

## Neuroanatomie proteinu Timeless a jeho funkce v cirkadiánních a fotoperiodických hodinách larvy octomilky, *Chymomyza costata*

Diplomová práce se zabývá cirkadiánními rytmy, fotoperiodismem a regulací diapauzy u hmyzu. Jako modelový organismus byla zvolena octomilka *Chymomyza costata*, která se v těchto aspektech významně liší od běžně zkoumaných octomilek *Drosophila melanogaster*. Larvální stadia *C. costata* nemají žádné detekovatelné funkční cirkadiánní hodiny, zároveň jsou ale velmi citlivé k fotoperiodě a reagují na krátký den indukcí diapauzy. U tohoto druhu je také k dispozici kmen s mutovaným genem *tim*, která u *C. costata* narušuje citlivost ke krátké fotoperiodě. Tím se tyto octomilky stávají fascinujícím modelem vhodným pro prozkoumání vztahu mezi sezónními a denními rytmy.

Teoretický úvod diplomové práce je zpracován čtivě a srozumitelně, nicméně je zbytečně stručný na pouhých 13 stranách. Pomohl by podrobnější rozbor některých kapitol. Například v kapitole 1.1.1.4. Molekulární mechanismus hodin chybí jakákoliv zmínka o Cry proteinu; je pouze zmíněno, že protein Tim je rozkládán světlem. Role Cry je přitom zásadní a měla by být zde lépe vysvětlena. Postrádal jsem také podrobnější popis funkce melatoninu v indukci diapauzy a příklady z jiných skupin hmyzu a bezobratlých. Pro čtenáře ne-entomologa by stálo zato vysvětlit některé odborné termíny typu „ovipozice“ a stručně shrnout ontogenezi modelového organismu.

Diplomové práce je tematicky zajímavá, ale metodicky příliš úzce zaměřená. Experimentální část se soustřeďuje výhradně na imunofluorescenci hodinových proteinů Tim, Per a neurotransmiteru serotoninu v mozku larev octomilky *Chymomyza costata* ve dvou vývojových stádiích a dvou různě dlouhých fotoperiodách. Výsledkem je řada velmi pěkných konfokálních snímků, naznačujících mimo jiné přímý fyzický kontakt mezi tim-positivními a serotonin produkujícími neurony. Mikroskopie byla jistě náročná na čas a technickou expertízu. Škoda, že závěrem je jediný graf, který ukazuje změny v hladině serotoninu v neuronech ventrálního ganglia. Název diplomové práce tak zcela neodpovídá prezentovaným výsledkům. Čekal bych přece jen pokus o časově rozlišenou analýzu denních změn v hladině proteinu, který je v názvu (i když by šlo o neprůkazný nebo negativní výsledek v důsledku nefunkčních cirkadiánních hodin u larev), podrobnější srovnání exprese mezi jednotlivými neurony (podle obrázků to vypadá, že může být různá), nebo pokus o využití dalších metod (např. *in situ* hybridizace nebo RT qPCR). Autorka přitom podle diskuze provedla řadu jiných experimentů (například testovala Tim protilátku kromě wt také u mutantních linií a pokoušela se kvantifikovat hladinu Tim), které ale pravděpodobně nevyšly podle očekávání a proto jsou jen stručně okomentovány. Myslím, že i tyto výsledky měly být do práce zařazeny.

Co se týče diskuze, je opět příliš krátká (necelé 3 strany), i když to lze částečně vysvětlit stručností výsledkové části a také tím, že se pravděpodobně jedná o součást dosud nepublikované práce, na kterou autorka opakovaně odkazuje. Chybí mi zde především přehledné srovnání výsledků s jinými modelovými organismy. Diskuzi by velmi pomohl schematický obrázek nebo fotografie exprese Tim a serotoninu v mozku *D. melanogaster*. Závěr je srozumitelný a odpovídá výsledkům a práce je doplněna výborně zpracovanými citacemi asi 140 vědeckých článků.

Pokud komise uzná, že délka práce odpovídá standardům na PŘF JU, lze práci doporučit k obhajobě.

Kromě několika překlepů jsou v práci také tyto drobné nedostatky:

Obr 3 – v legendě je uvedeno, že se jedná o larvy *C. costata*. Kapitola se přitom zabývá *D. melanogaster* (a sama autorka později uvádí, že u *C. costata* není v larválním stadiu funkční cirkadiánní oscilátor).

Obr.4: legenda je neúplná, např. chybí vysvětlení zkratky ccg (clock controlled genes). Obrázek je redundantní ve srovnání s Obr.5.

Str 6, odst 3: „reprimují“ není české slovo – inhibují?

Str 8, od 2: „Temperátní“ oblast není české slovo – oblast mírného pásu?

Str 13, od 4: serotonin není neuropeptid (překlep)

Str 29, ods 2: „buňky alatostatiny“ – buňky produkující a.

Dotazy:

1. Autorka se zmiňuje o sexuálním dimorfismu v tvorbě neuropeptidu-F, který způsobuje rozdíly v pohybové aktivitě mezi pohlavími u octomilek. Je možné to rozvést? Projeví se to například v rozdílné délce a/nebo časování spánku u obou pohlaví?
2. Lze podáním vnějšího nebo zvýšením hladiny tvorby vnitřního melatoninu indukovat diapauzu?
3. Autorka uvádí na str 3, odst 2, že změny v teplotě jsou u octomilek vnímané receptory pro mechanické a zvukové vibrace, tzv. chordotonálními orgány. Může to podrobněji rozvést? Lze například odstraněním těchto orgánů narušit citlivost cirkadiánních hodin k teplotní synchronizaci?
4. Podle autorky byla intenzita Tim imunofluorescence v neuronech nízká, proto jí nešlo kvantifikovat – na obr. 11 ale vypadá intenzita dostatečně výrazně nad intenzitou pozadí. Byla tedy velká variabilita mezi biologickými replikáty?
5. Str 28, odst 2, poslední věta o *tim* mRNA – význam věty je nejasný? Koreluje hladina *tim* mRNA s prezentovanými výsledky u Tim proteinu?
6. Podle diskuze nadbytek nebo nedostatek serotoninu ve stravě nemá vliv na diapauzu. Jestli to dobře chápu, serotonin má přitom mít vliv na diapauzu nepřímo jakožto prekurzor melatoninu. Není pravděpodobnější, že hladina melatoninu je necitlivá k relativně malým změnám hladiny serotoninu, protože limitní krok v syntéze melatoninu je exprese aaNAT a prekurzor je v buňkách v nadbytku? Nebylo by potom zajímavější měřit například hladinu aaNAT?

Mgr. Martin Sládek, Ph.D.