

Oponentský posudek diplomové práce

Důležitost systemické inzulínové rezistence pro imunitní odpověď

Autor: Bc. Lukáš Strych
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta, České Budějovice
Školitel: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Imunitná odpověď je energeticky náročným procesom, pri ktorom imunitné bunky súperia s periférnymi tkanivami o cirkulujúce zdroje energie. Hladina cirkulujúcich cukrov počas infekcie vzrastá. Cukry sú však použité predovšetkým imunitnými bunkami, a nie periférnymi tkanivami (Bajgar et al. 2015, Plos Biology). Tento metabolický prešmyk je sprevádzaný zníženou inzulínovou signalizáciou v metabolických tkanivách. Jednou z hypotéz vysvetľujúcou tento jav je inzulínová rezistencia. Ako k inzulínovej rezistencii dochádza, a aký má význam pre samotnú imunitnú odpoveď však nie je úplne jasné. Diplomová práca Lukáša Strycha skúma práve túto problematiku. Zvoleným modelom pre štúdium bola infekcia drozofily obyčajnej (*Drosophila melanogaster*) parazitickou osičkou *Leptopilina boulardi*. Cieľom práce bolo overiť, že v tomto modeli dochádza v periférnych tkanivách k zníženiu inzulínovej signalizácie v dôsledku inzulínovej rezistencie. Práca ďalej testovala, či je inzulínová rezistencia periférnych tkanív adaptívnym mechanizmom, resp. či je potrebná pre akútnu imunitnú odpoveď. Posledným cieľom bolo testovanie úlohy Jak-Stat signalizácie v indukcii inzulínovej rezistencie vo svaloch.

Práca tieto ambiciózne ciele z veľkej časti splnila a z môjho pohľadu priniesla mimoriadne zaujímavé poznatky. Autor ukázal, že infekcia *L. boulardi* vedie k zníženej fosforylácii Akt kinázy a zvýšenej expresii transkripčného faktoru *4E-BP*, teda k markerom zníženej inzulínovej signalizácie. Expresia *Dilps* je však zvýšená, z čoho autor vyvodil záver, že dôvodom zníženej inzulínovej signalizácie na periférii je inzulínová rezistencia. Autor ďalej experimentálne zvýšil inzulínovú dráhu v periférnych tkanivách nadexperimentu konštitutívne aktívnej verzie inzulínového receptora, čo viedlo k zníženej tvorbe lamelocytou pri infekcii. Z týchto pokusov teda vyplýva, že inzulínová rezistencia v periférnych tkanivách (tukovom telese a svaloch), je potrebná pre indukciu správnej imunitnej odpovede. Autor tiež zistil, že produkcia Jak-Stat ligandov (konkrétne Upd3) imunitnými bunkami je potrebná pre tvorbu lamelocytov.

Z uvedených experimentov sa však nezdá, že by zablokovanie tejto tvorby Upd3 pomocou RNAi ovplyvnila vznik inzulínovej rezistencie v periférnych tkanivách.

Výsledky práce sú mimoriadne zaujímavé a dôležité pre pochopenie vzniku metabolického prešmyku pri imunitnej odpovedi. Práca je napísaná pútavým, zrozumiteľným štýlom. Autor v práci preukázal znalosť literatúry i vysokú úroveň kritického myslenia. Rada by som tiež vyzdvihla neobvyklú kvalitu experimentov – western blot experimenty boli zopakované niekoľko krát, bola testovaná efíciencia qPCR primerov, novovytvorené rekombinantné línie nesúce GAL4 GAL80 boli testované pomocou krížení s UAS-GFP, kríženia s RNAi líniami z TRIP kolekcie zahŕňali ako kontroly kríženia s kontrolnou TRIP líniou (pôvodná línia na injektáž s attP sekvenciou), atď. Štatistické analýzy sú taktiež na mimoriadne vysokej úrovni.

V práci sa sem-tam vyskytujú drobné nejasnosti, avšak len v naozaj nepatrnej miere, a nijako významne neznižujú kvalitu práce. Napr. na strane 8, autor tvrdí: „Zde už ztráta IPCs ale způsobí letalitu nebo zvýšenou koncentraci glukózy a pokles zásob trehalózy, glykogenu a tuku (Grönke et al., 2010)“. V práci od Grönke et al, 2010 (Plos Genetics) boli popísané efekty mutácií v *Dilps* (vrátane *Dilp 2,3,5*), nie efekty straty IPCs. Fenotypy však boli podobné ako pri strate IPCs, tie boli popísané v Broughton et al., 2005 PNAS. Zahŕňali však zvýšené zásoby trehalózy, glykogénu i tuku.

Na strane 26 autor spomína „Mann-Whitneyova neparametrického testu“ zrejme ide o Mann-Whitney test.

K výsledkom na stranách 28, 29, 35 by som poznamenala, že osobne by som ukázala preferenčne obrázky, kde je množstvo Akt a fosforylovanej Akt normalizované k nanášacej kontrole alfa-kateninu (teda obrázky z prílohy). Zároveň však oceňujem argumentáciu v diskusii, vysvetľujúcu pohnútky autora ukázať radšej dáta bez normalizácie.

Ako sám autor uvádza v diskusii, potvrdenie inzulínovej rezistencie by bolo možné / vhodné overiť injektážou exogénneho (bovinného) inzulínu. Rozumiem však, že tieto experimenty sú zďaleka nad rámec diplomovej práce, a taktiež z vlastnej skúsenosti predpokladám, že experiment by viedol k značnej variabilite, zrejme ešte väčšej než pri štandardnom sledovaní fosforylácie Akt po infekcii (čo by opäť znemožnilo kvantifikáciu pomocou normalizácie k nanášacj kontrole).

Na záver by som rada položila nasledovné otázky k obhajobe:

- 1.) Autor používa ako *readout* imunitnej odpovede počty lamelocytov a plazmatocytov. Rada by som sa spýtala, či tieto markery tiež stačia k predpokladu zníženého resp. zvýšeného prežívania infekcie. Dalo by sa zhruba odhadnúť, aká bola približná úspešnosť prežívania infekcie pri kontrolných jedincoch, a aká pri jedincoch s experimentálne zvýšenou inzulínovou dráhou?
- 2.) Podľa niektorej literatúry vedie infekcia *L. bouvardi* u *D. melanogaster* vo viac ako 90% k vyvinutiu osičky, avšak príbuzné druhy drozofil, ako napr. *D. yakuba*, *D. santomea* a *D. teissieri* sú k tejto osičke viac-menej rezistentné (napr. Lee et al 2009, Adv Parasitol). Vedel by autor hypoteticky zdôvodniť, prečo?
- 3.) Je známe (alebo dá sa predpokladať), ako globálna deficiencia v inzulínovej dráhe (napr. u *Dilp2,3,5* mutantov alebo pri ablácii inzulín-produkujúcich buniek) ovplyvní imunitnú odpoveď pri infekcii *L. bouvardi*?

Predložená práca je jednou z najlepšie napísaných a najzaujímavejších štúdií, aké som čítala. Autorovi i školiteľovi blahoželám a prajem všetko dobré v ďalšom výskume. Ako oponent navrhujem známku „výborně“ (1), resp. „A“ podľa stupnice ECTS.

V Bratislave, 14.5.2021

Mgr. Martina Gáliková, PhD.

Ústav zoológie, Slovenská akadémia vied

Dúbravská cesta 9

845 06 Bratislava

Slovensko