



KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENETIKY

Přírodovědecká fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Branišovská 31, 37005 České Budějovice

RNDr. Alena Krejci, Ph.D., Laboratory of developmental biology

12. ledna, 2018

Posudek na magisterskou práci Bc. Heleny Šokčevičové

Helena Šokčevičová si za cíl své magisterské práce předsevzala ambiciózní projekt, který řeší velmi zajímavé a originální vědecké téma, a to roli Impl2 genu při imunitní odpovědi *Drosophily*. Protože o tomto tématu není doposud prakticky nic známo, a to ani v savčích modelech, výsledky získané během této magisterské práce jsou v jistém smyslu průkopnické a otevřely dveře k širšímu výzkumu tohoto tématu. Množství a kvalita dat naznačuje, že pokud by Helena byla do výzkumu zapojena ještě o pár měsíců déle, výsledkem by zřejmě byla publikace v dobré vědeckém časopise, což u magisterských prací nebývá pravidlem. Odráží to jistě nejen její vědecké kvality, ale i dobrou péči jejího školitele.

V úvodu Helena výstižně shrnula současný model našeho chápání mechanismu imunitní odpovědi u *Drosophily* a dosavadní znalosti o roli Impl2 genu během různých stresových situací. Je z něho patrné, že nečerpala informace pouze z již publikovaných review, ale že si je vědoma i relevantních čerstvě publikovaných vědeckých prací. Z literárního úvodu pak srozumitelně vyplývá, že Impl2 gen je výborným kandidátem pro signální molekulu zapojenou do zprostředkování systemické metabolické odpovědi během infekce. Cílem magisterské práce bylo zjistit, zda se Impl2 gen exprimuje v imunitních buňkách během bakteriální infekce a jakou roli hraje během metabolických změn doprovázejících imunitní reakci.

Práce je metodicky velice bohatá a zahrnuje nejen zvládnutí genetického křížení *Drosophil*, ale i poměrně složité metody jako infekce dospělců a vyhodnocování úspěšnosti imunitní odpovědi, měření metabolitů, sortování buněk pomocí FACS, RT-PCR analýzu a chill-coma recovery esej. Z výsledků práce vyplývá, že během imunitní odpovědi narůstá exprese Impl2 v imunitních buňkách a bez této exprese Impl2 organismus mnohem hůře odolává bakteriální infekci. Výsledky jsou postavené na několika nezávislých opakování experimentů a na velkém množství jedinců a reprezentují tedy solidní data, která lze publikovat bez nutnosti dalšího opakování. Celkový dojem mírně kazí jen některé nedostatky týkající se nekompletnosti popisu experimentálních výsledků a některých metod, viz níže, ale vzhledem k množství prezentovaných výsledků postavených

na obrovském množství dat to myslím až tolik neubírá na kvalitě celé práce. Poměrně silnou stránkou je i diskuze, která dává výsledky do kontextu s literaturou a navrhuje alternativní hypotézy vysvětlující získaná data. Škoda jen, že práce není napsaná v angličtině (i když samozřejmě rozumím, že to není studijní povinnost).

Shrnutí připomínek k formální části práce (asi není potřeba rozebírat během obhajoby):

- z popisu výsledků u kapitol 4.1 a 4.2 není patrné, jaké mouchy byly kříženy do experimentu a jaký genotyp měly kontroly
- graf 7 je prakticky nečitelný, protože černá a temně modrá barva odlišující jednotlivé genotypy je po tisku velmi těžko odlišitelná
- v popise genotypu grafu 9 autorka jistě myslí HmlGal4 Gal80^{ts} x Impl2-RNAi (nikoliv HmlGal4 Gal80 x Impl2, což by značilo overexpresi Impl2, ale k tomu ještě blokovanou Gal80 stabilním proteinem).
- popis metodiky je v některých případech podle mého názoru příliš stručný, např. u analýzy exprese mRNA chybí popis metodiky vyhodnocování signálu přes real time PCR (kalibrační přímka nebo Ct hodnoty...), stejně tak popis měření metabolitů není dostatečný k reproducibilitě měření cizím člověkem, u popisu FACS by měly být uvedeny parametry nastavení sorteru během analýzy atd.

Metodicky se podle mého názoru jedná o velmi silnou práci, které nelze nic podstatného vytknout. Část mých dotazů tedy směřuje spíše k interpretaci prezentovaných dat:

- Je exprese Impl2 genu u Impl2-Gal4, UAS-GFP patrná také v jiných tkáních, například v tukovém tělese či mozku po infekci (Obr.3)? Jakým experimentem (křížením nebo FACS/mRNA analýzou) by šlo dokázat, že červěně svítící buňky jsou opravdu hemocyty?

- Je zajímavé, že hemocyty vykazují expresi Impl2 už ve stavu před infekcí; jakou roli má asi Impl2 v neinfikovaném stavu, když přitom koncentrace glukózy ani glykogenu se v neinfikovaném stavu po Impl2-RNAi nezmění (graf.7 a 8)? Tyto výsledky spíše naznačují, že Impl2 v neinfikovaném stavu neblokuje insulinovou signalizaci, případně že v neinfikovaném stavu je funkce Impl2 proteinu něčím blokována. Nabízí publikovaná literatura nějaké vysvětlení?

Zajímavé by bylo diskutovat širší kontext navrženého modelu funkce Impl2 genu a zodpovědět některé z následujících dotazů (dle vlastního uvážení si může Helena vybrat):

- Insulinová resistance během imunitní odpovědi má své logické zdůvodnění, pokud má zajistit dostatek cirkulující glukózy pro imunitní buňky. Tento model ale předpokládá, že imunitní buňky budou k mechanismu Impl2 rezistentní, tedy že narozdíl od okolních tkání budou za přítomnosti Impl2 přijímat velké množství glukózy. Ví se něco o tom, jak je tato metabolická exkluzivita imunitních buněk zaručena?

- Z literatury Helena cituje, že Impl2 gen se váže na dILP2. Existuje ale osm dILP proteinu, z nichž se většina může vázat na insulinový receptor. Je známo místo interakce Impl2 s dILP2 a lze tedy na základě homologie vytušit, zda se Impl2 může vázat i na ostatní dILP proteiny, jak to předpokládá mechanismus vzniku insulinové resistance?
- Z předchozí práce A.Bajgara a T.Doležala vyplývá, že adenosin má během infekce velice podobnou roli jako Impl2. Jedná se o dva paralelní mechanismy anebo existuje vzájemný regulační vztah mezi Ado a Impl2 (například že uvolnění adenosinu stimuluje uvolnění Impl2 a právě ten je zodpovědný z všechny následné metabolické efekty)? Jakým způsobem by se tato hypotéza dala potvrdit nebo vyvrátit?

Práci považuji celkově za velmi zdařilou a bez váhání navrhuji hodnocení stupněm výborně.

Alen Krýž



BIOLOGY CENTRE CAS

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ24 0800 0000 0000 0606 3942 | SWIFT CODE – GIBACZPX | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Posudek na magisterskou práci Bc. Heleny Šokčevičové nazvanou Role genu *Impl2* v regulaci imunitní odpovědi na bakteriální infekci u *Drosophila melanogaster*.

Mezi základní poznatky předkládané práce patří:

1. Exprese genu *Impl2* probíhá v hemocytech a je zvýšena při laboratorní infekci bakterií *Streptococcus pneumoniae*.
2. RNAi genu *Impl2* vedla ke zvýšené (rychlejší) úmrtnosti dospělých drosophil, jenž byly vystaveny infekci streptokokem.
3. Jelikož rozdíl v počtu kolonií bakterií v RNAi indukované a neindukované mouše nebyl výrazný a statisticky signifikantní, tak tento výsledek naznačuje, že gen *Impl2* nehraje roli v rezistenci mouchy na infekci, ale spíše v nižší toleranci mouchy na náročnost samotné imunitní odpovědi.
4. V případě, že exprese genu *Impl2* je potlačena RNAi, nedochází k nárustu volné cirkulující glukózy v reakci na bakteriální infekci. Zároveň však nedochází k nárustu hladin glykogenu, tudíž se nezdá, že by *Impl2* hrál roli v metabolické přeměně glykogenu na glukózu.
5. Drosophily s utlumenou expresí genu *Impl2* v hemocytech se probouzely dříve po chladem indukovaným kómatem než kontrolní mouchy.

Celkově je práce napsaná velice čtivě a přehledně i pro nedrosophilího čtenáře. Velice oceňuji dobře napsaný úvod, který i přes značnou komplexnost probíraného tématu popisuje pouze mechanismy, které jsou důležité pro pochopení výsledků a čtenář tak není ztracen. Na závěr výsledků oceňuji přehledně napsané hypotézy, jak by mohly být testovány a kam by při určitém výsledku vedly. Výsledky a diskuze jsou také napsány velice dobře, metodika mohla být sepsána více podrobně. V práci se vyskytují drobné nedostatky formálního charakteru, ale to nemění nic na celkovém pozitivním hodnocení předložené práce.

Dle mého názoru práce splňuje všechny požadavky předkládané Přírodovědeckou fakultou JU a doporučuji ji k obhajobě s navrženým hodnocením výborně.

V Českých Budějovicích, 12.1.2018



Alena Zíková



Otázky:

Zcela obecná otázka, která mne napadla při grafickém znázornění, že volně cirkulující glukóza je zvýšena po infekci streptokokem. Je možné, že tato glukóza pomáhá úspěšnosti bakteriální infekci? Jaké metabolity, jaký zdroj energie streptokok využívá pro svůj růst? Pokud je to glukóza, nebylo by logické, že by mohlo dojít k útlumu bakteriální infekce při snížení exprese genu *Impl2* pomocí RNAi i z toho důvodu, že bakterie nemá dost živin?

Strana 18 a 53, cituji: “drozofily se do poslední chvíle snaží investovat energii především do udržení membránového potenciálu buněk”

Další obecná otázka. Proč a jak k tomu dochází? Je na mysli membránový potenciál na plasmatické membráně, či mitochondriální? Jak je(jsou) tyto potenciály udržovány, jaký typ “energie” je nutný a proč je tento faktor tak důležitý?

Strana 14 – proč je třeba katalázy k inkubaci a promytí?

Strana 28 – existuje studie, která by ukázala, že exprese ribosomálního proteinu 49 je ve všech drozophilních buňkách stejná? Existují další geny, které by bylo vhodné použít jako kontrolu pro qPCR data?

Strana 31 – pro nedrosophilního člověka se okamžitě objeví otázka, jak jste si jista, že červeně svítící místa jsou hemocyty? Bylo by možné nějakým způsobem udělat kolokalizace a pokud ano, jak. Existuje marker typický pouze pro hemocyty? Bylo by možné exprimovat GFP pod promotorem specifickým pro hemocyty?

Strana 34 – pomocí S3 sorteru jste vytrídila hemocyty. Jaká byla úspěšnost a čistota sortingu? Kolik hemocytů má průměrně jedna drosophila, roste jejich počet po infekci?

Jak byla standardizována data pro graf 3? Stejná koncentrace RNA?

Strana 34 – tvrzení, že k expresi genu *Impl2* dochází především v hemocytech je dle mého názoru předčasné, jelikož nebyly testovány žádné další typy buněk.

Strana 44 - cituji: “Z výsledků souhrně vyplývá, že k produkci genu *Impl2* dochází v hemocytech, a že tato produkce narůstá během bakteriální infekce nejen v celém těle drozofily, ale i specificky v imunitních buňkách.” Abych pravdu řekla, tak tomuto moc nerozumím. Myslí tím autorka, že k expresi *Impl2* dochází ve všech buňkách – neodporuje si to s obrázkem 3? Které data toto tvrzení podporují? Které další imunitní buňky má autorka na mysli?

Otázky a postřehy hlavně pro studenta, netřeba reakce na obhajobě:

Strana 13: “sledování genotypických projevů” – nemělo by být fenotypických?

Strana 13: “před objevením principu RNAi se přímá genetika musela spoléhat na mutace vznikající přirozeně” – s tímto konstatováním si dovolím nesouhlasit, to neexistovaly “knock-out” a “conditional knock-out” strategie?

Strana 20: přečtěte si cíl 4 ☺, chybí něco?

Strana 24, vypadl Celsius

Strana 29 – elongace probíhá dle mého názoru při 72°C