

Posudek na doktorskou disertační práci MSc. Seiya Asai

Studium zásobních forem insulinu v sekrečních granulích β -buněk pankreatu

Targeting insulin storage forms in pancreatic β -cell secretory granules

Disertační práce s názvem „Studium zásobních forem insulinu v sekrečních granulích β -buněk pankreatu“ byla vypracována na Ústav organické chemie a biochemie AV ČR pod vedením RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. Tématem práce je komplexní výzkum produkce, skladování a sekrece insulinu buňkami pankreatu, dále vliv vybraných bioaktivních látek na jeho sekreci a také vypracování a optimalizace nové metodiky pro stanovení koncentrace insulinu v biologických vzorcích. Práce zahrnuje čtyři publikace, z nichž dvě jsou prvoautorské (Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, IF 4,5; Open Biology, 2022, IF 7,0). Téma je s ohledem na zásadní roli insulinu v těle stále velmi aktuální a zajímavé.

Práce je psána anglicky a čítá 108 stran plus čtyři přiložené publikace. Autor nejprve čtenáře na třiceti stránkách seznamuje se spletitou problematikou onemocnění *Diabetes Mellitus*, zaměřuje se na buňky produkující insulin a na samotný insulin z pohledu struktury a funkce. Následuje přehled biologických modelů pro studium sekrece insulinu a zevrubný přehled vybraných bioaktivních látek, které jeho sekreci modulují. Text je psaný velmi čtivě a jeho struktura přehledně a logicky propojuje zaměření jednotlivých publikací, které jsou k práci přiloženy.

Velmi kladně hodnotím komentovaný výtah z přiložených publikací, který čtenáře provází nejdůležitějšími dosaženými výsledky. Se svými 217 citacemi je text velmi bohatý na informace a předává čtenáři podrobný teoretický základ pro pochopení přiložených publikací. Disertace obsahuje velké množství zatím nepublikovaných výsledků ohledně účinků osteokalcinu a jeho fragmentů na β -buňky a účinků tryptofanu a jeho metabolitů na sekreci insulinu.

Několik výtek bych měl k formální stránce teoretického úvodu. Text obsahuje nemalé množství překlepů a chyb. Úprava např. v seznamu zkratk nebo v popiskách obrázků je nekonzistentní. Matoucí jsou odkazy na obrázky, které se např. u obrázku 1-2 nachází o dvě stránky (a kapitoly) dále. Více pozornosti pak mohlo být věnováno převzatým obrázkům, které zde mají velmi nízkou kvalitu, přestože z původních zdrojů jsou dostupné ve vysokém rozlišení. Podobně se v převzatých popiskách objevují chyby, například v obrázku 1-1 jsou „insulin immunoreactive cells“ značeny červeně, nikoliv modře.

Kontrola plagiátorství systémem Turnitin vyšla s výsledkem shody 53 %, jde ovšem o shodu v oblastech, kde ji lze očekávat; především tedy u přiložených publikací, v seznamu citací a částech společných pro závěrečné práce, v menší míře v popiscích převzatých obrázků. Práci tedy považuji za originální.

K předkládané práci mám několik dotazů, spíše námětů k diskusi:

1. V práci zmiňujete, že jste zkoušeli vyřešit strukturu insulinových krystalů pomocí rentgenostrukturní analýzy, ovšem nezískali jste difrakční data. Uvažovali jste o použití lépe fokusovaných zdrojů, např. XFEL? Hypoteticky by bylo možné získat strukturu krystalizovaného insulinu v sekrečních granulích přímo z buněk. Mohla by overexprese a *in vivo* krystalizace být vhodná pro získání krystalického insulinu například v lidských buněčných liniích, jaká zde vidíte omezení?

2. V práci jste nastínil řadu nevýhod RIA a ELISA testů, které jsou běžně dostupné. Vzhledem k tomu, že testy na stanovení koncentrace insulinu v krvi představují důležitý diagnostický nástroj, vidíte možnost, jak by se vaše inovace mohla prosadit mezi zavedenou metodikou? Skutečně nezvažujete komercializaci testu?
3. Kromě již publikovaných látek, osteokalcinu a metabolitů tryptofanu, zvažujete nějaké další kandidáty pro testování vlivu na sekreci insulinu?
4. Ohledně nepříliš úspěšné produkce dimerního IGF-1, podařilo se vám úspěšně produkovat monomerní formu? Jaké strategie byste navrhl pro zlepšení výtěžku správně sbaleného dimeru IGF-1?

Předkládaná disertační práce je, dle mého názoru, velmi zdařilá a jasně demonstruje autorovy tvůrčí schopnosti a erudici v dané oblasti výzkumu. Disertační práci proto doporučuji k obhajobě a k přijetí jako podkladu pro udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 14. září 2023

Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

Katedra biochemie, PŘF UK

Evaluation of the doctoral thesis written by MSc. Seiya Asai

Targeting insulin storage forms in pancreatic β -cell secretory granules

The dissertation thesis entitled "Targeting insulin storage forms in pancreatic β -cell secretory granules" was prepared at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS under the supervision of RNDr. Jiří Jiráček, CSc. The topic of the thesis is comprehensive research of expression, storage, and secretion of insulin by pancreatic cells, as well as the influence of selected bioactive molecules on its secretion and the development and optimization of a new methodology for the determination of insulin concentration in biological samples. The work includes four publications, two of which are first-authored (Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, IF 4.5 ; Open Biology, 2022, IF 7.0). The topic is still very relevant and interesting with regard to the essential role of insulin in the body.

The thesis is written in English and contains 108 pages plus four appended publications. On the first thirty pages, the author introduces the reader to the intricacies of *Diabetes Mellitus*, focusing on the cells that produce insulin and on insulin itself in terms of its structure and function. This is followed by an overview of biological models for the study of insulin secretion and a comprehensive review of the selected bioactive substances that modulate insulin secretion. The text is very readable, and its structure clearly and logically links the focus of the various publications that accompany the thesis.

I very much appreciate the commentary on the attached publications, which guides the reader through the most important results obtained. With 217 citations, the text is rich in information and conveys a detailed theoretical basis for understanding the attached publications. The dissertation contains many previously unpublished results regarding the effects of osteocalcin and its fragments on β -cells and the effects of tryptophan and its metabolites on insulin secretion.

I would have a few criticisms of the formality of the theoretical introduction. The text contains a considerable number of typos and errors. The editing, for example, in the list of abbreviations or in the description of the figures, is inconsistent. The references to figures are confusing, e.g., for Figure 1-2 the reference is two pages (and chapters) before the figure. More attention could have been paid to the images, which are of poor quality, even though they are available in high resolution from the original sources. Similarly, there are errors in the adopted figure descriptions; for example, in Figure 1-1, "insulin immunoreactive cells" are labeled in red, not blue.

The Turnitin plagiarism check resulted in a 53% match rate, but this is in the areas where it might be expected: mainly in the attached publications, in the list of references, and in the parts common to the thesis, to a lesser extent in the descriptions of the figures. I, therefore, consider the work to be original.

I have a few questions, or rather topics for discussion, about the present thesis:

1. In the thesis, you mention that you tried to solve the structure of insulin crystals by X-ray structural analysis, but you did not obtain any diffraction data. Have you considered using better-focused sources, e.g., XFEL? Hypothetically, it would be possible to obtain the structure of crystallized insulin in secretory granules directly from cells. Could overexpression and *in vivo* crystallization methods be suitable for obtaining crystalline insulin in, e.g., human cell lines? What limitations do you see here?

2. In your thesis, you outlined several disadvantages of RIA and ELISA assays that are commonly available. Given that blood insulin concentration assays are an essential diagnostic tool, do you see an opportunity for your innovation to apply among the established methodologies? Are you really not considering commercializing the test?
3. Besides the already published compounds, osteocalcin, and tryptophan metabolites, are you considering any other candidates for testing the effect on insulin secretion?
4. Regarding the not-so-successful production of dimeric IGF-1, have you successfully produced a monomeric form? What strategies would you suggest to improve the yield of properly folded dimeric IGF-1?

The present dissertation is, in my opinion, very successful and demonstrates the author's creative abilities and erudition in this area of research. Therefore, I recommend the dissertation for defense and acceptance as a basis for the Ph.D. degree.

Prague, September 14, 2023

Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.
Dpt. of Biochemistry, Faculty of Science
Charles University