

Posudek diplomové práce Bc. Nikolý Kaislerové:

Úloha Adenylát kinázy 1 v aktivaci a metabolismu imunitních buněk larev *Drosophila melanogaster*

Předložená diplomová práce se zabývá rolí enzymu Adenylát kináza 1, který je sice poměrně dost prostudovaným enzymem u člověka a obratlovců obecně, o hmyzím analog, resp. konkrétně u octomilky *Drosophila melanogaster* toho víme však až překvapivě málo. Jako modelový organismus sloužila právě zmíněná *Drosophila*, pomocí molekulárně biologických metod RNAi byla vytvořena linie s redukovanou expresí Ak1 a za pomoci infekce parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* byl na několika úrovních studován vliv absence tohoto enzymu.

Předložená práce má 38 stran samotného textu, tvrzení jsou silně podložena více než dostatečným množstvím citací. K úvodu nemám v podstatě žádné výtky, autorka se již od počátku drží tématu, text je členěn na přehledné kapitoly. Autorka stručně a výstižně popisuje imunitní systém u drosofil, procesy hematopoézy, typ imunity i molekulárně-fyziologické procesy, které při aktivaci a následném průběhu imunitní reakci nastávají, velmi podrobně nakonec popisuje mechanismus exprese Adenylát kinázy jak u obratlovců, tak i přímo u *Drosophily*.

Cíle práce jsou stručně a jasně popsány. Metodická část je srozumitelná a dostatečně detailní. Výsledky práce jsou popsány také výstižně a jasně, grafy jsou jednoduše zobrazené a přehledné. V diskuzi autorka rozebírá výsledky své práce a zdařile je přirovnává k již dostupným zjištěním z literatury v oboru, zároveň poukazuje na možnost provedení navazujících experimentů (konkrétně se týkající zatím ne zcela objasněných možných kompenzačních mechanismů za chybějící Ak1 u RNAi linie). V závěru autorka potvrzuje, že cíle práce byly splněny – tedy zejména umlčení Ak1, následně prokázání vlivu Ak1 deficiencie na imunitní odpověď, na schopnost přežití po infekci, na hladiny adeninových metabolitů. Zároveň nebyla nalezena žádná potenciální kompenzace za chybějící Ak1.

Komentáře a otázky:

Q1: Již v samotném úvodu uvádíte, že oproti OXPHOS je glykolýza je sice rychlá ale poskytuje podstatně méně ATP. Z jedné molekuly glukózy činí celkový výtěžek pouze 2 molekuly ATP. Pokud jsem schéma pochopil, na úplně posledním schématu v diskuzi (Obr. 10) máte znázorněno propojení této reakce s odbouráváním AMP pomocí právě studovaného enzymu Ak, podle tohoto schématu mi připadá že jednu molekulu ATP je předem již potřeba investovat, takže celkový výtěžek ATP je poloviční – tedy jedna molekula ATP. Skutečně je pro imunitní systém výhodné spoléhat se na glykolýzu i s tak malým výtěžkem? Případně, pokud jsem to nesprávně pochopil, jak je to se stechiometrií těchto metabolických drah?

Q2: Na str. 7 uvádíte, že po naklazení vajíčka dochází k aktivaci imunitního systému již samotným porušením kutikuly – je tomu skutečně tak? Musí dojít přímo k naklazení vajíčka nebo postačí ke spuštění imunitní reakce např. vpíchnutí nějaké neinvazivní látky? Pokud je tedy imunitní odpověď již nastartovaná jen vpíchnutím, nebylo by žádoucí v designu experimentu buď nahradit kontrolní (tedy neinfikovanou) skupinu skupinou kde se jen simuluje napadení parazitoidem, případně přidat tuto skupinu jako další kontrolu?

Q3: Ve výsledcích v části „Ověření efektivity RNA interference“ uvádíte míru poklesu v exprese Ak1 ve skupině křížení Srp > control – křížení 1666 × 1498. Vidím tedy, že je zde asi 80% pokles v expresi mRNA tohoto genu. Předpokládám tedy, že nějaká aktivita Ak1 sále zůstává a není úplně zanedbatelná. Je nějaký způsob, jak dosáhnout úplné, tedy 100% suprese Ak1, a pokud ano, myslíte si že by tato varianta nebyla letální? Myslíte, že by 100% suprese exprese Ak1 by mohla vést k vyšším rozdílům v přežívání po infekci? (viz Obr. 7 ve výsledcích).

Q4: V grafu na Obr. 6 vidím poměrně dost značný rozptyl v počtu lamelocytů jak u kontrolních, tak u RNAi jedinců. Jak lze tuto variabilitu vysvětlit? Je počet lamelocytů skutečně tak rozdílný, případně je metoda počítání buněk dostatečně spolehlivá?

Shrnutí

Předložená práce jasně ukazuje, že autorka zvládla všechny potřebné metody a dosáhla vytýčených cílů. Diplomovou práci Bc. Nikoly Kaislerové hodnotím velmi kladně a **doporučuji ji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích 18. 5. 2022

Mgr. Tomáš Štětina, Ph.D.