

Oponentský posudek

na disertační práci Mgr. Jana Stehlika: *Circadian rhythms and photoperiodism*.

Mgr. Jan Stehlik předkládá práci, která je výsledkem jeho badatelské aktivity v oblasti pravidelných denních a sezónních oscilací životních dějů živočichů. Výzkum molekulárních principů těchto oscilací je téma relativně mladé, rychle se rozvíjející a udržet špičkovou kvalitu práce na mezinárodní úrovni je nepochybně intelektuálně i technicky velmi náročné. Nutno říci, že tým, kterého se stal disertant členem, nálepku špičkové kvality právem má.

Práce je celá psána v anglickém jazyce a začíná přehledem problematiky a výzkumných cílů vycházejícím z úctyhodného souboru literárních zdrojů.

Pozornost oponenta pak rychle sklouzne na publikace, jichž je disertant autorem. Jsou to již publikovaný časopise *Genetics* přetištěný v originále, kde je Mgr. Stehlik členem autorského kolektivu, a další rukopis v tisku v časopise *Journal of Biological Rhythms*, jehož je disertant hlavním autorem. Ke kvalitě textu samotného a výzkumné práce, které se stala základem již přijatých článků, mi nepřísluší se dlouze vyjadřovat, jistě bych to nesvedl kompetentněji než recenzenti obou – na danou problematiku specializovaných – časopisů. Po zevrubném přečtení článků mohu konstatovat tolik, že autor nepochybně zvládá náročné techniky současné špičkové biologické vědy, že je dokáže smysluplně interpretovat a prezentovat.

Otázky, na které obě práce hledají odpovědi jsou velmi zajímavé a závažné z hlediska obecně biologického poznání. Srovnávací přístup použitý autorem při hledání oscilací genů u *Musca domestica* vytypovaných podle situace u octomilky bývá někdy - pouze jednu stopu sledujícími badateli - opomíjen. Přitom může poskytnout celistvý pohled na evoluci dané funkce a dává odpověď na otázku po jejím smyslu a logice. Druhá otázka po spojitosti mezi vnitřními hodinami a vnitřním kalendářem (fotoperiodickými hodinami) je rovněž obecně velmi zajímavá. Výsledky získané a publikované autorem přispívají k posunu poznání v obou oblastech.

Zaměřím-li pozornost na úvodní text, které je zřejmě výhradním dílem disertanta, mohu konstatovat, že kvalitní angličtinou srozumitelně a s využitím širokého literárního základu uvádí do náročné problematiky. Cením si toho, že autor umí svou práci představit i v širším kontextu, stejně jako navrhnout další směry výzkumu (v závěrečném Shrnutí).

K formální jazykové, typografické stránce nebo ke členění nemám žádné vážnější námítky.

Připomínky a dotazy:

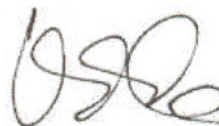
Str. 47: Prosím o vysvětlení: Z argumentace prvního celého odstavce mi není jasné, proč se autor zaměřil právě na *tim* gen jako na kandidáta propojení cirkadiálních a fotoperiodických hodin. Proč ne také na *period* gen? Oscilace mRNA u *npd* mutantů zmizely přece jak u *timeless* tak u *period*.

Str. 9.: K uvedené otázce zda je „negative feedback oscillator“ model spíše výjimkou než pravidlem bych jen podotkl, že se domnívám, že jakékoli (nejen biologické) oscilace a tedy i jakékoli rytmy jsou založeny na negativní zpětné vazbě. Negative feedback oscillator by tedy byl univerzální a obecně stále platný termín.

Např. str.3, 4: Malá formální chyba: Pořadí vícečetných citovaných referencí v textu. Většinou jsou v závorkách uvedeny chronologicky od nejstarší, ale ne vždy.

Celkové hodnocení: Disertant zpracoval náročné téma velmi dobře a dokázal tím své teoretické i praktické schopnosti k vědecké práci. Jsem přesvědčen, že rozsah a kvalita práce plně odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci a **doporučuji ji k obhajobě.**

V Brně, 9.4.2008



RNDr. Martin Vácha, PhD

oponent

Posudek disertační práce doktoranda Mgr. Jana Stehlíka na téma „Circadian rhythms and photoperiodism in insects”

Oponent: PharmDr. Alena Sumová, CSc., Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Praha

Ve své disertační práci se Mgr. Jan Stehlík věnoval velmi aktuálnímu tématu, které souvisí s mechanismem časové regulace fyziologických dějů u hmyzu. Specifickými cíly bylo objasnění molekulárního mechanismu, který řídí cirkadiánní rytmy u *Musca domestica* včetně jeho srovnání s mechanismy dříve popsány u *Drosophila melanogaster* a zkoumání úlohy regulace genu *timeless* při mechanismu fotoperiodické indukce diapauzy u larev *Chymomyza costata*. Řešení těchto otázek přineslo řadu zásadních výsledků, které jsou součástí 2 primárních publikací a o jejichž kvalitě není pochyb vzhledem k výši Impact faktorů obou časopisů (IF 4,242 a 4,633).

Podíl práce Mgr. Stehlíka na přípravě obou publikací byl bezesporu významný. V případě publikace Codd et al., *Genetics* 177: 1539-1551, 2007 se podílel na klonování a sekvenování 6 homologů hodinových genů *Musca domestica* a prováděl stanovení hladin jejich transkriptů pomocí Real-Time RT PCR. V případě druhé publikace, která je v současnosti ve stádiu manuskriptu přijatého do tisku v *J. Biol. Rhythms*, je jeho zásadní podíl zřejmý již z toho, že je prvním autorem práce. Vzhledem k tomu, že obě práce prošly náročným recenzním řízením, nemám k odborné stránce disertační práce žádné námítky ani připomínky.

Po stránce formální je práce složena z úvodu, ve kterém je shrnut současný stav poznatků vztahujících se k předmětu disertace (12 stran) s relevantními literárními odkazy (14 stran), z kopií obou publikací, ve kterých jsou a nebo v brzké době budou výsledky disertace zveřejněny a dále ze souhrnu (8 stran), ve kterém je pro každou z prací samostatně uveden komentář k výsledkům, závěr a výhled do budoucna. Závěrečnou kapitolou je příloha s abstrakty ze 2 konferencí, jichž se Mgr. Stehlík účastnil. Pokud bych se měla vyjádřit k obsahové stránce, mám několik poznámek, týkajících se především části úvodu. Tato kapitola je koncipována dosti obecně se snahou shrnout informace o mechanismem cirkadiánní (kapitola Circadian rhythms) a fotoperiodické (kapitola Photoperiodism and diapause) regulace u různých živočišných druhů. Vzhledem k omezenému rozsahu této kapitoly by bylo podle mého názoru vhodnější zaměřit se hlouběji na tyto otázky specificky u

hmyzu. Například vzhledem k tématu disertace postrádám podrobnější souhrn základních informací o struktuře cirkadiálního systému u různých druhů hmyzu. Také současný pohled na model jak fungují cirkadiální hodiny na molekulární úrovni u hmyzu je popsán až příliš stručně. Snaha o shrnutí informací napříč živočišnou a rostlinnou říší nutně vedla k značné simplifikaci a tím i k jistým nepřesnostem. Na příklad:

- Tvrzení na str. 2, že „*every circadian system consists of three parts...*“ s odkazem na práci Klein et al., 1991, je pro savčí cirkadiální systém dnes již nepřesné. Savčí cirkadiální systém je v současnosti vnímán jako síť oscilátorů, které jsou hierarchicky uspořádány tak, že centrální hodiny v suprachiasmatických jádrech koordinují fázi periferních hodin uložených téměř ve všech tkáních těla. I když je jednoduché schéma „input – oscillator – output“ již poněkud překonané z hlediska savčího cirkadiálního systému, může naopak vyhovovat v případě, kdy jsou všechny oscilátory v těle fotoreceptivní a tedy více méně rovnocenné.
- Tvrzení na str. 5, že „*circadian rhythms are found in virtually all studied organisms*“ je nepřesné, protože cirkadiální rytmy nebyly i přes velkou snahu doposud popsány např. u kvasinek.
- Formulace týkající se rytmu ve spánku a bdění u hlodavců a dalších savců na str. 5 „*most of them sleep at night, but rats and hamsters sleep mostly during the day*“ je zavádějící, protože ji lze chápat tak, že potkan a křeček, jakožto noční živočichové, jsou vlastně výjimkou mezi jinak převážně denními hlodavci. Ve skutečnosti je podíl nočních a denních hlodavců spíše vyrovnaný. Také tvrzení „*...some of them lower their temperature during sleep*“ je nepřesné, protože denní rytmus v tělesné teplotě s nižšími hodnotami ve spánku byl popsán u všech savců včetně člověka.
- V odstavci na str. 6 týkajícím se poruch spánku v důsledku tzv. cirkadiálního stresu“ způsobeného směnným provozem je uvedeno: „*...these people may also eventually develop some of the several chronic sleep-wake syndromes and mood disorders...for example FASP...*“. FASP je ale dědičná genetická porucha spíše než následek práce na směny.
- Věta na str. 11 „*The presence or absence of photoperiodism in humans has not been established*“ není přesná, protože studie ukázaly, že fotoperioda ovlivňuje dokonce dnešního člověka a to zvláště v případě, pokud žije mimo urbanistickou společnost a přirozené synchronizátory nejsou zastíněny (např. Roenneberg and Aschoff, J. Biol. Rhythms 5: 195-216, 1990, Roenneberg and Aschoff, J. Biol. Rhythms 5: 217-240,

1990, Roenneberg, J. Biol Rhythms 19: 193-195, 2004, Vondrašová-Jelínková et al.,
Brain Res. 816(1):249-53, 1995).

Tyto drobné nepřesnosti však v žádném případě nemohou ovlivnit hodnocení odborné kvality práce, která je mimořádně vysoká a je dobrým předpokladem budoucí úspěšné vědecké kariéry Mgr. Stehlíka. Doporučuji proto jeho disertační práci k obhájení.

V Praze dne 21.3.2008

PharmDr. Alena Sumová, CSc.





Report on Ph.D. thesis for the Degree of Doctor of Philosophy entitled:
“Circadian Rhythms and Photoperiodism in Insects”

Thesis submitted to the University of South Bohemia, Faculty of Science,
by Jan Stehlik

General Summary of work presented and Comments

The thesis deals with molecular and behavioural features of the endogenous circadian and photoperiodic clocks in two insect species, the housefly *Musca domestica* and the drosophilid *Chymomyza costata*.

Circadian rhythms are a basic property of living systems, that impose a 24 h temporal organization of behavioral and metabolic activities in many higher and some lower organisms. These rhythms are determined by endogenous oscillators that can be entrained by environmental stimuli. Seasonal phenotypes, such as diapause in insects, are also controlled by endogenous oscillators. While we know very little about the molecular organization of the seasonal clocks, the genetic and molecular dissection of the endogenous circadian, 24 hour clock has made considerable progress since the molecular identification of the first clock gene in *Drosophila* in 1984. Understanding how the clock works, represents a major effort for several hundred research groups throughout the world, because of its enormous implications for human and animal health and well-being. Although much progress have been made in the studies of the circadian clock in the model organism *Drosophila melanogaster*, the studies of circadian clock in other insects lags behind, largely due to the lack of genetic tools and good reagents, in particular efficient antibodies.

The thesis presented by Jan Stehlik attempts to answer some of the fundamental questions of the circadian and photoperiodic clocks in non-*Drosophila* insects. The major goals were: (a) to study the anatomical and cellular organization of the circadian oscillator, in the housefly *Musca domestica*, and (b) to investigate on the molecular nature of components of the photoperiodic clock in another dipteran, the drosophilid *Chymomiza costata*.

The thesis represents a well presented, highly articulated research work which has been condensed in an up-to-date progress report on circadian rhythmicity and photoperiodism and diapause, and two scientific articles published in excellent and prestigious journals. The results obtained are well explained and the rationale behind the proposal is set out clearly. It is evident that a great deal of effort has been put into the experimental implementation of the research and in the compilation of this thesis.

In the first article, dealing with the circadian rhythm gene regulation in *M. domestica*, it has been tested if the classical model of the circadian clock, in which the PER and TIM proteins cycle and co-localize in the nucleus of key clock neurons giving rise to a transcriptional negative feedback loop, apply also to *M. domestica*. This model fits in *Drosophila* and, at least for PER, in mammals too. Previous ICC and Western blot studies done in *M. domestica* as well as in other insect species, have shown that PER is only cytoplasmic and doesn't cycle, suggesting that some dipteran exhibit a non-canonical clock.. The study to which Jan Stehlik has significantly contributed, provides, thanks

to an immunofluorescence approach applied to confocal microscopy, a finer level of analysis of PER's localization at subcellular levels, and also in the whole brain. In fact, it turned out that some brain neurons have cytoplasmic PER, but the neurons that likely represent the pacemaker neurons have nuclear PER and TIM, and their projection patterns are similar to those described in *Drosophila*. Consequently, there may be similar clock neuronal organization in the housefly as in *Drosophila*, in spite of the non-cycling of the protein at the Western blot level.

In the second article, dealing with the molecular regulation of the photoperiodic induction of larval diapause in the drosophilid *Chymomyza costata*, he has characterized a mutant strain which does not respond to photoperiodic changes and consequently does not undergoes diapause. By using different approaches like Quantitative-RealTime-PCR, immunohistochemistry and sequencing, it has been suggested that the observed effects on photoperiodic phenotypes could be due to a mutation localized in the 5'-UTR region of the *timeless* clock gene. These results are very important and stimulating as they connect a cardinal component of the insect circadian clock to a fundamental non-circadian function. Moreover, these results propose *C. costata* as an excellent model organism to further analyse the still-unravelling relationships existing between circadian and seasonal time controls.

The overall results and their discussion have already benefited from referees comments prior to publication and I do not have any further criticism or specific comments on the two papers which largely form the thesis. In conclusion, I believe that the data presented, and their discussion thereof, constitute a significant addition to knowledge on the architecture and functions of the circadian biological clock and on photoperiodism in insects, thus pointing the way for future studies.

Final considerations

I think that Jan Stehlik deserves praise for his excellent experimental work and for the clear presentation, analysis and the interpretation of the data, which are sound and lead to quite interesting conclusions. In keeping with the above considerations, I conclude without reservation that the thesis presented by Jan Stehlik be accepted for the Ph.D. degree of the University of South Bohemia.

Padova, 14 April 2008

Rodolfo Costa,
Professor of Genetics,
Department of Biology,
University of Padova,
Italy

