

Posudek oponenta na disertační práci **RNDr. Andrei Bednářové**:

Mode of action of adipokinetic hormone at the subcellular level in potentiating anti-oxidative responses in insects

Adipokinetické hormony (AKHs) hmyzu jsou neuropeptidy, které mají primárně metabolickou funkci spočívající v mobilizaci lipidů, glycidů nebo aminokyseliny prolinu z tukového tělesa a jejich utilizaci tkáněmi (hlavně svalovinou během letu). Je také známo, že AKHs figurují v obraně proti oxidativnímu stresu tím, že stimulují antioxidační obranné mechanismy. I když je tato funkce AKHs vysoce důležitá, její molekulární podstata je stále nedostatečně objasněná. A právě příspěvek k poznání této problematiky bylo předmětem předložené disertační práce. Hlavními cíli experimentální části disertační práce bylo zkoumat, do jaké míry AKH může zmírnit oxidativní stres vyvolaný v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Dále autorka práce studovala důležitost intracelulárních zásob vápníkových iontů a signálních drah zahrnujících PKC a cAMP pro funkční projevy antioxidačních vlastností AKH. Autorka se rovněž zaměřila na vztah FoxO-sestrin-AMPK-TOR dráhy k AKH signálování během stresové odpovědi.

K tomuto účelu autorka nastudovala a použila širokou škálu náročných experimentálních metod pro detekci produktů lipidové peroxidace, intracelulárních zásob vápníku, membránové fluidity, exprese genů apod., což bylo spojeno s použitím technik ELISA, western blotting, HPLC, spektrofotometrických, fluorescenčních a dalších.

Vlastní disertační práce představuje 108 stránkový spis psaný v anglickém jazyce. Prvních 28 stran tvoří úvodní kapitulu, která je přehledně rozčleněna do podkapitol, ve kterých jsou popsány jednotlivé aspekty tvorby reaktivních metabolitů kyslíku, oxidativního stresu, poškození biologicky důležitých molekul, a dále antioxidační adaptační mechanismy. Poté následuje přehledný popis jednotlivých cílů disertační práce. Tyto kapitoly jsou vypracovány velmi pečlivě, dostatečně podrobně a prakticky bez formálních chyb.

Jak vyplývá z další části předložené disertační práce, autorka dosáhla velmi hodnotných výsledků. To je dokumentováno třemi pracemi již opublikovanými v kvalitních impaktovaných časopisech a rukopisem čtvrté práce, která již byla rovněž přijata do tisku. Chtěl bych zdůraznit, že ve všech čtyřech člancích je dr. Bednářová prvním autorem, její podíl na těchto člancích je tedy vysoký a nezpochybnitelný. Dr. Bednářová je navíc autorkou nebo spoluautorkou dalších pěti článků zveřejněných rovněž v časopisech patřících mezi špičku v oboru. Autorka rovněž výsledky prezentovala na celé řadě národních i mezinárodních vědeckých konferencí – v práci je uvedena aktivní účast na 8 konferencích, které se konaly vesměs v zahraničí.

V disertační práci jsou popsány následující originální výsledky, které se vážou k hlavním publikacím:

- ✓ Oxidativní stres byl indukován efektivně v podmínkách *in vivo* i *in vitro* aplikací peroxidu vodíku. AKH výrazně redukoval poškození lipidů a proteinů a snižoval mortalitu u hmyzu vystavenému oxidativnímu stresu.
- ✓ Byl prokázán význam PKC a cAMP drah a extra- i intra-celulárních zásob vápníkových iontů pro stimulaci antioxidačních mechanismů pomocí AKH.
- ✓ Pomocí geneticky modifikované *D. melanogaster* (potlačena x over-exprimovaná tvorba AKH) bylo zjištěno, že dFoxO pravděpodobně působí v signální dráze AKH jako transkripční faktor zprostředkující reakci *D. melanogaster* na oxidativní stres.

- ✓ Součástí práce je také přehledný článek, ve kterém je podrobně diskutována možná paralela v odpovědi na stres mezi glukagonem a glukagon-like peptidy u obratlovců na straně jedné a AKH u hmyzu na straně druhé.

Dotazy a připomínky oponenta:

Není pochyb, že výsledky jsou skutečně originální a cenné pro mezinárodní vědeckou komunitu. Práce má výbornou úroveň, výsledky již prošly recenzním řízením a byly publikovány v předních časopisech daného oboru. Proto následující připomínky a dotazy považuji spíše za náměty do diskuse:

1. Je známo, že u savců se na oxidativním stresu významným způsobem podílí rovněž syntéza oxidu dusnatého, resp. její produkt oxid dusnatý. Má tato molekula význam také v oxidativního stresu u hmyzu?
2. V tělních tekutinách lze poměrně jednoduše fluorimetricky (ORAC) nebo luminometricky (TRAP) stanovit celkovou antioxidační kapacitu, která nám ukáže informaci o účinnosti neenzymatických antioxidačních mechanismů. Má autorka zkušenosti s tímto stanovením v hemolymfě a pokud ano, jak se vyvíjí ORAC/TRAP po podání peroxidu vodíku?
3. Hmyz je vystaven oxidativnímu stresu také po působení vnějších faktorů (postřiky, polutanty, fotosensitizace + UV záření apod.). S tím souvisí také toxické působení celé řady oxidantů. Myslíte, že indukce oxidativního stresu pomocí peroxidu vodíku je pro sledování úlohy AKH v antioxidační obraně dostačující nebo by se měl použít i jiný oxidant (superoxidový anion, oxidy dusíku, peroxynitrit)?
4. Aplikace AKH bránila oxidativnímu poškození molekul. Vycházíme-li z toho, že AKH stimuluje antioxidační obranné mechanismy, které by to mohly být kromě katalasy (která byla v práci sledována)?

Závěr

Autorka prokázala tvůrčí schopnosti, teoretickou připravenost, schopnost analytického myšlení při plánování experimentů, znalost vysoce náročných a specializovaných metodik i schopnost reálně interpretovat dosažené výsledky a zaujmout k nim kritické stanovisko. Výsledky významně obohatily současné poznání o zapojení AKHs do obrany proti oxidativnímu stresu u hmyzu.

Disertační práce po všech stránkách splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru.

Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Brně 30. března 2015

Doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.
BFÚ AV ČR, v.v.i.



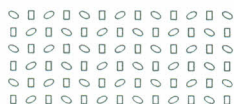
Brno 30. března 2015

Oponentský posudek na dizertační práci Andrey Bednářové „Mode of action of adipokinetic hormone at the subcellular level in potentiation anti-oxidative responses in insects“

Předložená dizertační práce zpracovává tematiku zapojení adipokinetického hormonu (AKH) do reakcí spojených s oxidačním stresem. Toto působení AKH je kromě klasické aktivace energetického metabolismu velmi zajímavou a potenciálně využitelnou oblastí při studiu stresu u bezobratlých i obratlovců. Náplní práce jsou experimenty na dvou hlavních modelových organismech (*P. apterus* a *D. melanogaster*) s cílem popsat funkci a působení AKH během chemicky navozeného oxidačního stresu.

V dizertační práci je řada originálních výsledků, o jejich kvalitě svědčí také to, že publikované články již prošly recenzním řízením v kvalitních mezinárodních časopisech (Comparative Biochemistry and Physiology A, Physiological Entomology, Comparative Biochemistry and Physiology C). Řada výsledků vznikla ve spolupráci s Mississippi State University, kde autorka dlouhodobě působila. V souhrnné review publikaci jsou nejprve detailně shrnuty současné znalosti o AKH paralelně s glukagonem, kdy se jedná o analogický systém hormonální regulace homeostáze. Další výzkum se týkal mechanismů působení AKH v podmínkách *in vivo* a také *in vitro* na vypreparovaném hmyzím nervovém systému. Následně byly studovány mechanismy signálové transdukce zahrnující cAMP a protein kinázu C, které jsou společně s vápenatými ionty základními prvky vedoucími k antioxidační odpovědi organismu. Významné jsou také pokusy s použitím RNAi linií *D. melanogaster* pro snížení nebo zvýšení genové exprese, které vedly k objasnění role transkripčního faktoru dFoxO. Z rozsáhlé experimentální práce vyplývá, že AKH je součástí konzervativní stresové reakce, která probíhá analogicky u bezobratlých i obratlovců.

Dizertační práci tvoří obecný úvod a komentovaný soubor čtyř prvoautorských publikací, dalších pět publikací autorky je stručně zmíněno na konci práce. V úvodu o 43 stranách autorka popisuje reaktivní kyslíkové metabolity, oxidační stres, poškození způsobené oxidačním stresem, antioxidační mechanismy a zapojení hormonů do odpovědi na působení stresu. Součástí této první kapitoly jsou i jasně vymezené cíle a hypotézy, na které navazují jednotlivé publikace. Rozsáhlá metodika uvedená v publikačních výstupech ukazuje, že autorka musela pro dosažení uvedených výsledků zvládnout řadu metod z oblasti molekulární biologie, biochemie a genetiky. Dizertační práce je pečlivě psána na vysoké jazykové i odborné úrovni v anglickém jazyce, po gramatické a stylistické stránce ji podle mne lze těžko něco vytknout. Po formální stránce tato práce plně odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou dizertační práci, kvalitou a počtem publikačních



výstupů je velmi nadstandardní. Metodiky jsou v publikacích dostatečně popsány, výsledky zřetelně prezentované a dokumentované originálními grafy a obrázky, text je velmi přehledný a srozumitelný, bez překlepů. Autorka používala současnou anglickou odbornou literaturu (více jak 160 citací pouze v úvodu, další literatura je uvedena u jednotlivých publikací). Závěry práce odpovídají hypotézám a jsou stručně shrnuty na str. 97.

K předkládané práci nemám námítky, následně uvádím jen drobné připomínky a několik dotazů:

- V úvodní části bych uvítal schéma zahrnující studované pro- a antioxidační mechanismy.
- Detailní obecný přehled by mohl být doplněn informacemi, jakých taxonů se týká (není jasné, zda je vše uvedené možno najít u člověka i u hmyzu).
- Zmíněny jsou stručně i dusíkové reaktivní metabolity, jaké jsou mechanismy odbourávající tyto látky, tj. co je pro ně analogem antioxidantů? Předpokládá se také zapojení AKH v těchto reakcích?
- Reaktivní kyslíkové metabolity jsou produkovány během oxidačního vzplanutí savčích fagocytů, u hmyzu je jejich produkce mnohem nižší a u některých druhů nebyly tyto reakce prokázány, jaká je situace u *P. apterus* a *D. melanogaster*?
- Popisované působení AKH po vlivu oxidačního stresu je dokumentováno na dospělých, jsou nějaké rozdíly v larválních stádiích?
- Některé druhy např. herbivorního hmyzu přijímají s potravou velké množství antioxidantů, tento stav může posunout rovnováhu pro- a antioxidačních dějů ve prospěch antioxidantů. Zapojuje se AKH také v těchto podmínkách, případně projeví se to na vyšší odolnosti vůči oxidačnímu stresu?
- Je úroveň chemicky indukovaného oxidačního stresu v experimentech srovnatelná s reálnou situací, která může nastat mimo laboratoř (přírodně nebo např. při aplikaci pesticidů)?
- Oxidační stres působí na celý hmyzí organismus, některé tkáně jako střevo mu jsou ale vystaveny intenzivněji, je antioxidační odpověď stejná v celém organismu nebo je do určité míry lokalizovaná?

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



RNDr. Pavel Hyršl, PhD.

Tel.: 549 494 510

E-mail: hyrsl@mail.muni.cz





STILLMAN

Department of Natural Sciences

2nd March 2015

TO WHOM IT MAY CONCERN

Detailed review report of thesis entitled "***Mode of action of adipokinetic hormone at the sub-cellular level in potentiating anti-oxidative responses in insects***" submitted to the School of Doctoral Studies in Biological Sciences, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Czech Republic for award of Ph.D.

Candidate: Andrea Bednarova

Review report:

It was a pleasure for me to read and evaluate the thesis entitled "**Mode of action of adipokinetic hormone at the sub-cellular level in potentiating anti-oxidative responses in insects**" by Andrea Bednarova of the Faculty of Science, University of South Bohemia and the Institute of Entomology, Biology Centre of ASCR. I commend the candidate as well as the supervisors (Prof. D. Kodrik and Dr. N. Krishnan) for an excellent and well-organized thesis. However, the credit in the end entirely goes to the candidate Andrea Bednarova for submitting a comprehensive and detailed study of the mode of action of AKH in its anti-oxidative responses. Of note is the fact that almost all aspects that encompass this thesis has been published with the exception of one Chapter, which is a manuscript in communication.

The thesis has been divided into 7 Chapters: The first Chapter gives an excellent introduction to the topic along with a very comprehensive review of literature (General Introduction). This sets the stage for coming out with a set hypotheses which are clearly and succinctly enumerated as objectives of the study (4 objectives). All the objectives have a primary goal to elucidate the mode of action of AKH in potentiating anti-OS response in insects.

In Chapter II, which is a published peer-reviewed review paper, the candidate deals with aspects related to determining if AKH function in insects has parallels with glucagon and glucagon-like peptides in vertebrates especially during stress responses. This is a very well written review since insights obtained from glucagon and glucagon-like peptides in their stress responsive roles will certainly inform as well as help to understand the probable mode of action of AKH in insects in their stress responsive role.

In Chapter III, which is a published research article, the candidate details if *in vivo* results on the protective action of AKH can be also effectively replicated in an *in vitro* system? In my opinion, this sort of study is of paramount importance to generate break-through results in the field of physiology and biochemistry. Only when an *in vitro* system is established, can one target specific signaling pathways with specific agonists and antagonists and evaluate the response. Needless to say, the methods are detailed enough to allow easy reproducibility and repeatability of the results obtained in this study and can also be extended to other insects not covered in this study. The methods used in these studies are sound and the statistical treatment of data appropriate.

In Chapter IV, the candidate has nicely and cleanly demonstrated using the *in vitro* technique developed earlier (Chapter III) that AKH employs a conserved signal transduction pathway to

exert its anti-oxidative stress reactions. I was impressed by the various assays and methods used in this study.

The fifth chapter (Chapter V) is a manuscript in communication that seeks to determine if AKH signaling involves the FoxO-AMPK-TOR pathway. To address this, the candidate has used the fruit fly *Drosophila melanogaster* with its repertoire of genetic potential. These kind of studies are extremely relevant and highly recommended when attempting to delineate signaling pathways.

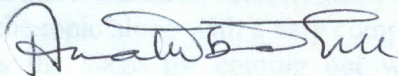
Chapter VI summarizes the important results emanating from the entire work followed by Chapter VII where supplementary scientific contributions of the candidate have been appended. The last Chapter demonstrates that the candidate has indeed gone above and beyond her own research topic and has established herself as a competent researcher.

Recommendation:

Having evaluated this thesis, **I have no hesitation to strongly recommend award of the Ph.D.** degree to the candidate, consequent to having completed all other formalities necessary for the award of the degree.

Some of the questions that may be posed for the candidate are as follows:

1. While hydrogen peroxide has been used as an elicitor of oxidative stress in the studies, was there any particular reason for not employing Paraquat, which is also well known, as well as a potent generator of OS ?
2. Are there any organs other than the brain (which was used in the *in vitro* study) which could have been equally effective as an *in vitro* system?
3. I am sure that the candidate is aware of the complexity of attempting to identify the precise signaling pathway employed by AKH even while using the *Drosophila* model. What other strategies could have been used to conclusively link FoxO to AKH signaling?



Sincerely,

Anathbandhu Chaudhuri, PhD

Assistant Professor of Biology

achaudhuri@stillman.edu

402-590-6480 (Cell)

205-366-8914 (off)


March 2, 2015

Post Office Box 1430, Tuscaloosa, Alabama 35403

Telephone 205-349-4240