

Lukáš Strych

Tkáňově specifická role adenosinového receptoru při imunitní reakci

Laboratoř školitele, Tomáše Doležala, prokázala v minulosti klíčovou úlohu extracelulárního adenosinu jako systemického signálu. e-Ado mobilizuje energetické zdroje (cukry) pro potřeby imunitního systému na úkor ostatních tkání během obranné reakce drosofilích larev vůči invazi parazitoida. Lukáš měl za cíl rozlišit systemický účinek adenosinu od účinku orgánově nebo buněčně autonomního, k čemuž využil mutantní alelu adenosinového receptoru (AdoR).

Práce je vybavena rozsáhlým úvodem do problematiky imunitní odpovědi a role adenosinu u drosofily ale i v širším biologickém kontextu. Při čtení mne příjemně překvapila vyspělost textu ve smyslu logického řazení a relevance informací. V textu není nic zbytečného. Použití češtiny přitom ukazuje, že autor informace internalizoval, nemohl je prostě kopírovat. Český překlad občas vede ke komickým spojení, jako např. "bezobratlý purinergní receptor" na str. 13. Úvodu bych kromě občasných překlepů vytkl pouze nedostatečný popis u Obr. 4, kde mělo být jasné uvedeno barevné kódování jednotlivých částí lymfatické zlázy a buněk.

Metody jsou přehledně zpracované, pouze u popisu genotypů (Tab. 2) jsou chybičky, např. u linie 1310 je FRT82 chybně uváděn na 2. chromosomu.

Výsledky. Prvním cílem pokusů bylo testovat, zda je adenosinová signalizace nezbytná na buněčně autonomní úrovni hemocytů a při jejich diferenciaci na lamelocyty během imunitní reakce vyvolané parazitoidem. Odpověď že nikoli získal Lukáš vytvořením klonů hemocytů a lamelocytů homozygotních pro nulovou alelu *adoR* pomocí mitotické rekombinace. Buňky *adoR*^{-/-} nejprve rozpoznal díky absenci fluorescenční značky nesené na homologním *adoR*⁺ chromosomu. Jelikož nemohl u lamelocytů odlišit sesterské klony *adoR*^{+/+} (se dvěma kopiemi mRFP) od heterozygotního pozadí *adoR*^{+/-} (jedna kopie mRFP), musel mutantní *adoR*⁻ chromosom označit GFP a klony identifikovat pozitivně. To ukázalo, že absencí AdoR nejsou hemocyty oproti kontrolním buňkám znevýhodněny, a vyloučilo tak požadavek na buněčně autonomní funkci AdoR v daném kontextu. Tento výsledek jasně ukazují obrázky 15-17. Předcházející obrázky 11-13 jsou spíše technické kontroly. Obr. 13, 15 a 16 obsahují stejnou chybu (i zelené buňky jsou popsány jako Src>mRFP místo GFP). Otázky k této části:

1. Jak by autor vysvětlil, že nelze rozeznat buňky hetero vs homozygotní pro mRFP/GFP?
2. Je možné, že se individuální buňky liší ploidií a tudíž i počtem kopií mRFP/GFP?
3. Proč je poměr heterozygotních buněk nízký vůči homozygotním buňkám obou genotypů?

Dále autor testoval hypotézu, zda AdoR autonomně potlačuje příjem glukosy v buňkách křídelních imaginálních disků během infekce. V tom případě očekával, že klony *adoR*^{-/-} buněk

zvýší akumulaci fluorescenčně značené deoxyglukosy (2-NBDG) oproti zbytku disku. Klony se mu sice podařilo mitotickou rekombinací vyvolat, ale výsledky v Obr. 19 jsou neprůkazné, nebo naznačují spíše opak, kdy GFP-positivní *adoR*⁺ buňky vykazují slabý 2-NBDG signál. Zdá se mi, že jde o artefakt (bleeding zeleného signálu do červeného). Tyto pokusy jsou zatíženy zásadními nedostatky. Jedním je použití běžné epifluorescence namísto konfokální skenovací, která jedinečně může rozlišit hranice klonů a jejich genotyp. Druhým je neprůkazný signál 2-NBDG v discích. Obě možnosti autor v diskusi kriticky hodnotí, což je důležité. K této části mám kritickou poznámku: organizace a popis Obr. 19 je z hlediska publikačních zvyklostí nepřijatelný a nedovoluje porovnání kontrolních a pokusných tkání. Legendy k obrázkům jsou nedostatečné.

Posledním cílem bylo testovat buněčně autonomní vliv AdoR na aktivitu JAK-STAT dráhy, která se při infekci aktivuje ve svalech. Tento přístup narazil na technickou nemožnost indukovat *adoR*^{-/-} klony mitotickou rekombinací ve svalech. V křídelních discích se pak vliv AdoR na aktivaci JAK-STAT nepotvrdil, alespoň ne za neinfekčních podmínek. Otázky k této části:

4. Proč FLP-FRT systém mitotické rekombinace ve svalech nefunguje?
5. Jaké jiné (minimálně dvě) experimentální možnosti se místo této metody nabízejí?

K formální úrovni práce mám dvě obecné kritické poznámky, týkající se celého textu:

Jako celek text chválím za jeho logické členění, stručnost a jasnost vyjadřování. Na druhou stranu je těžké přetpět brutální hrubky, z nichž vybírám jen pár příkladů: primery detekovali (str. 38), disky se používali (str. 42), pokusy selhali (str. 49), larvy mohli (str. 52)...atd. Svět se rychle mění, ale shoda přísudku s podmětem zatím ještě platí.

Problémem je zápis genotypů, kdy autor pro funkční alelu používá *AdoR* a pro mutantní alelu *adoR*. Tento styl je matoucí a nestandardní (velká písmena v kurzívě podle konvence u drosofilů označují dominanci). Zápis měl být *adoR* pro mutantní alelu a *adoR*⁺ pro jakoukoli funkční alelu. Tento styl také umožňuje rozlišit genotypy klonů (např. *adoR*^{+/-} vs. *adoR*^{-/-}).

Závěr. Přes uvedené dílčí nedostatky považuji tuto bakalářskou práci za vynikající. Autor prokázal schopnost samostatně uvažovat a interpretovat výsledky vlastní i z literatury. Naučil se řadu náročných metod a osvojil si logiku práce s genetickým modelem *Drosophila*. Ve své práci testoval zajímavou hypotézu a získal validní, ač negativní výsledky, když vyloučil autonomní požadavek na funkci AdoR v krevních imunitních buňkách. Jeho zavedení dvou markerů pro určení genotypu a kvantifikaci hemocytů/lamelocytů považuji za velmi elegantní přístup. Autor prokázal kreativitu, pracovitost, vytrvalost, a schopnost samostatného kritického úsudku. Proto doporučuji, aby byla jeho práce (po úspěšné obhajobě) hodnocena nejlepší známkou.

Marek Jindra

