



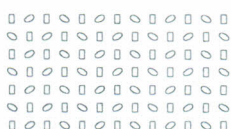
Brno 19. ledna 2017

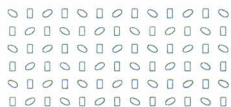
## Oponentský posudek na dizertační práci Milady Zemanové „Anti-oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* – The role of adipokinetic hormone and adenosine“

Předložená dizertační práce zpracovává tematiku zapojení adipokinetického hormonu (AKH, nebo lépe řečeno neuropeptidů ze skupiny AKH) a adenosinu do reakcí spojených s oxidačním stresem a antitoxidační odpovědí u hmyzu. Působení AKH je kromě klasické aktivace energetického metabolismu velmi zajímavou a potenciálně využitelnou oblastí při studiu pro- a antioxidačních mechanismů u bezobratlých i obratlovců, stejně tak propojení AKH s parakrinní regulací adenosinem.

V dizertační práci je řada originálních výsledků s octomilkou *Drosophila melanogaster*, o jejich kvalitě svědčí také to, že publikované články již prošly recenzním řízením v kvalitních mezinárodních časopisech (např. International Journal of Molecular Science, Journal of Insect Physiology). V první souhrnné review publikaci jsou nejprve detailně shrnuty současné znalosti o hmyzích adipokinetických hormonech, které aktivují antioxidační mechanismy po působení různých stresorů. Uplatňují se zde mechanismy signálové transdukce zahrnující cAMP a protein kinázu C, které jsou společně s vápenatými ionty základními prvky vedoucími k antioxidační odpovědi organismu, dále transkripční faktor dFoxO nebo jiné hmyzí hormony. Další experimentální publikace rozpracovávají s použitím mutantních linií *D. melanogaster* pro AKH a adenosinový receptor signální kaskády antioxidačních mechanismů po chemické indukci oxidativního stresu.

Dizertační práci tvoří obecný úvod a komentovaný soubor tří publikací a jednoho manuskriptu. V úvodu o 46 stranách autorka popisuje stresovou a antistresovou odpověď organismu, jejich regulaci a následně také zapojení AKH i adenosinu. Jako jeden typ stresu je důkladněji popsán oxidační stres, antioxidační mechanismy a jejich hormonální a parakrinní regulace. Součástí této první kapitoly jsou i vymezené cíle, 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 *Drosophily*. Dizertační práce je pečlivě psána na vysoké jazykové i odborné úrovni v anglickém jazyce. Po formální stránce tato práce plně odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou dizertační práci. Metodiky jsou v publikacích dostatečně popsány, výsledky zřetelně prezentované a dokumentované originálními tabulkami, grafy a obrázky, text je velmi přehledný a srozumitelný, bez překlepů. Podíl autorky na jednotlivých publikačních výstupech je uveden, kromě vlastní experimentální práce je to i příprava textu manuskriptů (včetně prvoautorských) a práce s literaturou. Autorka používala současnou





anglickou odbornou literaturu (více jak 140 citací pouze v úvodu, další literatura je uvedena u jednotlivých publikací). Stručný závěr je uveden na str. 33.

K předkládané práci nemám námítky, následně uvádím několik dotazů:

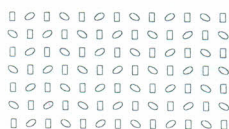
- V jakém stádiu je publikace manuskriptu?
- Do jaké míry je možné zobecnit výsledky získané na *Drosophila* na další druhy hmyzu, případně další bezobratlé až obratlovce? Mnozí autoři se snaží propojit fyziologii a imunologii hmyzu s obratlovci včetně člověka, jaké jsou příklady analogických signálních drah ve studované problematice antistresových mechanismů?
- Zmíněny jsou stručně i dusíkové reaktivní metabolity, jaké jsou mechanismy odbourávající tyto látky? Je zapojen AKH v těchto reakcích?
- Některé druhy hmyzu přijímají s potravou velké množství antioxidantů (např. bourec morušový), tento stav může posunout rovnováhu pro- a antioxidačních dějů ve prospěch antioxidantů. Zapojuje se AKH a adenosin také v těchto podmínkách, případně může se to projevit se to na vyšší odolnosti vůči oxidačnímu stresu?
- Oxidační stres působí na celý hmyzí organismus, některé tkáně jako střeva mu jsou ale vystaveny intenzivněji, je antioxidační odpověď stejná v celém organismu nebo je do určité míry lokalizovaná?
- Je úroveň chemicky indukovaného oxidačního stresu v experimentech (paraquat) srovnatelná s reálnou situací, která může nastat mimo laboratoř (přírodně nebo např. při aplikaci insekticidů)?

Dizertační práce Milady Zemanové 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.

doc. RNDr. Pavel Hyršl, PhD.

Tel.: 549 494 510

E-mail: hyrsl@mail.muni.cz



Topic: The review of **Milada Zemanová's PhD thesis** entitled: **Anti-oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* – The role of adipokinetic hormone and adenosine**

To whom it may concern,

Budapest, 15<sup>th</sup> January, 2017.

I'm honoured for the respect to perform the review of the above entitled Ph.D. Thesis Series, No.18. University of South Bohemia, Faculty of Sciences, School of Doctoral Studies in Biological Sciences (České Budějovice, Czech Republic) 143 pp.

According to the information provided by the Head of the Committee for PhD studies in Physiology and Developmental Biology study program before I received this work a formal checking has been performed, and it was found that the thesis has met all necessary formalities of the Faculty of Sciences study rules. So, accordingly, I fully accept this and from now onwards only the contents will be considered.

I have carefully read and evaluated the thesis and I place in advance **that overall I have no any hesitation to recommend awarding the Ph.D. degree to the Candidate Milada Zemanová after a successful defence.** Below I will put forward my comments and questions.

The **(1) Introduction** has provided a very well-structured and clear overview of a hot topic in scientific research describing the environment as the most serious stress factor, while internal stress factors exist as well. The "non-visible" oxidative stress (OS) via the reactive oxygen species (ROS) is one of the most devastating ones and responsible for many human disorders as well, which is also dealt with in detail. The potential anti-stress reactions at organismal and cellular level are very well presented. Moreover detailed regulatory mechanisms are supporting these events which are also clearly introduced. The complexity and similarities between invertebrates including insects and vertebrates involving mammals are appropriately depicted. The key players in insects are the adipokinetic hormone (AKH) at organismal level, while at cellular level adenosine which is at the same time is evolutionary conserved across species of invertebrates and vertebrates. In sum, the timeliness and relevance of the chosen topic is unquestionable which is well argued under **(1.4) Summary.**

The **(2) Objectives** are very shortly addressed and it should have been better itemized to provide a clear guideline for the overall Ph.D. work. This small paragraph is disproportional in my eyes to the work performed, especially after a very comprehensive

introduction. Even the use of the universal *Drosophila melanogaster* model is justified clearly in Paper I.

The (3) **Results and Conclusions** with different wording from the abstracts summarize the main findings which is a good point. Regarding Paper I (published in International Journal of Molecular Science), which is a fine review in its nature of insect endocrinology and OS field, the role of the **Candidate**, is though important, but not major. I highly appreciate, however, the clear difference in structural build up and content of the review and the (1) **Introduction**. I wonder, however, that taking part in writing of the review was by on chance or purpose, because generally a Ph.D. student becomes familiar with an area step by step and gains an overview by the time of writing the thesis. In the meantime I understand that the review was a stimulant for the experiments undertaken, especially the decision for using *D. melanogaster* as an excellent model species - as it is declared under (3) **Results and Conclusions** Paper I -, but it contradicts the fact that the **Candidate** had already four conference participations (2011-2015) working already on this area and used *D. melanogaster*.

Paper II is a chapter of Animal Physiology 2016 - Proceedings of International Scientific Conference. These are the first published results where the mutant fly strains were used to clarify the AKH involvement in antioxidant defence in *D. melanogaster*. The enzyme activity of glutathione S-transferase was minimal among the (mutant and control) strains in the presence of oxidative stress or functional AKH and adenosine, however its gene expression dramatically increased following a paraquat administration. Beside the strengths of this preliminary work I very much miss that a dose dependence study for establishing the sublethal, or alternatively optimal dose of paraquat administration is missing. On what bases the 20mM paraquat was chosen? At least a reference of "unpublished data" should have been provided (see Paper III).

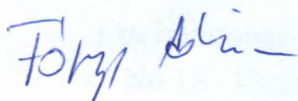
Paper III (published in Journal of Insect Physiology) is the most substantial complex work of the **Candidate**. This contains all clear questions and answers of the respective OS research. Former experiments were extended and improved by stress markers as well. Beside the details the results clearly showed the complex involvement of AKH and adenosine in the anti-oxidative stress response in *D. melanogaster*. The Materials and methods are well described and detailed as well as Results and Discussion.

Paper IV is submitted for publication to journal Physiology and Behavior. In this study the influence of AKH signalling was studied on the senescence characteristics during aging in *D. melanogaster* in a sexually dimorphic manner. This study confirms the impact of AKH signalling in aging and senescence related characteristics in *D. melanogaster*. It is well known that a capacity to react to OS and senescence have common features. I miss in

the thesis that this aspect has not been elaborated in the **(1) Introduction** and especially no any reference was given to this topic in the **(2) Objectives**.

In overall I'm positive that these promising studies will be continued which have both medical and general insect physiology relevance. I wish the **Candidate** and the **Supervisor** success and fruitful accomplishments in this very interesting field. The *D. melanogaster* is certainly a good model and the capacity of the TALEN and CRISPS methods are endless in combination with physiological and behavioural tests.

Sincerely yours,



Adrien Fónagy (Ph.D;D.Sc)

Ecotoxicology Group (head)  
Plant Protection Institute  
Centre for Agricultural Research  
Hungarian Academy of Sciences (MTA)

H-1022, Budapest, Herman Ottó u.15

Hungary

tel: +36-1-39-18-612

Fax: +36-1-39-18-655



Ing. Pavel Jedlička, Ph.D.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Flemingovo nám. 2.

166 10 Praha 6

E-mail: [jedlicka@uochb.cas.cz](mailto:jedlicka@uochb.cas.cz)

Oponentský posudek na dizertační práci **Milady Zemanové** s názvem:

## **Anti-oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* The role of adipokinetic hormone and adenosine**

Autorka předkládá práci vypracovanou v rámci projektů řešených v Laboratoři fyziologie hmyzu, ENTÚ, Biologické centrum AVČR, v.v.i. Hlavní náplň práce aspirantky spočívala ve studiu linií *D. melanogaster* mutovaných v genech pro adipokinický hormon (AKH) a adenosinový receptor (reprezentanti endokrinní a parakrinní signalizace), popřípadě jejich kombinace. Konkrétně zaznamenala reakce těchto linií na oxidační stres vyvolaný aplikací herbicidu paraquat. Kromě vlivu na přežívání a měření exprese AKH a jeho koncentrace v hemolymfě, byly měřeny aktivity a exprese markerů oxidačního stresu jako je glutathion S-transferáza a samotný glutathion. Dále byly sledovány exprese dalších signálních markerů jako je target of rapamycin, FoxO a enzymů Akt (protein kináza B) a AMPK (AMP-activated protein kinase).

Hlavním výstupem je prvoautorská publikace v prestižním časopise Journal of Insect Physiology. Dalšími pak spoluautorství v pěkném review (International Journal of Molecular Sciences), článek připravený k podání do redakce (Physiology & Behavior) a článek v neimpaktovaném časopise (Animal Physiology).

Vlastní dizertace se skládá z úvodní eseje (prvních 27 stran) a kopií všech výše uvedených publikací.

**Úvod** je vždy přirozeně v režii každého autora a lze ho stavět a formulovat mnoha způsoby. Proto následující poznámky a otázky jsou spíše k úvaze než k zodpovězení během vlastní obhajoby.

Úvod jako celek působí poněkud nevyrovnaně, hlavně díky první části. Informace z obecné ekologie (organismy jsou buď specialisté nebo generalisté) nejsou dané do kontextu se studovaným modelem. Je *D. melanogaster* specialista nebo generalista (?); jak lze spojit oxidační stres vyvolaný na mutantních liniích dohromady s pojmy sezónní migrace, prediktivní a konsekvenciální dormance (?). Rovněž mi u těchto ekologických pojmů chybí citace (kapitolka 1.1.1, strana 2). Podobně to platí i pro následující kapitolu. Str. 5 formulace: „The next important endocrine centrum is represented by prothoracic glands, which secrete ecdysteroids – hormones controlling insect moulting and metamorphosis, and reproduction.“ – prothorakální žláza je přítomná jen u larválních stadií, proto zmiňovat zde reprodukci může být zavádějící. Str. 6 s popisem funkce hmyzích neurohormonů si autorka vystačila s citací jednoho (dnes už) 20 let

starého review – Gäde et al. (1997). Fig. 3: alignment ukazuje srovnání sekvencí AKH z různých druhů hmyzu s částečnou sekvencí glukagonu. Proč tam glukagon není celý, a který peptid obratlovců je strukturně (nikoliv funkčně) podobnější AKH než glukagon? Str. 9 citace ke studiu AKH receptoru z roku 2002 považují za nedostačující – během 15ti let vznikla řada dalších prací s touto problematikou. Rád bych viděl aspoň jedno současnější review např.:

Hauser, F., Grimmelikhuijzen, C.J., 2014. Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 209C, 35–49.

Z **publikačních výstupů** je zjevné, že si autorka osvojila řadu metod od udržování mutantních linií much, přes aplikace paraquat, imunodetekce až po molekulárně-biologické postupy. Díky nim také získala nové, zajímavé výsledky, které jsou již opublikované nebo připravené k odeslání do redakce.

Při srovnání článků publikovaných v časopise *Animal Physiology* a *Journal of Insect Physiology* si není možné nevšimnout překrývajících se experimentů a výsledků, které jsou jednou prezentované ve formě tabulek a podruhé jako grafy. Oponent přirozeně neví, jestli jde o úplně stejná data nebo jestli pokusy byly opakované znovu. Nicméně zastává názor, že použití obou článků vedle sebe jako výstupů dizertační práce snižuje dojem o jedinečnosti prezentovaných dat.

Výsledky samotné jsou vědecky hodnotné a vyvolávají řadu dotazů, z nichž následující přikládám jako témata k obhajobě:

1. V publikovaném review je nástin modelu zpětnovazebné interakce AKH s transkripčním faktorem FoxO. Požádal bych autorku o vysvětlení této části schématu (např. v rámci připravované prezentace).
2. Autorka dokázala, že mutanti Akh- mají prakticky nulovou koncentraci aktivní formy AKH peptidu (Zemanová et al., 2016; Figure 4). Nicméně exprese genu pro AKH je stejná s kontrolní linií (Figure 5). Na druhou stranu jediná srovnatelná práce, která je zde okrajově citovaná – Gáliková et al. (2015) ukazuje, že kontrolní linie *D. melanogaster* mají cca 1.5x vyšší expresi AKH než u AKH<sup>A</sup> (Figure 9D). Mluví zde o negativním autoregulačním systému. Jak je tento rozdíl ve výsledcích možné vysvětlit (rozdílnou metodou genetické manipulace?)
3. V (zatím) neopublikované práci byly získány zajímavé výsledky, v kterých byl korelován věk samců a samic z kontrolní linie a tří linií s mutovaným AKH spolu s expresí FoxO, TOR, AMPK a Akt tedy markerů stárnutí a detekce energie z potravy. Oponenta by zajímalo, jak lze vysvětlit nebo diskutovat záznam exprese Akt, která překvapivě vzrůstá u starých samců (Figure 4)?
4. Liší se exprese AKH u EE-Akh a AKH-Oex (pokud je autorka měřila)?
5. Měřila autorka také expresi AKH receptoru u AKH mutantů? Bylo by zajímavé vědět, jestli existuje zpětná vazba mezi přítomností funkčního – nefunkčního ligandu a abundancí jeho specifického receptoru.

## Závěrem

Autorka získala řadu zajímavých výsledků, které jistě budou také sloužit jako důležité podklady pro další výzkum mechanismu působení AKH při reakci na oxidační stres a jeho interakce s dalšími signálními drahami u *D. melanogaster*.

Práci doporučuji k obhajobě, jako jeden z podkladů pro získání doktorského titulu.

v Praze 17. ledna, 2017

Pavel Jedlička

