

## Oponentský posudek na disertační práci Lucie Kučerové „Adenosine signaling in *Drosophila*“.

Mgr. Lucie Kučerová předkládá anglicky psanou disertační práci, jejímž tématem je signalisace přes receptor pro adenosin (DmAdoR) a působení extracelulárního adenosinu na buňky *Drosophila melanogaster*. Disertace je sestavena jako soubor dvou publikovaných článků opatřený úvodem a souhrnem výsledků. Mgr. Kučerová je první autorkou jednoho z článků. Hlavními výsledky, které tyto práce přinášejí, jsou i. stimulace cAMP signalisací přes DmAdoR, ii. identifikace agonistů a antagonistů DmAdoR mezi analogy adenosinu, iii. letální vliv ektopické exprese DmAdoR *in vivo* a jeho reverse antagonisty, iv. toxický vliv zvýšené extracelulární koncentrace adenosinu *in vitro*, a v. reverse toxicity zablokováním koncentrativních a ekvilibrativních nukleosidových transportérů DmCnt1,2 a DmEnt2. Uvedené výsledky poprvé dávají do souvislosti signalisaci přes AdoR a transport adenosinu a byly usnadněny využitím modelu *D. melanogaster*, který je méně redundantní a experimentálně přístupnější než systém AdoR v savčích buňkách. Výsledky rovněž naznačují propojení signalisace adenosinem s energetickým metabolismem buňky. V tomto smyslu budou výsledky jistě zásadní inspirací pro výzkum analogických procesů v normálních a patologických buňkách lidských. Autorka velmi dobře využila pobytu v laboratoři doc. Žurovce, kde jsou otázky AdoR a fyziologického působení adenosinu dlouhodobě studovány a kde existuje fenomenální modelové a metodické zázemí.

V teoretické části je podán logický byť poněkud minimalistický úvod do problematiky. Shrnutí a diskutován je současný stav znalostí o AdoR a signalisaci adenosinem, o transportu, metabolismu a recyklaci adenosinu v buňce. Experimentální část nahrazují reprinty dvou publikovaných prací spolu se suplementárními daty. Dosažené výsledky jsou shrnuty v jednostránkovém závěru.

Výsledky, o které se disertace opírá, byly publikovány a prošly odbornou recensí, přesto připomínám, že mi jak v úvodu tak ve výsledcích chybí explicitní údaje o intra- a extracelulárních koncentracích adenosinu naměřených v normálních a patologicky změněných buňkách. Je zmíněna pouze 20 – 200 nM koncentrace “in cells and tissue fluids“ a  $\mu\text{M}$  koncentrace při stresu. V tomto srovnání mi připadá koncentrace 100  $\mu\text{M}$  používaná při pokusech *in vitro* velmi vysoká.

Druhá moje připomínka se týká formální stránky disertační práce. Zkrácená disertace, tj. soubor publikovaných prací opatřený souhrnným komentářem dosavadních znalostí a souhrnnou diskusí, by měla být vyhrazena pro disertanty s bohatším seznamem publikovaných článků. Souhrnná diskuse v předložené disertaci úplně chybí, což je škoda, protože diskuse v člancích musí být velmi topikální a většinou neumožňuje poukaz na širší souvislosti. Jinak je úvod napsán



## Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

přehledně, úroveň angličtiny je velmi dobrá, našel jsem jen minimum nevýznamných chyb nebo citačních nepřesností.

Při celkovém pohledu považuji předloženou disertaci za solidní příspěvek ke kontinuálnímu proudu výsledků z renomované laboratoře doc. Žurovce na Entomologickém ústavu AVČR. Závěrem konstatuji, že Mgr. Lucie Kučerová předloženou disertační prací prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat, pomocí náročných metodik získávat nové vědecké poznatky a uplatnit je v mezinárodních časopisech. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 22.3. 2013

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.



## Oponentský posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Lucie Kučerové nazvanou Adenosine signaling in *Drosophila*

Předkládaná disertační práce Mgr. Kučerové zabývající se studiem adenosinové signalizace u drosofilu byla vypracována na základě výsledků práce získaných v průběhu jejího doktorandského studia na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích. Jedná se o krátkou formu disertační práce, jejíž experimentální výsledky byly publikovány ve dvou prestižních mezinárodních časopisech s vysokým impakt faktorem (Journal of Neurochemistry - IF 4.061 a Insect Biochemistry and Molecular Biology - IF 3.246) a kopie příslušných článků jsou součástí této disertační práce. Mgr. Kučerová je první autorkou u jedné z těchto dvou publikací a na vzniku druhé se významným způsobem podílela.

Adenosin je endogenní nukleosid, který funguje nejen jako důležitý homeostatický regulátor, ale klíčovou roli má také v buněčné signalizaci, a to zejména v modulaci nervové aktivity (působí však i na mnoho jiných typů buněk). Téma předložené disertační práce zaměřené na studium adenosinových receptorů a příslušných buněčných signálních systémů je tedy zajímavé z hlediska možnosti lepšího pochopení základních principů této signalizace na molekulární úrovni, ale je důležité i pro potenciální využitelnost poznatků z této oblasti pro farmakoterapeutické účely.

Úvodem je třeba ocenit, že autorka napsala svoji disertační práci anglicky, což není dosud zcela obvyklé. I když je v textu možno nalézt některé drobnější jazykové nedostatky, celkově je práce napsána velmi dobrou angličtinou. Po formální stránce je předložená disertační práce uspořádána přehledným způsobem – hlavní kapitoly tvoří především úvodní teoretická část, výsledková část a závěry. Stručný teoretický úvod (celkem 12 stran textu včetně seznamu citací), který je doplněn třemi vhodnými ilustrativními obrázky/schematy, poskytuje základní přehled aktuálních informací týkajících se adenosinu a jeho metabolismu a transportu v buňkách, adenosinových receptorů a adenosinové signalizace, včetně popisu této signalizace u drosofilu. Výsledkovou část práce tvoří pouze kompletní kopie dvou publikovaných článků, a to bez jakéhokoliv dalšího komentáře. V následující závěrečné části jsou pak na jedné stránce shrnuty veškeré klíčové výsledky této práce.

V předložené práci není uvedena žádná kapitola zaměřená na metodické přístupy, včetně výčtu a popisu použitých technik. Autorka to zřejmě nepovažovala za důležité, neboť použité metody jsou většinou popsány v příložených originálních publikacích. Tento popis však není vždy zcela detailní a doplnění určitých technických informací v textu vlastní disertační práce by jistě přispělo ke zvýšení jejího praktického významu. Výsledky práce prošly před jejich publikací v odborných časopisech přísným recenzním řízením, což samo o sobě zaručuje jejich vysokou kvalitu. Získané výsledky byly diskutovány v originálních publikovaných článcích, přesto bych považoval za užitečné věnovat určitý prostor jejich souhrnnému rozboru i v rámci disertační práce. Tomu obvykle bývá věnována kapitola „Diskuse“, která však v předložené disertační práci není a výsledky jsou pouze stručně shrnuty v závěrečné části disertační práce.

Celkově lze konstatovat, že předložená práce splnila vytčené cíle a přináší některé zajímavé nové informace týkající se vlastností adenosinových receptorů (AdoR) a adenosinové signalizace v intenzivně zkoumaném modelovém organismu *D. melanogaster*. Autorka zjistila, že v buňkách drosofilu vede aktivace AdoR k produkci cAMP jakožto hlavního sekundárního posla. Mezi významné výsledky patří také charakterizace několika agonistů a antagonistů AdoR, přičemž



se ukázalo, že analogy adenosinu jsou metabolicky stabilnější než samotný adenosin. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění, že negativní vliv zvýšené extracelulární koncentrace adenosinu na buněčnou morfologii, polaritu mitochondrií, proliferaci a životaschopnost buněk Cl.8+ s nízkou expresí AdoR je výsledkem nadměrného příjmu adenosinu pomocí specifických membránových transportérů, který vede k akumulaci ATP v této buněčné linii a s tím související energetické nerovnováze. Současně bylo pozorováno, že u jiné buněčné linie (Mbn2) odvozené z drosofil, která využívá jako preferenční krok při metabolickém zpracování adenosinu jeho deaminaci, se negativní vliv adenosinu na růst a přežívání buněk neprojevuje. Je tedy zřejmé, že v závislosti na buněčném typu se mohou na konverzi adenosinu podílet různé biochemické pochody a buňky s nedostatečnými zpětnovazebnými mechanismy mohou mít v některých případech vážný problém se zajištěním potřebné energetické homeostázy. Výsledky tohoto výzkumu mohou mít velký význam mj. v kontextu současných poznatků, které poukazují na energetickou nerovnováhu buněk u různých typů zhoubného bujení.

Závěrem lze shrnout, že předložená práce má vysokou odbornou úroveň a po formální i obsahové stránce splňuje požadavky kladené na doktorandskou disertační práci. Autorka vypracováním této své práce prokázala široký teoretický přehled i odpovídající technické dovednosti v dané oblasti výzkumu. Je zřejmé, že během své práce získala praktické zkušenosti s aplikací moderních molekulárně-biologických, biochemických a různých dalších metod v biologicky orientovaném základním výzkumu. Na základě toho doporučuji, aby Mgr. Kučerové byl po úspěšném obhájení její disertační práce udělen titul PhD.

V Praze 28.2.2013



RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Katedra fyziologie

Přírodovědecká fakulta UK v Praze

#### Otázky do diskuse:

1. V publikaci Kucerova et al., 2012 (J. Neurochem.121:383-395) jsou na obr. 6 prezentovány výsledky experimentu zaměřeného na sledování vlivu vybraných antagonistů AdoR na akumulaci cAMP v Bg2-c2 buňkách. Graf 6b ukazuje koncentrační závislost účinku antagonistů na akumulaci cAMP, přičemž se zásadně odlišuje vliv kofeinu a teofylinu (žádná inhibice, popř. vzestup akumulace cAMP) od ZM 241385 a SCH 58261 (inhibice). Měření akumulace cAMP v buňkách bylo provedeno po preinkubaci s uvedenými antagonisty a následném přidání adenosinu. Byla měřena také odpověď (akumulace cAMP) v přítomnosti antagonistů bez přidání adenosinu? Pokud ano, jak vypadala koncentrační závislost v takovém případě? Nemohly by být látky ZM 241385 a SCH 58261 považovány spíše za inverzní agonisty než antagonisty AdoR?
2. V jednom ze závěrů práce autorka uvádí, že kombinací bioinformatických a farmakologických přístupů byly získány nové pohledy na roli specifických aminokyselinových zbytků v DmAdoR. Bylo by možné tuto roli blíže popsat?



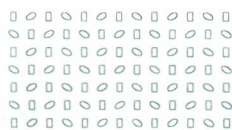


## Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Lucie Kučerové „Adenosine signaling in *Drosophila*“

Předložená dizertační práce zpracovává problematiku signálních drah využívajících adenosin (tj. transport adenosinu a vazbu na adenosinový receptor) na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*. Náplní práce jsou zejména testy adenosinu na několika buněčných liniích *Drosophily* v podmínkách *in vitro* následované dle možností také experimenty *in vivo*. Použitím mutace v adenosinovém receptoru byli testováni agonisté a antagonisté adenosinu, na různě citlivých buněčných liniích byla studována také odpověď na extracelulární adenosin. Byly prokázány rozdíly v absorpci a recyklaci adenosinu ve spojení s regulací sacharidového a lipidového metabolismu, což je významné pro získávání energie v organismu. Dále byla potvrzena role adenosinového receptoru při stimulaci cAMP a byl vytvořen farmakologický profil receptoru adenosinu u *D. melanogaster* (DmAdoR). Extracelulární adenosin jako evolučně konzervovaný homeostatický regulátor moduluje energetický metabolismus, buněčný cyklus a např. také apoptózu.

V dizertační práci je řada originálních výsledků, o jejich kvalitě svědčí také to, že publikované články již prošly recenzním řízením v kvalitních zahraničních časopisech (Journal of Neurochemistry IF=4,061; Insect Biochemistry and Molecular Biology IF=3,246), kromě toho je Mgr. Lucie Kučerová uvedena jako spoluautorka dalších dvou článků (Archives of Insect Biochemistry and Physiology IF=1,361; European Journal of Entomology IF=1,061), které nejsou součástí disertační práce.

Dizertační práci tvoří anglicky psaný obecný úvod, dvě publikace a společný závěr. V úvodu o 14 stranách (z toho ale pouze 7 stran tvoří vlastní literární rešerše na základě 48 citací) autorka popisuje obecný přehled signálních drah obsahujících adenosin, adenosinové receptory, transport a metabolismus, nakonec se zaměřuje na přehled znalostí v této oblasti u *Drosophily*. Úvod je stručný, ale výstižný, na druhou stranu se informace duplikují s úvodními částmi obou publikovaných článků. Články jsou uvedeny v plném znění včetně doplňujících materiálů a uvedení podílu práce autorky. Z toho vyplývá, že autorka musela zvládnout řadu experimentálních metodik, od laboratorní práce s *Drosophilami* a tkáňovými kulturami po molekulárně-biologické techniky jako např. izolace RNA, syntéza cDNA, qRT-PCR atd. Metodiky jsou v publikacích dostatečně





popsané, výsledky zřetelně prezentované a dokumentované originálními grafy a obrázky, text je velmi přehledný a srozumitelný. Celá práce je uzavřena jednostránkovým shrnutím nejdůležitějších výsledků.

Po formální stránce tato práce odpovídá standardům kladeným na doktorskou dizertační práci, pokud jsou blíže specifikované požadavky ze strany PřF JU, je na odborné komisi, aby je posoudila.

K předkládané práci nemám zásadní námitky, následně uvádím jen drobné připomínky a dotazy:

- Dizertační práce se zabývá *D. melanogaster*, nakolik jsou ale získané výsledky platné pro další skupiny hmyzu, popřípadě další bezobratlé živočichy? Byl například popsán u bezobratlých i jiný AdoR nebo je evolučně konzervován pouze jeden oproti čtyřem u obratlovců?
- Adenosin se uvolňuje při apoptóze, nádorech a dalších případech, kdy je ovlivněn energetický metabolismus buněk, jaká je úloha adenosinu při spuštění imunitních reakcí během infekce, jsou odlišné mechanismy např. podle původce infekce?
- Jaká je spojitost metabolismu adenosinu (zejména adenosin deaminázy) s oxidativním stresem?
- V úvodní části mi trochu chybí širší pojetí problematiky, mohl by zde být větší přesah mimo uvedené dvě publikace, adenosinovým metabolismem se zabývá řada odborných a studentských prací, bylo by užitečné do obecného úvodu zařadit i odkazy na další problematiku. Stejně tak vzniklo určitě velké množství doplňujících dat, které nejsou v člancích, ale v dizertační práci by je bylo možné uvést. Zajímala by mě například fotodokumentace fenotypu mutantů DmAdoR.

Dizertační práce Mgr. Lucie Kučerové představuje rozsáhlou a metodicky i časově náročnou studii. Autorka v ní dále dokazuje, že má velký přehled o literárních údajích a dovede své výsledky s těmito údaji srovnávat, kriticky je hodnotit a diskutovat. Předkládaná práce splňuje požadavky kladené na tento typ práce, proto ji **doporučuji ke schválení** jako jeden z předpokladů k udělení titulu Ph.D.

V Brně 18.3.2013

RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

