

POSUDEK OPONENTA HABILITAČNÍ PRÁCE

Masarykova univerzita

Uchazeč

Mgr. Jan Křivánek, Ph.D.

Habilitační práce

Kontinuálně rostoucí řezáky a morfogeneze zubu

Oponent

Doc, RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.

Pracoviště oponenta,
instituce

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, katedra
buněčné biologie, Viničná 7, 128 00, Praha 2

Habilitační práce Dr. Jana Křivánka, "Kontinuálně rostoucí řezáky a morfogeneze zubu je sepsána na 54 stránkách a je standardně členěna. Práce je postavena na 7 publikacích (pět originálních vědeckých spisů, jedna kapitola v monografii a jeden přehledový článek). Dr. Křivánek si jako model pro své studium zvolil kontinuálně rostoucí řezáky myši, kterým mají po většinu života jedince zachovány aktivní zásobu epiteliálních i ekto-mesenchymálních kmenových buněk a mohou tak fungovat jako inspirace pro možnosti in vivo či in vitro regenerace brachyodontních zubů člověka.

Detailní charakteristika kmenových buněk a jejich diferenciačních derivátů z obou zmíněných vývojových větví se stala hlavním cílem první publikace, která je součástí předložené habilitační práce. Dr. Křivánek k tomuto účelu použil metodu single cell RNA sequencing (scRNA-seq.), která dokáže na základě genové exprese identifikovat velmi vzácné populace buněk ve zkoumané tkáni. Výsledkem rozsáhlé analýzy bylo přesnější určení a lokalizace zubních mesenchymálních kmenových buněk s expresí specifického markeru Foxd1. Dále pak byly identifikovány malé skupiny buněk s mechanosensorickými vlastnostmi a z původně uniformní epitelové vrstvy stratum intermedium, byla vyčleněna vrstva „Cuboidal layer“. Její buňky specificky exprimují gen Ryr2 a představují nový podtyp ameloblastů.

Druhá publikace se zabývá vývojem zubu u vybraných skupin plazů. Důraz byl kladen na mechanismy vedoucí k morfogenezi zubu na základě vzniku a distribuce tzv. sklovinných uzlů. Důležitým zjištěním byla identifikace stejných signálních drah (Fgf4 a Shh) jako u savců, které jsou za morfogenezi zodpovědné.

Třetí práce představuje kapitolu v Buněčném atlase „Visual biology in oral medicine“ Zde jsou popsány populace kmenových buněk a interakce jejich diferenciačních produktů, které jsou důležité pro formování jak epiteliální, tak mezenchymální části vyvíjejícího se zubu. Vzhledem k tomu, že se jedná o učební pomůcku podstatnou součástí atlasu je bohatá obrazová dokumentace.

Čtvrtá publikace je přehledový článek, který popisuje jednotlivé buněčné populace podílející se na formování zubu včetně vzniku jednotlivých zubních oddílů a participace imunitního systému a cévního zásobení. Důležitou součástí článku je porovnání vývoje brachyodontního zubu, např. u člověka a kontinuálně rostoucího hypselodontního řezáku myši.

Pátá publikace je metodická a představuje přípravu transgenní myši exprimující modrý fluorescenční protein pod promotorovou oblastí genu Dspp a červený fluorescenční protein (Cherry) v tkáních s aktivní expresí genu Dmp1. Kombinace těchto dvou markerů a s tím

spojená exprese obou fluorescenčních proteinů je schopná vizualizovat funkční odontoblasty in vivo.

Transgenní myši připravené v rámci předchozí práce byly využity pro studium vlivu epiteliální části vyvíjejícího se zuby na formování mesenchymálních struktur. Výsledky této šesté publikace potvrdily důležitost korunkové části zubního epitelu (budoucí ameloblasty) a kořenové části (HERS) na formování dentinu v těchto dvou funkčních oblastech.

Poslední publikace je metodická a zavádí postup pro izolaci jednotlivých buněk z tkáně vyvíjejícího se zuby pro následnou scRNA-seq analýzu.

Vlastní habilitační práce je psaná jasně a srozumitelně. Úvodní kapitoly jsou věnovány morfogenezi zubních tkání vzniku skloviny, dentinu a kořene. Autor pak dále porovnává brachyodontní zuby člověka s kontinuálně rostoucími zuby myších řezáků. Další kapitoly jsou věnovány kmenovým buňkám a kmenové niche jak v rámci epiteliální, tak mesenchymální části zuby. Závěr teoretické části je věnovaný klíčové metodě scRNA-seq. díky níž došlo k identifikaci nových buněčných typů důležitých pro vznik a regeneraci zubních struktur. Součástí habilitační práce je sedm příložených publikací včetně stručných komentářů.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

- 1) Na str.35 autor popisuje gen Acta2 jako marker kmenových buněk. Gen Acta2 kóduje alfa 2 aktin u buněk hladké svaloviny. V naší laboratoři jsme jeho expresi potvrdili u progenitorů Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk, které vykazují kontraktilní funkci. Jaký je vztah mezi expresí svalového aktinu a kmenovostí u vámi studovaných buněk?
- 2) Při vývoji zuby hrají důležitou roli i buňky imunitního systému, makrofágy. V první příložené publikaci autor dokládá identifikaci tří populací těchto buněk. Jak vypadá jejich dynamika v rámci růstu zuby? Lze přiřadit dvě populace k prozánětlivým makrofágům M1 a proregenerativním M2? Existuje ekvivalent třetí populace charakteristické expresí LYVE1+ v jiných orgánech?
- 3) Základní signální dráhy při vývoji zuby zahrnují FGF, BMP Wnt a SHH. Ektodermální epitel a ektomezenchym pocházející z buněk neurální lišty evokují apikální ektodermální rýhu (AER) a mezenchymální progresivní zónu (PZ). Existuje mezi výše popsanými zubními strukturami podobná zpětnovazebná interakce jako mezi AER a PZ? (FGF10 – FGF8). Lze při vývoji zuby nalézt Turingův model reakce a difúze, podobně jako při vývoji či regeneraci končetin?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Jana Křivánka, Ph.D., „Kontinuálně rostoucí řezáky a morfogeneze zuby“, **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Anatomie, histologie a embryologie.

V Praze
Dne 3.12.2022

.....
/.....
podpis