

Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomant: **Bc. Jan Štundl**

Téma práce: **Srovnání migrace a morfogeneze neurální lišty u evolučně důležitých zástupců paprskoploutvých ryb s cílem charakterizovat vývojové zdroje kraniofaciální diverzity**

V předložené diplomové práci je pomocí různých metod popsána migrace buněk hlavové neurální lišty (NL) u dvou zástupců paprskoploutvých ryb, u nichž nebyla hlavová NL dosud studována. Konkrétně se jedná o bichira senegalského a jesetera malého, které jsou zajímavé svým fylogenetickým postavením a morfologií.

Práce je uvedena fundovaným **Přehledem dosavadních poznatků**, v němž autor popisuje jednotlivé zárodečné listy, které se podílejí na utváření hlavy obratlovců. Zejména se zaměřuje na čtvrtý zárodečný list, tj. NL, kterou popisuje z hlediska historie, evoluce, jejího vzniku, migrace a diferenciaci. Jedna z kapitol je věnována omezeným literárním datům vztahujícím se k NL u paprskoploutvých ryb, které jsou díky obrovskému potenciálu modifikovat skeletální tkáň ideální skupinou pro studium kraniofaciální diverzity, na níž se NL podílí. V této kapitole autor rovněž formuluje cíle práce.

Následující kapitola se věnuje **Metodice**, která by dle mého soudu měla být zpracována detailněji a bez nepřesností, které možná pramení z neúplného pochopení principu některých metod. Viz jednotlivé připomínky v postscriptu.

V kapitole **Výsledky** autor popisuje a obrazově dokumentuje řadu experimentů (včetně neúspěšných), které použil při popisu migrace hlavové NL u bichira a jesetera. Bohužel pravděpodobně z technických důvodů nejsou kompletně dokumentována stejná stadia obou ryb, což by umožnilo přehlednější srovnání a posouzení heterochronií v migraci jednotlivých proudů NL.

Obrazovému materiálu **podkapitol 5.1.3. a 5.2.3** by výrazně prospělo použití některé metody, která značí buňky NL. Bylo by tak jednoznačně vidět, kde jsou a kde nejsou migrující buňky NL. Zejména z obrázků Tab. 11 nejsem schopná rozlišit, kde buňky NL emigrují a kde ne. Autor uvádí, že u jesetera st. 27 (Tab. 12) mají při daném barvení buňky NL odlišné zbarvení. Z přiložených obrázků to však není patrné.

Z dalšího textu je zřejmé, že se autor pokoušel tento problém různými metodami řešit, bohužel neúspěšně. V případě bichira jakožto nemodelového organismu nebylo užití známých protilátek značících buňky NL úspěšné, stejně tak značení pomocí DiI a CCFSE nejsou ideální. V metodické části autor popisuje elektroporaci, jejíž výsledky však v textu nejsou později uvedeny (formální nedostatek). Ukázala se i tato metoda jako nevhodná?

V **podkapitole 5.1.4.** se autor u bichira pomocí imunohistochemické vizualizace bazálních lamin prostřednictvím protilátky proti fibronektinu snažil ověřit výsledky histologické analýzy. Dle mého soudu však získané snímky nemají moc velkou výpovědní hodnotu. Signál je v řadě lokalizací příliš slabý, často nevhodně překrytý tečkovanou linií,

kteřá čtenáře nutí věřit, že pod ní pozitivita je, aniž by měl šanci to sám posoudit. Nezvažuje autor použití některé metody pro amplifikaci signálu, např. systém biotin-avidin?

V kapitole **Diskuze** autor diskutuje získané poznatky v kontextu známých literárních údajů a snaží se podat možné vysvětlení pro nalezenou heterochronii a heterotopii jednotlivých migračních proudů.

V **podkapitole 2.4.3.** diplomant popisuje tradiční představu vzniku NL na hranici mezi neurálním a epidermálním ektodermem vlivem indukčního působení zmíněných tkání a paraaxiálního mezodermu. Obdobně v diskuzi v **podkapitole 6.1.1.** píše, že ke vzniku NL dochází během formování neurální trubice. V práci autorů, jejichž jiné články diplomant cituje (Basch ML, Bronner-Fraser M, García-Castro MI.: *Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7*. Nature. 2006 May 11;441(7090):218-22.), se uvádí, že k indukci NL dochází již mnohem dříve, ještě než se specifikuje neurální ploténka, např. u kuřat již ve stadiu HH4+. Jaký je diplomantův názor na tento zprávek? Neodpovídala by tato teorie lépe některým heterochronickým odlišnostem v emigraci NL, např. u vačice?

V **podkapitole 6.1.1.** autor soudí, že je obecně výhodné, aby buňky NL „odmigrovaly“ co nejdříve a tedy v co nejranějším stadiu a zapojily se tak do morfogeneze těla ještě během neurulačních procesů. Toto tvrzení určitě platí u dále zmiňované vačice, lze ho ale zobecňovat na všechny obratlovce? Z jakého důvodu by byla výhodná časnější emigrace hlavové NL u savců (před uzavřením neurální trubice) než u ptáků (po uzavření neurální trubice).

Logika výhodnosti časnější emigrace je dále asi opodstatněně diskutována u emigrace hyoidního proudu, která u bichira předchází emigraci trigeminálního proudu. Hyoidní proud se podílí na stavbě vnějších žaber a autor tedy očekává silný ekologický tlak na jejich časný vývoj. Tento ekologický tlak by zapříčinil zmíněnou heterochronii. Trigeminální proud představuje zdroj buněk pro V. hlavový nerv inervující cementový orgán, který je rovněž nezbytný pro přežití embrya. Dalo by se na základě této logiky konstatovat, že vnější žábry jsou pro přežití embrya důležitější než cementový orgán, a proto emigruje NL hyoidního proudu raněji?

V **kapitole 6.1.3.** autor píše, že brachiální proud u bichira i jesetera začíná emigrovat až jako poslední. Dle mého názoru je tato skutečnost dobře patrná pouze z dokumentace předložené u bichira (byť spíše na obrázcích Tab. 2 než na obrázcích Tab. 4 I a Tab. 5 G, které pouze ukazují emigraci brachiálního proudu bez náznaku časové posloupnosti). V případě jesetera autor odkazuje na obrázky Tab. 13 B-C získané po aplikaci DiI barviva. Mohl by tedy přiblížit, na základě čeho soudí, že emigrace buněk hyoidního proudu předchází emigraci buněk proudu brachiálního? Ve výsledkové části bohužel chybí vysvětlení výsledku tohoto experimentu, které se omezuje na konstatování, že získaný signál odpovídá výsledkům extripačních experimentů dokumentovaných v Tab. 10 E, F. Na obou obrázcích jsou však již dobře patrné oba proudy, určit časovou posloupnost jejich emigrace není dle mého soudu možné.

V **Závěru** autor adekvátně shrnuje předložená data. Na základě tohoto shrnutí je možné si představit, o čem práce pojednává. Nakonec autor navrhuje možnosti dalšího rozšíření práce.

Citace v textu jsou vedeny jednotně a dle standardů, **Seznam literatury** je dostatečný a rovněž jednotný.

Celkové hodnocení

Předložená diplomová práce přináší nové zajímavé výsledky, které dává do kontextu s dříve publikovanými fakty. Její rozsah je přiměřený, nicméně pro publikaci by bylo vhodné dodat některá další data, o jejichž získání diplomant v průběhu experimentální části usiloval, byť neúspěšně. Tento neúspěch byl nicméně zapříčiněn použitím nemodelových organismů a jejich morfologií. Práce má logickou strukturu a stylisticky je na poměrně dobré úrovni. Výtka by směřovala k poměrně častým překlepům a použití některých hovorových či dle mého názoru stylisticky nevhodných výrazů, viz postskriptum.

Z předložené diplomové práce vyplývá, že diplomant během experimentální práce ovládl velké množství metod používaných v dané problematice. Některé z metod však nemá dokonale teoreticky zvládnuté, viz nepřesnosti uvedené v postskriptu. Je rovněž zřejmé, že experimentální části věnoval značné úsilí. V teoretické části a v diskuzi diplomant prokázal orientaci v problematice a schopnost vyhodnotit a diskutovat získané výsledky.

I přes pár nedostatků práce rozhodně splňuje kritéria diplomové práce a vřele ji doporučuji k obhajobě. V případě přesvědčivé obhajoby navrhuji známku VÝBORNĚ.

V Praze dne 9.9.2013

Ing. Eliška Krejčí, Ph.D.

Anatomický ústav 1.Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

Postscriptum

Zde uvádím pro úplnost formální nedostatky, nepřesnosti či chyby, u nichž nepovažuji za důležité, aby se řešily během obhajoby.

- V první řadě bych chtěla zmínit, že práce obsahuje poměrně velké množství překlepů, které jí ubírají na kvalitě.
- U anglického výrazu „pattern“ bych doporučovala volit vhodnější překlad, např. vzorec, profil spíše než patrnost, což má jiný význam.
- Rovněž bych doporučila eliminovat hovorové nebo stylisticky nevhodné výrazy jako „vymapovat“, „vymigrovat“, či vyjevit.
- **Kapitola 2.4.3.** Na straně 13 autor píše, že ke vzniku NL dochází u většiny organismů po uzavření neurální trubice... Autor zde spíše myslí epitel-mezenchymovou transici než vznik NL.
- **Kapitola 2.4.4.** Ventromediálně migrující buňky trupové NL tvoří kromě Schwannových buněk a sensorických ganglií zejména též ganglia sympatická, parasympatická a enterická, chromafinní buňky a Merkelovy buňky.
- .
- **Kapitola 2.4.4.** Autor na straně 16 píše, že buňky NL sdílejí s rakovinnými buňkami stejnou expresi genů. Myslím tím zřejmě spíše fakt, že sdílejí expresi některých genů.
- **Kapitola 2.5.** V textu je uveden odkaz na obr. 5, který však není nikde k nalezení.
- **Kapitola 3.1.** Autor zmiňuje speciální odchovávací aparaturu, která byla vymyšlena a sestrojena jím a kolegy. Přiložen je obrázek aparatury, ale chybí její popis.
- **Kapitola 3.5.1.** Autor píše, že pro perforaci embryí před imunohistochemickým barvením používá 10% Triton X-100. Skutečně používá pro permeabilizaci tak koncentrovaný roztok? Myslím též, že BSA se v preinkubaci používá spíše pro zabránění vzniku nespecifických vazeb protilátky než pro její lepší navázání. Chybí specifikace protilátky proti HNK-1 (neboli když nevíme, o jakou protilátku se jedná, nemá uvedení pracovní koncentrace význam).
- **Kapitola 3.9.** Autor popisuje *in situ* hybridizaci v celých embryích. Uvádí, že používá proteinázu K v koncentraci 1:1000, nicméně není uvedeno, zda se jedná o hmotnostní poměr, či z jaké výchozí koncentrace proteinu vycházel. Proteináza se nepoužívá kvůli degradaci RNA vazebných proteinů jako spíš pro degradaci RNáz, byť i ostatní RNA vazebné proteiny stejně jakož i další proteiny jsou tímto krokem degradovány. Významným důvodem pro její použití je ale částečné natrávení embryonální tkáně, které umožní lepší průnik sondy a protilátky do hlubších vrstev.

V této sekci by se též hodila specifikace hybridizačního, posthybridizačního a blokovacího roztoku, jakož i specifikace sondy. Předpokládám, že genom bichira dosud nebyl osekvenován, proti jaké sekvenci genu *dlx3* tedy byla sonda připravena?
- V úvodním odstavci textu **kapitoly 5.1.6.** autor píše, že *in situ* hybridizace funguje na základě komplementarity sondy s navázanou protilátkou a sekvencí genu. Sondy používané v *in situ* hybridizaci však nemívají navázanou protilátku, ale jsou značeny

buď digoxigeninem či biotinem, které jsou v druhém kroku rozpoznány specifickou protilátkou. V souladu s výše uvedeným uvádí autor posthybridizační inkubaci s protilátkou v metodice.

- V **podkapitole 5.1.6.** autor popisuje úspěšnou *in situ* hybridizaci v celých embryích se sondou proti genu *dlx3* exprimovanému v migrujících buňkách NL. Neuvažuje autor použití této metody v řezech, což by spíše umožnilo pochopení detailů migrace NL na buněčné úrovni, které si klade za cíl?
- V případě jesetera se v **podkapitole 5.2.4.** ukázalo, že je možné použít značení NL, resp. hlavových nervů (které však jsou derivátem NL) pomocí protilátky proti HNK-1. Tuto protilátku je možné použít pro značení i na parafínových řezech. Neuvažuje autor použití této techniky, když získání mražených řezů či řezů z vibratomu není technicky možné?
- **Tab. 3** U stadia 20 chybí doplnění o obrázek embrya získaného pomocí SEM s vyznačením místa řezu. Tyto obrázky jsou doplněny u všech ostatních stadií.
- **Tab. 3, 6** Nesouhlasí označení 1. somitu se seznamem zkratk (s0 namísto s1).
- **Tab. 11** Obrázky jsou o 90° otočeny ve srovnání s obrázky ve všech odpovídajících tabulkách.
- **Tab. 5 H, H'** V popisku i textu kapitoly se píše o trupové NL, k jejímu vyznačení je však použita zelená šipka, která značí (dle popisu obrázku) hlavovou NL.
- **Podkapitola 6.1.1.** nese název Vznik hlavové NL u bichira a jesetera, tématu vzniku NL se však diplomová práce nevěnuje a celá kapitola pojednává spíše o emigraci NL u různých živočišných druhů. V této podkapitole je dva krát téměř shodně uvedeno, že paprskoploutvé ryby prodělávají odlišný typ neurulace než ostatní obratlovci, a je tedy poměrně obtížné provádět přímá srovnání emigrace hlavové NL. V předchozím textu se nicméně uvádí, že dva zkoumané druhy mají na rozdíl od ostatních paprskoploutvých ryb odlišný typ neurulace, tj. primární neurulaci, tj. stejný typ jako ostatní obratlovci. Vzhledem k tomu, že autor hodnotí migrační vzorce svých modelů ve srovnání s „klasickým“ modelem, nedávají tato tvrzení v kontextu smysl. V této podkapitole též autor mimo jiné píše, že ke své indukci buňky NL nepotřebují splnutí neurálních valů, což je myslím obecně známý fakt, viz jedna z výše uvedených poznámek.