



Oponentský posudek disertační práce s názvem *Insect chronobiology* autorky Aleny Kobelkové

Disertační práce se skládá z 11 stran úvodu včetně referencí, stručného vymezení cílů disertační práce, ze 3 příložených prací a souhrnu. Jedna z těchto prací byla publikována v roce 2009 v časopise *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (IF 3,117), druhá práce byla přijata do tisku v časopise *Journal of Biological Rhythms* (IF 4,418) a třetí práce je předložena ve formě manuskriptu. Celkem je disertační práce zpracována na 88 stranách. Technické zpracování práce je velmi působivé a přehledné. Celá práce je dobře napsána a obsahuje jen minimum překlepů či nepřesných formulací. Alena Kobelková je první autorkou práce v JBR a v připravovaném manuskriptu. Její podíl na již publikované práci není blíže specifikován.

Téma disertační práce je velmi aktuální, řeší otázky molekulárních mechanismů časového systému u hmyzu. Zabývá se přitom nejen vlastním mechanismem, který na molekulární úrovni generuje cirkadiánní signál, ale také mechanismy, jakými se hmyz adaptuje na změny vnějšího prostředí, jako je změna délky dne, neboli fotoperioda. Získané výsledky jsou velmi kvalitní, o čemž svědčí fakt, že velká část těchto výsledků byla publikována v časopisech s velmi dobrým impact faktorem a prošla proto náročným peer review.

Kapitola I se věnuje stručnému úvodu do problematiky disertační práce. Velmi oceňuji, že každá kapitola této úvodní části má přímý vztah k cílům práce a tento vztah je v jejím závěru vždy jasně formulován. Autorka prokázala, že je schopna abstrahovat z obrovského množství informací a shrnout ty nejpodstatnější tak, aby i čtenář, který není expertem na chronobiologii hmyzu, získal přehled o současném stavu znalostí. Zvláště část vysvětlující základní principy molekulárního zpětnovazebního mechanismu „hodinového stroje“ a jeho srovnání u různých druhů hmyzu je velmi dobře zpracována. Cíle práce jsou v závěru této kapitoly přehledně rozděleny podle jednotlivých publikací.

Kapitoly II –IV tvoří hlavní výsledkovou část práce, členěnou podle publikací. Dvě z těchto publikací již prošly recenzním řízením a byly kladně hodnoceny specialisty v oboru. Práce ve formě manuskriptu bude tomuto recenznímu řízení teprve podrobena. Ačkoliv je manuskript prezentován ve formě, která se již blíží finální podobě při odeslání do recenzního řízení, některé části experimentů plánuje autorka ještě dále rozšířit (viz. str. 60). Výsledky jsou zcela unikátní a podávají obraz o cirkadiánním systému *Ephesia kuehniella*, jakožto novém druhu hmyzu vhodném pro výzkum cirkadiánního systému odlišného od *Drosophilla melanogaster*.

Kapitola V – Souhrn stručně shrnuje získané výsledky. Škoda jen, že autorka nevěnovala část textu také shrnutí významu disertační práce jako celku a nenastínila možné

další výhledy, kudy by se měla práce na těchto tématech mohla dále ubírat, případně možnosti potenciálního využití získaných výsledků v praxi.

Další komentář k disertační práci:

Při čtení úvodu disertační práce jsou evokovány některé další otázky, které zde nejsou zahrnuty. Např. co je známo o roli vzájemného působení jednotlivých částí cirkadiálního systému u hmyzu pro jeho vlastní mechanismus – tj. případná úloha interakce mezi neurony? Co je známo o hierarchii cirkadiálního systému – jsou všechny oscilátory rovnocenné (centrální a periferní oscilátory)?

Část úvodu věnovaná fotoperiodismu a jeho regulace je velmi stručná. Zajímalo by mne, co je u hmyzu fotoperiodickým signálem, který spouští diapauzu – je to dosažení určité kritické délky fotoperiody, počet cyklů na této fotoperiodě nebo vlastní proces změny fotoperiody, tj. její zkracování a prodlužování? Má fotoperioda ve všech oscilátorech v mozku stejný vliv na fázi exprese hodinových genů nebo se může tato fáze mezi jednotlivými oscilátory lišit?

K výsledku práce prezentované v manuskriptu mám následující dotaz: Expozice stálému světlu vyrušila rytmus v expresi genů *Per* a *Tim* v hlavě *Ephestia kuehniella* a dalo by se tak říci, že světlo „zastavilo“ hodiny. Do jaké míry by tento výsledek mohl být teoreticky způsoben tím, že hodiny na LL stále běží, ale jednotlivé oscilátory v hlavě jsou vzájemně desynchronizovány? Byla exprese na LL sledována také pomocí *in situ* hybridizace, aby mohlo být dosaženo prostorově-časového rozlišení při detekci exprese genů?

Závěrem bych ráda shrnula, že předkládaná disertační práce je velmi kvalitní. Při jejím řešení bylo dosaženo řady významných výsledků, které posunuly hranici našeho poznání cirkadiálního systému hmyzu. Autorka prokázala, že je schopna nejen provádět náročné experimenty, ale také pracovat s literaturou a výsledky přehledně prezentovat. Domnívám se tedy, že předkládaná disertační práce splňuje všechna kritéria a doporučuji ji k obhájení.

V Praze dne 8. října 2010



PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Oponentský posudek na disertační práci
Mgr. Aleny Kobelkové - Insect chronobiology.

Autorka Alena Kobelková se ve své práci zaměřila na mimořádně zajímavou otázku molekulárního postatu vnitřních hodin a částečně i vnitřního kalendáře živočichů. Práce je uvedena relativně stručným, ale vyčerpávajícím a čtivým přehledem stavu poznání dané problematiky. Navazující stránky obsahují přetištěné články, jejichž je disertantka autorkou. Oceňuji důsledné přestavení hlavních cílů každé ze studií a také závěrečné shrnutí toho, co bylo dosaženo. Každý z článků svědčí o obrovském množství práce, která předpokládá zvládnutí mnoha velmi náročných laboratorních technik molekulárně genetických, imunohistochemických nebo behaviorálních. Práci uzavírá Curriculum Vitae, z něhož plynou sympatické fakty, totiž, že autorka měla možnost načerpat cenné zkušenosti za svých třech pobytů ve Spojených státech a využít je i při psaní svých odborných textů. Dále, že se nevyhýbá rutině při výuce mladších studentů v praktikách.

K formální stránce práce mám komentář také převážně pochvalný. Celá grafická úprava je vtipná a přímo vybízí ke čtení a listování. U obrázků bych doporučil větší velikost, popisky na nich jsou na hraně čitelnosti.

Mám na autorku dvě otázky – jednu metodickou a druhou spíše teorie se týkající.

1. Prosím o vysvětlení způsobu zobrazování a analýzy denních variací exprese genů – tedy časových profilů exprese - jde o první příložený článek, Obr. 3 na str.30. Nebylo by vhodnější zobrazovat na časové ose X absolutní čas namísto použitého relativního, který začíná bodem 0, když se rozsvítí světlo? Pokud bychom totiž použili absolutní čas a například obě poledne (tedy středy světelných částí) nastavili v grafech denní exprese v dlouhém (LD) a krátkém (SD) dni tak, aby se překrývaly, zdá se mi, že se výrazně zmenší časové rozdíly v profilech. Akrofáze LD a SD se výrazně přiblíží. Nikoliv ovšem v amplitudě, ta je zpravidla v dlouhém dni výrazně vyšší. Když bychom si pomohli konkrétním příkladem: vezmeme-li absolutní čas např. pro profil *tim wt* (Obr. 3 vlevo nahoře), pak akrofáze v krátkém dni je někdy kolem 19. hodiny, zatímco v dlouhém dni jen o málo později - okolo 19.45. Pak by ovlivnění fáze cyklování sledovaných genů fotoperiodou nebylo tak výrazné, jak se z grafů zdá a jak je prezentováno. Mimo to, u LD *tim* vrcholí těsně před zhasnutím, u SD dokonce až v tmavé fázi po zhasnutí. Neprotiřečí si to diskutovaným „dřívějším přechodem z fotopického na skotopické vidění“ zmíněným na str. 23? Nakolik tedy uváděné posuny v profilech exprese odpovídají reálným podmínkám v životě *Chymomyza costata*?

2. Druhá otázka se týká Kryptochromu, který je letmo zmíněn v úvodní části. Mohla by autorka krátce přestavit jeho fyziologickou úlohu a diskutovat jeho význam ve svých dosavadních a případných budoucích studiích (viz poznámka na str. 25)?

Celkové hodnocení: Metodicky velmi široce pojaté a náročné téma je zpracováno velmi dobře. Autorka osvědčila výbornou teoretickou znalost problematiky a dokázala ji stručně shrnout a představit. Jako členka relativně malých autorských kolektivů dokázala získat množství velmi různorodých výsledků, zpracovat je, formulovat cenné dílčí závěry a vypracovat ucelenou experimentální studii, jejíž větší část již přijaly prestižní mezinárodní vědecké časopisy. Dokázala tím své teoretické i praktické schopnosti k vědecké práci. Navrhuji tedy, aby oponovaná práce mgr. Aleny Kobelkové s názvem *Insect Chronobiology* byla přijata k obhajobě na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity.

V Brně 15.10. 2010

doc. RNDr. Martin Vácha, PhD

Department of Entomology
Department of Evolution, Ecology
and Organismal Biology
300 Aronoff Laboratory
318 West 12th Avenue
Columbus, OH 43210-1242

Phone (614) 292-6425
Fax (614) 292-2030

6 October 2010

Professor Ivo Sauman
Biology Centre of the Academy of Science of the Czech Republic
Institute of Entomology
Branisovska 31
370 05 Ceske Budejovice
Czech Republic

RE: Evaluation of Ph.D. thesis submitted by Alena Kobelkova

Dear Professor Sauman,

Thank you for the opportunity to review the Ph.D. thesis submitted by Ms. Alena Kobelkova. I have read her thesis and offer the following comments on the specific chapters.

She provides a concise and well-prepared introductory chapter that does a nice job of summarizing the state-of-the-art in this field. This section sets the stage for the chapters that follow and provides a good rationale for asking the questions posed in the following chapters.

I consider Chapter II to be the most impressive chapter in her thesis. The fact that it has already been accepted for publication in one of the top journals for biological rhythms work indicates that it has also been vetted by peers working in this field and found worthy of publication. It is quite an impressive chapter, showcasing her molecular skills and demonstrating the important functional role of the *timeless* promoter in association with diapause. By exploiting the available nondiapause (ndp) mutant of the drosophilid *Chymomyza costata*, she has been able to show convincingly that a major deletion in the *ndp*-mutant is responsible for the failure of these flies to enter diapause as larvae. Her work highlights the importance of the E-box and TER-box for expression of the clock genes. Since this species is a non-model system she by necessity had to carry out these experiments in *Drosophila* S2 cells. In many ways this set of experiments can serve as a primer on how to approach such a problem in a non-model system. In summary, I consider this to be an extremely good paper.

Chapter III is also based on a published manuscript and thus has also been significantly examined via the peer review process. I consider this to be a very interesting question, perhaps because it is a question we have also asked in our lab! In spite of the obvious importance of cell cycle arrest as a key component of insect diapause, remarkably few investigators have explored this question. This paper is thus a most welcomed addition to the literature, and it is particularly interesting that *pcna* emerges as a likely player in this diapause, as it is in the pupal diapause of flesh flies. Though the phase of the cell cycle that is arrested may differ among species, as noted for *Bombyx mori*, quite possibly there will emerge some commonality in the manner in which cell cycles are arrested in diapause. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* is one of the leading journals in our field, and I was pleased to see, but not surprised, that this nice piece of work found a home in this good journal.

Professor Ivo Sauman

RE: : Evaluation of Ph.D. thesis submitted by Alena Kobelkova

Page two

6 October 2010

In Chapter IV, she introduces a new species, the Mediterranean flour moth *Ephesia kuehniella*, as a potential subject for future work in chronobiology by describing rhythms of egg hatching and adult locomotor activity, characterizing two of the major clock genes, *period* and *timeless*, monitoring their daily expression patterns and the sites where these genes and their proteins are localized within the brain. This represents a major new body of clock-related information for this major pest species, and the fact that it is a rather primitive moth this species offers an important contrast to Lepidoptera used in previous clock studies. This study and others clearly show the importance of asking these types of questions in a range of species. Results observed here indicate that there can be considerable variation among the Lepidoptera as well as variation from the best-studied system, *Drosophila melanogaster*. Although this particular chapter is mainly descriptive and will not likely have the same major impact as the other chapters in this thesis it clearly paves the way for future studies in this species.

In summary, I consider this thesis to be excellent, and clearly on par with what I would hope to see in a Ph.D. thesis from any top-ranked university from around the world. I congratulate Ms. Kobelkova on a job well done. Please extend my best wishes to her for reaching this milestone in her career.

Sincerely,



David L. Denlinger
Distinguished University Professor