

## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI

**Autorka práce:** Mgr. Vlastimil Smýkal

**Název práce:** Juvenile hormone signaling in insect development and reproduction

**Oponent:** doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

Předložená disertační práce shrnuje řadu experimentálních prací zabývajících se mechanismy a funkcí signalizace aktivované juvenilním hormonem v různých hmyzích modelech, druhy s proměnou dokonalou i nedokonalou. Cíle práce jsou jasně a přehledně definovány a odpovídají svoji skladbou jednotlivým experimentálním studiím, které tvoří hlavní část předložené disertační práce. Úvodní část velmi přehlednou a čtivou formou shrnuje nejnovější poznatky týkající se funkce a signalizace juvenilního hormonu a jeho analog, detailně popisuje aktivaci Met, jako principiálního receptoru juvenilního hormonu a jeho úlohu v transkripční regulaci, především v souvislosti s regulací vývoje a reprodukce. Oceňuji zejména organické začlenění nejnovějších poznatků v této oblasti do textu. Na druhou stranu by této části přece jen prospělo stručné shrnutí přínosu experimentálních studií, které jsou hlavním výstupem dizertační práce, pro jednotlivé oblasti studia JH a Met. Práce se poté sestává ze 4 experimentálních prací, z nichž 3 již byly úspěšně publikovány v kvalitních oborových i mezioborových časopisech s náročným recenzním řízením, což mj. dokládá, že se jedná o práce na velmi dobré vědecké úrovni. Úloha autora a jeho podíl na všech 4 studiích jsou jasně vymezeny. Po formální stránce je předložená disertační práce velmi dobře zpracována.

### **Konkrétní dotazy a připomínky:**

Vzhledem k tomu, že většina prací již prošla důkladným oponentním řízením, rád bych se v této části posudku zaměřil spíše na dotazy týkající se především současných poznatků o funkci Met a některým jeho potenciálním funkcím.

Obecné dotazy:

1) V poslední době se ukazuje, že příbuzné PAS proteiny u obratlovců (např. AhR) hrají mj. velmi významnou roli v regulaci imunitní odpovědi. Dá se očekávat, že Met (Gce) nějakým způsobem mohou modulovat vývoj buněčné složky imunity hmyzu?

2) Jaká je případná orgánově specifická exprese Met – je přítomen ve většině orgánů larev, nebo se vyskytují vysoké hladiny Met v některých specifických orgánech, případně, mění se lokalizace Met v rámci orgánů v průběhu vývoje?

Konkrétní dotazy k jednotlivým studiím:

### **1) Práce č. 1:**

Jedním z hlavních závěrů práce je, že inhibice transkripce Kr-h1 je kritický krok pro vznik dospělého jedince u druhů hmyzu s proměnou dokonalou i nedokonalou. Vzhledem k tomu, že se jedná o transkripční faktor, je známo něco bližšího o jeho úloze v regulaci transkripce, např. jaké jsou jeho cílové geny, ev. jejich vztah k vývoji předposledního a posledního larválního instaru apod.?

### **2) Práce č. 2:**

V rámci této práce se autor zabýval mj. specifickou úlohou proteinu Tai jako partnera Met, především ve vitelogenezi. U obratlovčího proteinu AhR je známo, že interaguje s celou řadou partnerů, ale zejména komplex s proteinem Arnt hraje zásadní roli v aktivaci transkripce genů regulovaných AhR. Hraje protein Tai úlohu takového univerzálního partnera nezbytného pro aktivaci transkripce? Vyskytuje se Met pouze v binárních komplexech nebo může zahrnovat více proteinů? Jestliže je Tai nezbytný pouze pro vitelogenezi, lze očekávat, že jiný protein bude dimerizovat s Met v řízení juvenilního programu v předposledním larválním instaru?

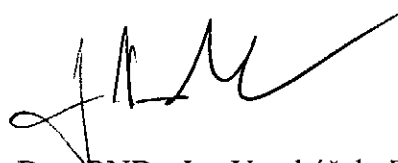
### **3) Práce č. 4:**

Poslední práce dosud nebyla publikována a je zaměřena na objasnění úlohy Met a Gce jako unikátních receptorů pro JH. Výsledky ukazují, že v modelu *Drosophily* hraje zásadní roli JH receptoru Gce, pravděpodobně fungující jako dimer s proteinem Tai. Autoři práce mj. zmiňují, že MF představuje rozšířenější ligand aktivující potenciální JH receptor. Mohl by autor upřesnit, co je v současné době známo o úloze MF (např. v porovnání s JH) v organismu *Drosophily*?

Autor dále zmiňuje, že Gce se, na rozdíl od AhR, primárně vyskytuje v buň. jádře. To není zcela přesné – lokalizace AhR je mj. závislá na aktivitě signálních drah regulujících buněčný cyklus, kdy v aktivně proliferujících buňkách (v *in vitro* kulturách) se AhR nachází jak v buň. jádře, tak v cytoplazmě. Je něco známo o tom, jak se chovají Met a Gce v různých proliferujících buň. modelech (např. S2 buňkách)?

Závěrem ještě jednou konstatuji, že předložená disertační práce představuje, po obsahové i formální stránce, vysoce kvalitní výstup postgraduálního studia. Dle mého názoru jsou prezentované práce na vynikající úrovni. Autor prokázal své tvůrčí schopnosti a předložená práce zcela splňuje požadavky v daném oboru. Proto doporučuji, aby byla práce přijata k obhajobě a dalšímu řízení. Rovněž doporučuji, aby byl Mgr. Vlastimilu Smýkalovi po úspěšné obhajobě práce přiznán vědecký titul Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně dne 22. 10. 2014



Doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.  
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.  
Královopolská 135  
612 65 Brno



**Critical assessment of the memoir entitled “Juvenile hormone signaling in insect development and reproduction”, prepared by Mgr. Vlastimil Smykal and to be presented and defended in order to obtain the PhD degree**

The memoir comprises three published papers and one manuscript submitted for publication. The four contributions are centered on the role of juvenile hormone (JH), the JH receptor Methoprene-tolerant (Met) and its target gene Krüppel-homolog 1 (Kr-h1) in insect development and reproduction. The species used for the research work were the hemimetabolan *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera) and the holometabolan insects *Bombyx mori* (Lepidoptera) and *Drosophila melanogaster* (Diptera). The work was formally carried out at the Institute of Entomology, České Budějovice, Czech Republic (Biology Centre of the Academy of Sciences), under the supervision of Prof. RNDr. Marek Jindra, CSc., although specific parts of it were performed in other institutions.

The three published papers have appeared in respected journals, specialized in insects or pluridisciplinary, as follows:

Konopova, B.\*, **Smykal, V.\***, Jindra, M. (2011). Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. **PLoS ONE** 6 (12): e28728.

**Smykal, V.\***, Bajgar, A.\*, Provaznik, J., Fexova, S., Buricova, M., Takaki, K., Hodkova, M., Jindra, M., Dolezel, D. (2014). Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 45: 69-76.

**Smykal, V.**, Daimon, T., Kayukawa, T., Takaki, K., Shinoda, T., Jindra, M. (2014). Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. **Developmental Biology** 390: 221-230.

Therefore, they passed a severe filter before being accepted to these journals, which represents already a guarantee of scientific quality.



However, I have carefully read these papers, and I found them perfectly sound, in technical and in conceptual terms. Briefly, the results show that the JH-Met-Kr-h1 axis is clearly critical for metamorphosis but appears to be dispensable during early larval development, as shown in *P. apterus* and *B. mori*. Concerning reproduction, the results reported demonstrate that Met and its heterodimeric partner Taiman are essential for vitellogenesis and ovarian maturation in *P. apterus*. No doubt that these results represent a significant step that illuminates the molecular mechanisms underlying the action of JH in two fundamental biological processes, metamorphosis and reproduction. I have only a few questions of detail that I would be happy debating with the candidate the day of the presentation.

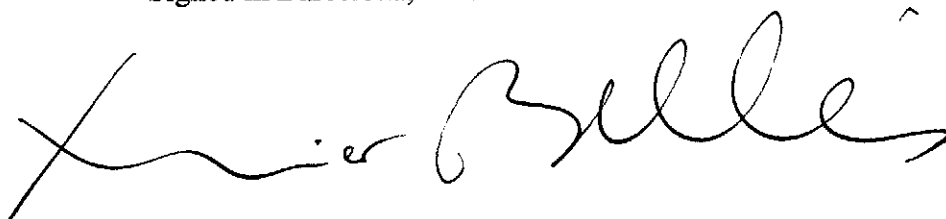
The fourth contribution is the following submitted manuscript:

Jindra, M., Smykal, V., Charles, J.P., Uhlirova, M., Hill, R.J. (submitted). A Homolog of the Vertebrate Dioxin Receptor Is a Receptor for Arthropod Juvenile Hormone.

It looks formatted for a pluridisciplinary journal, and the results reported, based on *in vitro*, *in vivo* and cell-based techniques in *D. melanogaster*, definitively show that Met and its paralog Gce are a *bona fide* receptor for JH. When published, this paper will become an inevitable reference for all those working on the molecular action of JH.

In conclusion, given the scientific quality of the four contributions analyzed, I consider that the Thesis of Vlastimil Smykal should be formally presented and defended.

Signed in Barcelona, 21 October 2014



Prof. Dr. Xavier Bellés

CSIC Research Professor

Director of the Institute of Evolutionary Biology (CSIC-UPF)

