
2 (30-25)	<b>Good/Dobře</b>	
2,5 (24-19)	<b>Satisfactory/Uspokojivě</b>	
3 (18-13)	<b>Acceptable/ Vyhovující</b>	
4 (12-0)	<b>Unacceptable/Nevyhovující</b>	

**Proposed grade/Navrhovaná známka: Very good/Velmi dobře**

### Evaluation summary/Slovní hodnocení:

Práce na téma vliv NEUROD1 transkripční regulace na vývoj a funkci neuronů vnitřního ucha si dává za cíl objasnit roli transkripčního faktoru NEUROD1 s ohledem na regulaci vývoje neuronů vnitřního ucha, jejich proliferaci, přežívání a inervaci a analyzovat změny v genové expresi vybraných genů. Práce samotná je členěna smysluplně a přehledně. Literární přehled pokrývá problematiku vyvoje a morfologie vnitřního ucha, se

zaměřením na myší model. Přehled je čtivý a doprovázejí ho bohaté, vhodně zvolené ilustrace vytvořené autorkou.

Je trochu nešťastné, že vzhledem k vybranému tématu je větší část úvodu věnována morfologii, a přitom se dozvíme jen minimum informací o mechanismu aktivity a genech přímo regulovaných transkripčním faktorem NeuroD1, přesto že je již takřka tři dekády studován i v jiných tkáních než je střední ucho (např. v časném vývoji telencephalonu – Pataskar et al., 2016) a dá se tak extrapolovat jeho možná funkce např. do problematiky indukce neuroblastů ve středním uchu. Tyto informace by člověk hledal zejména podkapitole 3.2.1-NEUROD1 transkripční regulace-, která obsahuje výčet fenotypů způsobených systemickou či kondicionální delecí genu *NeuroD1* během vývoje vnitřního ucha, potvrzujících jeho klíčovou roli “neurogenního” faktoru, avšak obsahuje naprosté minimum informací o transkripční regulaci chromatinu pomocí NEUROD1.

Načasování delece genu je klíčovým nástrojem vývojové biologie v myším modelu pro objasnění funkce studovaného genu, použitým cre-liniím je tak věnována patřičná pozornost, ale měli by být také řádně citovány. (Pax2-Cre - Ohyama and Groves 2004, Isl1-Cre - Yang L, et al. 2006). V laboratoři školitelky byla a je aktivně používána celá řada cre-linií a které zmiňujete ve vaší práci. K lepší charakterizaci cílů, opodstatnění metodiky a interpretaci výsledků Vaší práce by přispělo jejich shrnutí a srovnání v tabulce, tak aby bylo čtenáři zřejmé, proč (je-li) je k objasnění role NeuroD1 ve vývoji neuronů středního ucha potřeba gen deletovat pěti různými způsoby (včetně velmi nezvyklé delece *NeuroD1*, pomocí Cre řízené NeuroD1 promotorem – tato práce).

Meodická část a způsob prezentace výsledků jsou na skvělé úrovni, a ukazují že autorka zvládla práci s in vivo materiálem (izolace DNA, genotypizace, disekce a preparace drobných tkání, příprava preparátu pomocí Vibratomu, IHC barvení, mikroskopie i následná kvantifikace a statistická analýza).

Výsledky jsou patřičně diskutovány a dokreslují tak velmi hezkou práci, jejíž hlavní slabinou je použitý experimentální model resp. jeho opodstatnění.

### **Questions and comments/Doplňující otázky a komentáře:**

str. 14) Píšete že “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”, stojíte si za svým tvrzením i po přečtení článku od Freyer et al., 2011 - Dual embryonic origin of the mammalian otic vesicle forming the inner ear, nebo Hoijman et al., 2017 - Pioneer neurog1 expressing cells ingress into the otic epithelium and instruct neuronal specification?

str. 40) Komentář - Nedávná studie od Steevense a kol. 2021 ukazuje ze celotělní NeuroD1+/- mutanti mají menší a morfologicky hůře vyvinuté střední ucho, stojí za zvážení reanalyzovat použité Neurod1-Cre, Neurod1f/f kontroly vůči Neurod1-Cre, WT, případně WT, Neurod1f/f jedincům.

str. 41/42) Popisuje experimentální ověření delece NEUROD1 u kontrolních (Neurod1-Cre, Neurod1f/+) a mutantních Neurod1-Cre, Neurod1f/f embryích v E10,5. Mimo jiné zde zmiňujete, že exprese CRE proteinu přetrvává déle než exprese NEUROD1 proto: „, že protein CRE má pravděpodobně delší životnost a zůstává v neuronech déle než NEUROD1“. Nenapadá Vás i další zdůvodnění? Jaký se nabízí alternativní způsob delece, který by Vám umožnil lépe oddělit funkci NeuroD1 v různých stádiích vývoje vnitřního ucha?

str. 42/43) Je věnována kvantifikaci velikosti sensorických ganglií. “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.” Jakou tloušťku optického řezu jste pro kvantifikaci používala? Kvantifikovala jste i počet HOECHST+ jader/sensorické ganglium? Proč jste na definici sensorického gangliu nepoužila nějaký konkrétní marker neuronů, např. Tuj1 nebo Isl1.

str. 43) Měření apoptózy pomocí značení Kaspázy 3 patří mezi standartní postupy, ne všechny typy apoptózy však signalizují přes Kasp. 3. Napadá Vás i jiná, více obecná metoda, kterou lze k měření apoptózy použít?

str. 46) Variabilita defektů spirálního ganglia a uspořádání kochleární inervace ve věku E18,5 připomínají následky mozaikové delecce. Ověřovali jste přítomnost proteinů NEUROD1 a CRE i v pozdějších stádiích než E10.5?

str. 52/53) K části 6.7, kde popisujete výsledky z qPCR experiment mám několik otázek. Proč jste si pro analýzu vybrala právě toto stádium (E14.5)? Jak jste navrhovala qPCR primery, a jak jste ověřovala jejich specifitu? K výběru testovaných genů jste použila informace získané z (bulk?) RNAseq, z jaké tkáně a stádia byla generována tato data?

str. 60) V závěru práce píšete, že “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.” Jak jste, resp. jak by jste testovala přímou regulaci genu zkoumaným transkripčním faktorem?

Jan Mašek, Ph.D.

Praha 25.5. 2022