



V Praze, 4.4.2020

Oponentský posudek disertační práce MUDr. Jakuba Žiaka na téma Úloha CRMP2 ve vývoji nervového systému

Cíle disertační práce, výsledky a aktuálnost zvoleného tématu

Ve své práci se MUDr. Žiak zaměřuje na detailní studium úlohy CRMP2 a semaforinové signální kaskády ve vývoji mozku, růstu axonů a v synaptickém pruningu. Jedná se o velmi aktuální a moderní téma, neboť proces vývoje mozku a neuronální konektivity doposud není plně objasněný a poznatky o specifické úloze CRMP2 signalizace v těchto procesech jsou poměrně limitované.

V úvodu práce se autor věnuje popisu mechanizmů vývoje mozku v embryonálním stadium. Detailně seznamuje čtenáře s buněčnými mechanizmy vzniku mozkové kůry a věnuje se popisu buněčné proliferace, migrace a diferenciace jednotlivých buněčných typů neuronů, tj. hlavních neuronů a interneuronů. Dále se zaměřuje na popis molekulárně biologických mechanizmů a genů, které embryonální vývoj nervového systému řídí, či regulují. V následující části se soustředí na úlohu signálních kaskád, které ovlivňují růst/navádění axonů. Závěrečnou část úvodu věnuje detailnímu popisu a přehledu prací o významu CRMP2 rodiny a jednotlivých podtypů CRMP proteinů v regulaci vývoje mozku a růstu axonů. Úvod je napsaný velmi čitavě a přehledně. Umožňuje čtenáři seznámit se s aktuálními poznatkami o buněčných a molekulárních mechanizmech embryonální ontogeneze mozku.

Následuje popis hypotéz a cílů disertační práce a popis metodik, které autor použil ve svých experimentech a které zahrnují velkou škálu sofistikovaných experimentálních technik. Jedná se o molekulárně-biologické metody, metody pracující s transgenními zvířaty a celá řada pokročilých morfologických technik značení a analýzy. V rámci svého výzkumu autor využívá jak *in vitro* techniky, tak i verifikaci poznatků v *in vivo* experimentech. Tento přístup významně zvyšuje relevanci získaných výsledků. Velmi oceňuji, že široké portfolio experimentálních technik je používáno velmi systematicky a racionálně za účelem rozklíčování komplexní funkce CRMP2 a jeho izoforem a jejich vzájemných interakcí se signálními kaskádami. Výsledky jsou vždy zpracovány vhodnými statistickými metodami.

Výsledky jsou členěny do pěti základních oddílů dle stanovených základních hypotéz. V první části autor hodnotí úlohu CRMP2 ve vývoji mozku a axonů v knockoutním modelu *crmp2-/-*, ve kterém je blokována exprese CRMP2. Tento postup efektivně umožnuje hodnotit vliv CRMP2 proteinu na vývoj mozku. Hlavním poznatkem je, že tento protein nehraje zásadní úlohu v neuronální migraci a formaci správné anatomické organizace mozkové kůry. Absence toho proteinu však narušuje vývoj a růst axonů. Výsledky prokázaly, že absence CRMP2 má za následek zvýšený růst axonů a zvýšené větvení v hlavových nervech. Autor také pozoroval axonální abnormality v corpus callosum, které bylo hypoplasticke. Větvení kalosálních axonů, resp. jejich zakončení v kontralaterální kůře mělo větší rozptyl a neusporeádanost v porovnání s kontrolami. Zajímavým pozorováním bylo, že tato morfologická změna byla přítomna v časném postnatálním období, zatímco axonální morfologie v dospělosti se nelišila od kontrol. Řada těchto procesů pravděpodobně souvisí s abnormalitou v semaforinové signální kaskádě, která nefunguje v důsledku absence CRMP2. Analogický typ strukturální abnormality byl pozorován i v dalších kličkové komisurální dráze-commisura anterior.

Ve druhé části experimentální práce MUDr. Žiak studoval vliv CRMP2 na pruning synapsí a axonů ve specifických neuronálních dráhách. Výsledky prokázaly poruchu pruningu především v kortiko-spinální dráze vycházející ze zrakové kůry a v hipokampálním infrapyramidálním svazku, který vlivem pruningu za normálních okolností zaniká a není přítomen v dospělém hipokampusu. Tyto perzistující dráhy vytváří zralé synapse a pokusy *in vitro* v neuronálních kulturách prokázaly, že tyto morfologické defekty jsou důsledkem interakce Sema3F a CRMP2. Kromě vlivu CRMP2 na axony autor studoval také vliv CRMP2 na dendritický vývoj a morfogenezi dendritů granulárních buněk gyrus dentatus. V případě *crmp2*-/- zvířat dendrity granulárních buněk vykazovaly zvýšený počet dendritických trnů, který, jak se dalšími experimenty prokázalo, je důsledkem absence CRMP2 a narušení procesu pruningu trnů.

V další části se autor zaměřil na studium úlohy CRMP2A izoformy na růst/navádění axonů a na proces pruningu. Pro tuto izoformu je specifické, že je přítomna pouze v průběhu vývoje mozku a v časném postnatálním období. Za tímto účelem autor využil *crmp2a*-/- kmen myši vyvinutý v laboratoři školitele. V případě absence izoformy, autor pozoroval podobné morfologické defekty jako v případě absence CRMP2. S pomocí metody *in utero* elektroporace CRMP2A a CRMP2B genu byl autor schopný prokázat úlohu jednotlivých izoforem na vývoj a růst axonů corpus callosum. Morfologická analýza dendritického stromu granulárních buněk prokázala stejnou strukturální abnormitu v počtu dendritických trnů jako v případě *crmp2*-/. V poslední části se autor zaměřil na úlohu Pin1 izomerázy v regulaci CRMP2A a růstu axonů. Předchozí práce a současná práce autora prokázaly, že Pin1 se váže na CRMP2A a že společně hrají významnou úlohu v pruningu mechových vláken.

Práce je zakončena diskusí, ve které MUDr. Žiak kriticky hodnotí výsledky své práce v kontextu existujících poznatků a současné literatury.

Shrnutí disertační práce a její přínos pro další rozvoj vědy

Ve své disertační práci MUDr. Jakub Žiak přináší nové poznatky o úloze CRMP2 a jeho izoformy CRMP2A ve vývoji mozku. Systematickým výzkumem prokázal, že CRMP2 a studovaná izoforma hrají úlohu v navigaci růstu axonů a že se podílí na vývoji mozkových komisur, především corpus callosum. Na úrovni dendritů tyto proteiny hrají významnou úlohu v pruningu dendritických trnů. Výsledky dále prokázaly, že CRMP2 hraje význam nejen v Sema3A signální kaskádě, ale také v Sema3F signalizaci. Výsledky mají zásadní dopad nejen na pochopení mechanizmů vývoje mozku, ale také mohou přispět k pochopení patogeneze vybraných neuropsychiatrických onemocnění, především poruch autistického spektra, či schizofrenie. Předložená disertační práce je velmi kvalitní a vykazuje všechny předpoklady pro úspěšné splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce. Prezentované výsledky byly navíc publikovány v prestižních mezinárodních časopisech s impaktovým faktorem, kde figuruje MUDr. Žiak jako hlavní autor, či spoluautor. Práce svědčí o širokém rozhledu autora v dané problematice a znalosti celého spektra experimentálních technik.

Připomínky k formální stránce práce

Disertační práce splňuje veškeré formální aspekty. Obsahuje celkem 103 stran. Práce je napsána velmi čitavě a odborně v anglickém jazyce s minimem překlepů a gramatických chyb. Text je doplněn velmi kvalitními obrázky a schématy. Množství použitých citací svědčí o důsledné práci autora s odbornou literaturou. Práce obsahuje seznam použité literatury, seznam zkratek a dvě vlastní publikace autora. K formální stránce bych měl jednu připominku. V diskusi autor popisuje behaviorálních změny u *crmp2*-/- zvířat, které by spíše měly být ve výsledcích.

Témata pro diskusi při obhajobě disertační práce

1. Inagi et al (2001) prokázali, že zvýšená exprese CRMP2 indukuje růst axonů. Práce autora prokazuje, že absence genu pro CRMP2 v transgenním kmeni myší *crmp2-/-* je spojena se zvýšeným růstem axonů a jejich větvení. Jak si tuto diskrepanci autor vysvětluje?
2. Jakým způsobem autor vysvětluje vymízení abnormálního větvení kalosálních axonů u *crmp2-/-* zvířete v dospělosti?
3. Existují geneticky podmíněná onemocnění, která jsou spojená s mutací v CRMP2, či semaforinové signální kaskádě?
4. Jaké mohou být funkční dopady perzistence infrapyramidální dráhy na funkci hipokampu a hipokampálních okruhů? Jaký vliv má zvýšený počet dendritických trnů na funkci granulární buněk a gyrus dentatus? Mají knockoutní zvířata specifický behaviorální fenotyp, či kognitivní dysfunkci, která by svědčila pro poruchu funkce hipokampu?
5. Hodnotil autor kromě počtu dendritických trnů také jejich tvar, či další parametry?
6. Jaká je úloha CRMP2 v dospělém mozku a v regeneraci axonů, či v plasticitě mozku?

Závěr

Na základě rozboru disertační práce, její vědecké úrovně, původnosti a řešení konstatuji, že MUDr. Jakub Žiak prokázal vysoké tvůrčí vědecké schopnosti a předložená práce splňuje požadavky kladené na práce tohoto typu ve smyslu §47 VŠ zákona 111/98 Sb. Navrhoji komisi pro obhajoby kandidátských disertací, aby předloženou práci posoudila kladně a uchazeče udělila titul „Ph.D.“.

prof. MUDr. Přemysl Jiruška, Ph.D.