

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko: Milena Damulewicz

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- 2012 **doktor nauk biologicznych**

Tytuł dysertacji: „Lokalizacja i funkcja kryptochromu w układzie wzrokowym *Drosophila melanogaster*”; promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pyza, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Zoologii, Zakład Biologii i Obrazowania Komórki

- 2010 **studia podyplomowe**

Biomateriały- materiały dla medycyny; Akademia Górniczo – Hutnicza, Kraków

- 2007 **magister nauk biologicznych**, specjalizacja biologia komórki

Tytuł dysertacji: „Okolodobowa ekspresja białka mPer1 oraz reszt cukrowych glikokoniugatów w komórkach Panetha jelita krętego myszy karmionych nocą”; promotor: dr Andrzej Fiertak, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Zoologii, Zakład Cytologii i Histologii

- 2007 **uprawnienia pedagogiczne**

Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Studium Pedagogiczne

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **2020 – obecnie** adiunkt, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński  
adiunkt

- **2018-2019** kierownik projektu „Rola autofagii w regulacji zegara okołodobowego u *Drosophila melanogaster*”, grant Opus 2017/27/B/NZ3/00859, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński

- **2017-2018** adiunkt, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński

- **2015-2017** asystent z doktoratem, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński

- **2013-2016** wykonawca projektu "Rola hemoksygenazy w regulacji zegara okołodobowego u *Drosophila melanogaster*" Narodowe Centrum Nauki, grant OPUS no. UMO-2012/07/B/NZ3/02908 w zespole badawczym prof. dr hab. Elżbiety Pyzy, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński
  - **2013** postdoc w ramach projektu "Establishment of *Pyrrhocoris apterus* as a new model species for chronobiology" European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013, grant agreement n° 316304) w zespole badawczym dr David Dolezela, Department of Molecular Chronobiology, Institute of Entomology, Czech Academy of Science, Ceske Budejovice, Czechy
  - **2009-2010** Pracownik techniczny, Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński
- 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311).**

Na osiągnięcie naukowe „Rola zegarów peryferycznych w regulacji rytmów okołodobowych” składają się 4 prace badawcze wymienione poniżej wraz z ich danymi bibliometrycznymi oraz opisem mojego wkładu autorskiego w każdą z nich. Łączny **Impact factor** tych prac wynosi **20,546** a łączna punktacja wg listy czasopism **MNiSW to 480**.

- I. Damulewicz M, Ispizua JI, Ceriani F, Pyza E. (2020) “Communication Among Photoreceptors and the Central Clock Affects Sleep Profile”. *Front Physiol.* 11:993. IF: 4.37. Punkty MNiSW: 100. Liczba cytacji: 4**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu większości doświadczeń, analizie danych, zdobyciu środków finansowych przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu procesu publikacji (autor korespondencyjny). Praca jest podsumowaniem projektu wykonanego w ramach grantu Opus oraz Mobilność Plus we współpracy z CONICET w Argentynie. Mój wkład w przygotowanie pracy szacuję na 80%.*

- II. **Damulewicz M**, Mazzotta GM, Sartori E, Rosato E, Costa R, Pyza EM. (2017) “Cryptochrome Is a Regulator of Synaptic Plasticity in the Visual System of *Drosophila melanogaster*”. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:165. **IF: 5,639**. Punkty MNiSW: 140. Liczba cytacji: 14

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu większości doświadczeń, zdobyciu środków finansowych, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu procesu publikacji (autor korespondencyjny). Praca powstała w ramach projektu Sonata, którego byłam kierownikiem. **Mój wkład w przygotowanie pracy szacuję na 60%**.*

- III. **Damulewicz M.**, Doktor B., Baster Z., Pyza E. (2022) „The role of glia clocks in the regulation of sleep in *Drosophila melanogaster*”. *Journal of Neuroscience*, JN-RM-2340-21. **IF: 6,167**. MNiSW: 140.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu większości doświadczeń, zdobyciu środków finansowych, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu procesu publikacji (autor korespondencyjny). Praca powstała w ramach Minigrantu, którego jestem kierownikiem. **Mój wkład w przygotowanie pracy szacuję na 70%**.*

- IV. **Damulewicz M.**, Szypulski K., Pyza E. (2022) „Glia – neurons cross – talk regulated through autophagy”. *Frontiers in Physiology*, 13:886273. **IF: 4.37**. MNiSW: 100.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu większości doświadczeń, zdobyciu środków finansowych, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu procesu publikacji (autor korespondencyjny). Praca powstała w ramach grantu Opus, którego jestem kierownikiem. **Mój wkład w przygotowanie pracy szacuję na 80%**.*

## **Omówienie celu naukowego w/w prac wraz z opisem uzyskanych wyników.**

### **Wstęp**

Zegar biologiczny reguluje dobową rytmikę procesów życiowych wszystkich organizmów, generując oscylacje o okresie zbliżonym do 24 godzin. Rytmety te są synchronizowane do zmieniających się warunków środowiska w ciągu doby takich jak cykle światła i ciemności, dobowe wahania temperatury, czy dostępność pokarmu, ale mogą być zachowane również w stałych warunkach bez informacji o zmianie pory dnia (np. w stałej ciemności). Rytmety okołodobowe są generowane przez system oscylatorów – centralny znajdujący się w mózgu oraz peryferyczne zlokalizowane m.in. w siatkówce czy komórkach glejowych.

Podstawowym modelem w badaniach chronobiologicznych jest *Drosophila melanogaster*, u której mechanizm zegara jest dość dobrze poznany. Jego działanie jest zbliżone do mechanizmu opisanego u myszy, dzięki czemu wyniki uzyskane w badaniach *D. melanogaster* pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy regulacji okołodobowych procesów fizjologicznych u ssaków, w tym również u ludzi.

Główny oscylator zegara biologicznego *D. melanogaster* zlokalizowany jest w rejonie zwanym *accessory medulla* (aMe), w drugiej warstwie neuropilu wzrokowego - płytki medulla. Neuropil aMe jest połączony siecią włókien nerwowych z wieloma rejonami mózgu oraz z układem neuroendokrynnym znajdującym się w *pars intercerebralis* i *pars lateralis* (PI/PL). Większość neuronów zegara wysyła wypustki do aMe, dzięki czemu neuropil ten stanowi centrum koordynacji pracy zegara biologicznego (Helfrich-Förster, 2004). Dodatkowo docierają tu sygnały świetlne z oka złożonego - zarówno z fotoreceptorów siatkówki jak i narządu Hofbauer-Buchnera. Centralny zegar okołodobowy *D. melanogaster* tworzy ok. 100-150 neuronów zegara, podzielonych na grupy: neurony boczne brzuszne o dużych (*large ventral lateral neurons* - l-LNv) i małych ciałach komórkowych (z ang. *small ventral lateral neurons* - s-LNv), neurony boczne grzbietowe (z ang. *lateral dorsal neurons* - LNd), neurony grzbietowe (z ang. *dorsal neurons* - DN1-DN3) oraz neurony boczne tylne (z ang. *lateral posterior neurons* - LPN). Neurony zegara tworzą sieć oscylatorów, które wzajemnie się synchronizują.

Komórki oscylatorów charakteryzują się ekspresją kilkunastu genów zegara, m.in.: *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *cryptochrome* (*cry*), *Par domain protein 1* (*Pdp1ε*), *vrille* (*vri*). Poziom ekspresji tych genów lub kodowanych przez nie białek zmienia

się cyklicznie w ciągu doby. Istotą molekularnego mechanizmu zegara okołodobowego jest regulacja ekspresji genów na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego przez ich własne białka, jak również poprzez cykliczne modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne (Özkaya and Rosato, 2012).

Białka kodowane przez geny *clock* i *cyc* należą do czynników transkrypcyjnych i mogą tworzyć heterodimery, które przyłączają się do sekwencji regulatorowej E-box (CACGTG) genów *per* i *tim* oraz genów kontrolowanych przez zegar (*ccg* - *clock-controlled genes*), aktywując ich transkrypcję. PER ulega translacji w cytoplazmie jako monomer, jest jednak w tej formie niestabilne i ulega hiperfosforylacji (Edery et al., 1994). W tym samym czasie w cytoplazmie rośnie również poziom białka TIM, które tworzy heterodimery z PER (Marrus et al., 1996; Myers et al., 1996; Sehgal et al., 1994; Vosshall and Young, 1995), zabezpieczając je jednocześnie przed hiperfosforylacją i degradacją. W trakcie nocy poziom białek PER i TIM osiąga maksimum, tworzą one wtedy heterodimery, które są transportowane do jądra komórkowego, gdzie powodują zahamowanie aktywności CLK-CYC, co z kolei prowadzi do zmniejszenia poziomu ekspresji *per*, *tim* i genów kontrolowanych przez zegar. W trakcie dnia poziom PER i TIM spada, dzięki czemu heterodimery CLK-CYC mogą ponownie przyłączyć się do sekwencji E-box i aktywować transkrypcję genów *per*, *tim* i *ccg*. Cały cykl trwa 24 godziny (Yu et al., 2007).

Synchronizacja zegara z zewnętrznymi warunkami świetlnymi jest możliwa dzięki białku kryptochrom (CRY). Jest to fotoreceptor światła niebieskiego, zbudowany z dwóch głównych domen: N-końcowej fotoliazopodobnej (Photolyase-Homologous Region - PHR) oraz C-końcowej. Domena PHR odpowiada za niekowalencyjne wiązanie chromoforów: dinukletydu flawinoadeninowego (FAD) oraz 5, 10 - metenylotetrahydrofolianu (pteryny lub MTHF), które pełnią funkcję kofaktorów absorbujących światło. Z kolei domena C-końcowa odpowiada za stabilizację cząsteczki oraz zapobiega przyłączaniu TIM w ciemności. Delecja 20 aminokwasów na końcu C (forma  $\Delta$ CRY) powoduje, że CRY występuje w formie stale aktywnej (Rosato et al., 2001).

Główną funkcją CRY jest fotorecepcja i synchronizacja zegara do warunków świetlnych w środowisku zewnętrznym. Po absorpcji promieniowania o długości 400-450 nm (światło niebieskie) CRY zmienia swoją konformację, co umożliwia przyłączanie innych białek, m.in. TIM (Berndt et al., 2007). Następnie TIM ulega fosforylacji przez kinazę tyrozynową (Busza et al., 2004) i jest rozpoznawane przez białko JETLAG, które jest składnikiem kompleksu COP9 (Knowles et al., 2009; Koh et al., 2006; Peschel et al., 2009). W wyniku transestryfikacji łańcuchy poliubikwityny są kowalencyjnie przyłączane do lizyny łańcucha

białkowego TIM. Następnie ubikwityna jest rozpoznawana przez proteasomy, w których białko TIM ulega degradacji (Hunter-Ensor et al., 1996; Lee et al., 1996; Myers et al., 1996). Co ciekawe, funkcja CRY w oscylatorach peryferycznych wydaje się być inna niż w neuronach zegara. Może m.in. pełnić funkcję represora transkrypcji genów kontrolowanych przez zegar, zależnej od CLK-CYC (Benito et al., 2008; Collins et al., 2006). Dodatkowo aktywne CRY w oscylatorach peryferycznych może wiązać się z PER (Rosato et al., 2001) i uczestniczyć w translokacji PER do jądra komórkowego (Glossop and Hardin, 2002).

Układ wzrokowy odbiera bodźce świetlne z otaczającego środowiska, przetwarza je i przekazuje do wyższych ośrodków mózgu. Natężenie i spektrum światła zmienia się cyklicznie w ciągu doby, co wpływa na pracę układu wzrokowego oraz całego organizmu. W fotoreceptorach siatkówki oraz w gleju epitelialnym otaczającym kartusze w płycie lamina owadów wykryto okołodobową ekspresję genów zegara (Górska-Andrzejak et al., 2018; Hunter-Ensor et al., 1996; Siwicki et al., 1988; Zerr et al., 1990), co świadczy o istnieniu peryferycznego oscylatora w tych komórkach. Oscylatory fotoreceptorów są prawdopodobnie niezależne od oscylatora centralnego, gdyż ich rytmika może się utrzymywać nawet przy braku ekspresji *per* w neuronach zegara (Cheng and Hardin, 1998).

W układzie wzrokowym *D. melanogaster* opisano wiele rytmów okołodobowych. Wiele z nich zidentyfikowano w siatkówce i pierwszym płacie wzrokowym (płycie lamina). Najlepiej zbadane są rytmy występujące w interneuronach L1 i L2, które odbierają informacje z fotoreceptorów siatkówki i przekazują do głębszych warstwy układu wzrokowego. Komórki monopolarne L1 i L2 w płycie lamina wykazują rytmiczną plastyczność strukturalną. Ich aksony zwiększają swoją średnicę dwukrotnie w ciągu doby, zmieniają także swój kształt z odwróconego stożka w trakcie dnia do kształtu cylindrycznego w nocy (Pyza and Meinertzhagen, 1995, 1999). Dodatkowo zaobserwowano, że aksony komórek L1 i L2 są większe w dystalnej części płytki lamina, natomiast mniejsze w części proksymalnej (Pyza and Meinertzhagen, 1995). Również dendryty komórek L2 wykazują okołodobową plastyczność: zmianom dobowym podlega zarówno wielkość, jak też morfologia kolców dendrytycznych oraz liczba synaps tetradycznych (pomiędzy zakończeniami fotoreceptorów siatkówki i interneuronami L1 i L2), a nawet rozmiar ich jąder komórkowych (Górska-Andrzejak et al., 2005; Weber et al., 2009).

Opisane zmiany są przykładem rytmicznej plastyczności neuronalnej, która znajduje się pod kontrolą zegara, gdyż utrzymują się one w warunkach stałej ciemności, ale zanikają u mutantów *per*<sup>0</sup> (Górska-Andrzejak et al., 2005; Weber et al., 2009).

Rytm występujące w układzie wzrokowym są regulowane zarówno przez oscylator centralny, jak również przez peryferyczne oscylatory zlokalizowane w fotoreceptorach siatkówki i komórkach glejowych. Bardzo ważnym czynnikiem regulującym jest też tutaj światło, które jest odbierane bezpośrednio przez komórki światłoczułe siatkówki, jak też przez komórki posiadające ekspresję CRY. Celem mojej pracy było zbadanie wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi oscylatorami oraz mechanizmów, dzięki którym mogą regulować rytmy okołodobowe.

### **Podsumowanie poszczególnych prac**

W czasie przygotowywania pracy doktorskiej podjęłam próbę wykazania, że różne części wchodzące w skład układu wzrokowego wykazują odmienny wzór ekspresji genów, co przekłada się na różnice w ich funkcjonowaniu w trakcie doby. Dzięki współpracy z Zakładem Biotechnologii Medycznej UJ (prof. dr hab. Józef Dulak, dr hab. Agnieszka Łoboda) możliwe było zastosowanie mikrodisekcji laserowej do precyzyjnego wyizolowania pierwszego neuropilu wzrokowego – płytki lamina. Wykorzystanie tej nowoczesnej techniki pozwoliło na uzyskanie próbek badanej tkanki bez zanieczyszczeń pochodzących z sąsiednich tkanek. Porównanie poziomu ekspresji wybranych genów w różnych porach doby w płycie lamina i w siatkówce pokazało, że geny zegara posiadają podobny wzór ekspresji w różnych tkankach, natomiast geny kontrolowane przez zegar mają wzór tkankowo specyficzny. W badaniach tych wykorzystałam także komórki glejowe oraz interneurony L2 sortowane przy pomocy cytometru przepływowego (współpraca z dr Karoliną Bukowską-Strakova). Wykorzystując ten materiał pokazałam, że komórki te wykazują rytmiczną ekspresję receptora PDF (*Pdfr*) oraz alfa podjednostki pompy sodowo-potasowej (*Atpa*). Dodatkowo komórki L2 mają wyższą ekspresję genu kodującego białko presynaptyczne BRP w trakcie dnia niż w nocy. Co ciekawe, L2 posiadają ekspresję genu *per*, ale nie jest ona rytmiczna, co sugeruje, że PER pełni w tych komórkach funkcję niezwiązaną z zegarem. Uzyskane wyniki były jednymi z pierwszych pokazujących jak ważne jest uzyskiwanie danych z poszczególnych typów komórek, a nie całych tkanek czy organów, gdzie uzyskuje się wypadkową dla wszystkich składowych. Wyniki zostały opublikowane w pracy Damulewicz i in., 2015, która nie wchodzi w skład osiągnięcia, ale stanowi punkt wyjściowy do dalszych badań.

Kolejne projekty miały na celu zbadanie w jaki sposób poszczególne oscylatory peryferyczne regulują rytmikę okołodobową.

W pierwszej pracy (**artykuł I**) pokazałam, że oscylatory znajdujące się w fotoreceptorach siatkówki mogą bezpośrednio wpływać na regulację pracy neuronów zegara i w efekcie regulować sen. Eksperymenty zostały wykonane we współpracy z zespołem dr Fernandy Ceriani z Buenos Aires (CONICET, Argentyna), dzięki uzyskanemu stypendium Mobilność Plus. Uzyskane wyniki pokazały, że zaburzenie pracy zegara w fotoreceptorach siatkówki zwiększa poziom snu zarówno w trakcie dnia jak i w nocy. Co ciekawe, zablokowanie przekazywania synaptycznego z fotoreceptorów wpływało tylko na sen w trakcie dnia. Wykazałam, że zmiany te są spowodowane m.in. zmienionym wzorem ekspresji białka presynaptycznego BRP w fotoreceptorach oraz zmniejszonym poziomem ekspresji PER w neuronach zegara. Bardziej szczegółowe badania pokazały, że oscylatory zlokalizowane w fotoreceptorach posiadających ekspresję rodopsyny (Rh) 1, 3 oraz 6 odpowiadają za regulację poziomu snu w nocy, natomiast te, które produkują rodopsynę 5 modulują sen w trakcie całej doby. Różnice te mogą wynikać ze zmian natężenia i spektrum światła w ciągu dnia. Fotoreceptory wrażliwe na światło UV (grupa fotoreceptorów R8 z ekspresją Rh3) hamują aktywność owadów w trakcie dnia, kiedy narażenie na UV mogłoby spowodować uszkodzenia DNA. Z kolei rodopsyna Rh5, która absorbuje niebieskie światło, wydaje się zwiększać aktywność owadów w godzinach porannych. Wykazałam również, że fotoreceptory R8 odpowiadają za regulację czasu trwania sjesty w trakcie dnia, natomiast oczka Hofbauer-Buchnera (HB) za sen w ciągu nocy. Wykorzystanie owadów transgenicznych i metody NrXGRASP pozwoliło ustalić, że połączenia synaptyczne tworzone pomiędzy oczkami HB a neuronami zegara wykazują plastyczność okołodobową – synapsy są aktywne na początku dnia, natomiast zanikają w trakcie dnia i w nocy.

Po raz pierwszy wykazałam również, że interneurony L2 odgrywają znaczącą rolę w regulacji funkcjonowania neuronów zegara. Po pierwsze, komórki L2 wykazują zmiany poziomu wapnia w trakcie dnia i nocy, co sugeruje różnice dobowe w ich aktywności, a to może wpływać na efektywność procesu fototransdukcji, gdyż L2 odbierają sygnał z fotoreceptorów w obrębie synapsy tetradycznej. Po drugie, zablokowanie uwalniania neuroprzekaźnika z tych komórek powoduje zmiany czasu trwania snu w trakcie dnia oraz w trakcie nocy. Jest to możliwe, ponieważ komórki L2 mogą tworzyć połączenia synaptyczne z neuronami zegara (ILNv). Nasz zespół wykazał istnienie tych połączeń dzięki zastosowaniu metody TransTango, która pozwala wyznakować fluorescencyjnie wszystkie komórki postsynaptyczne do badanych komórek. Opisanie wyżej wyniki były kluczowe dla zrozumienia mechanizmu przekazywania sygnału świetlnego do centralnego oscylatora.



Kolejna praca dotyczy roli kryptochromu w układzie wzrokowym. Realizacja tego projektu była możliwa dzięki grantowi Sonata NCN, którego byłam kierownikiem. Praca opublikowana w 2017 roku (**artykuł II**) powstała we współpracy z ośrodkami w Leicester i Padwie. Zarówno prof. Ezio Rosato jak i prof. Gabriella Mazzotta specjalizują się w badaniach funkcji CRY u *Drosophila*. W ramach tej współpracy wykazaliśmy, że CRY tworzy bezpośrednie kompleksy z białkiem presynaptycznym Bruchpilot (BRP). Do tej pory wiadomo było, że aktywowane światłem CRY wiąże TIM i PER, wyznaczając je do degradacji w proteasomach i regulując ich translokację do jądra komórkowego. Dodatkowo w układzie wzrokowym CRY może wiązać niektóre białka szlaku fototransdukcji oraz aktyne, dzięki czemu możliwa jest modulacja wrażliwości fotoreceptorów w odpowiedzi na światło. Zdolność komórek siatkówki do rytmicznego przekazywania sygnału jest związana między innymi z dobowymi zmianami poziomu ekspresji białka presynaptycznego BRP. Wykazuje ono dwa maksima ekspresji, na początku dnia oraz na początku nocy. Poranny szczyt ekspresji jest zależny od światła, natomiast wieczorny jest kontrolowany przez zegar okołodobowy. W naszej pracy pokazaliśmy, że regulacja poziomu białka BRP w trakcie dnia jest zależna od CRY. Tworzenie bezpośrednich kompleksów tych dwóch białek zostało przez nas potwierdzone przy użyciu kilku różnych metod – ko-immunoprecypitacji, Western blot, spektroskopii masowej, drożdżowemu systemowi dwuhybrydowemu. Dodatkowo dzięki zastosowaniu metody *in situ* PLA (Proximity Ligation Assay) mogliśmy ustalić, że takie kompleksy tworzą się specyficznym tylko w zakończeniach fotoreceptorów siatkówki. Właśnie w tym rejonie poziom BRP zmienia się cyklicznie w ciągu doby. Pomiar immunofluorescencji wykazały, że mutanty *cry<sup>0</sup>* mają zwiększony poziom BRP podczas całej fazy jasnej, co sugeruje, że białko to przy braku CRY nie podlega degradacji w trakcie dnia. Z kolei owady z ekspresją konstytutywnie aktywnej formy CRY ( $\Delta$ CRY) zachowują dobowy rytm ekspresji BRP, ale całkowity poziom białka BRP jest czterokrotnie niższy niż u owadów szczepu dzikiego, co sugeruje jego zwiększoną degradację w ciągu całej doby. Całkowity poziom białka BRP w głowach mierzony metodą Western blot nie wykazuje istotnych statystycznie zmian, co dowodzi, że światło-zależna degradacja BRP zachodzi w obecności CRY tylko w specyficznych typach komórek, takich jak fotoreceptory siatkówki.

Kolejny artykuł wchodzący w skład osiągnięcia (**artykuł III**) przedstawia rolę oscylatorów zlokalizowanych w komórkach glejowych w regulacji snu. Komórki glejowe pełnią niezwykle istotną rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego, jednak ich rola jako oscylatorów biologicznych jest słabo poznana. Wykorzystanie zwierząt

transgenicznym pozwala na wywołanie nadekspresji zmutowanej formy białka CYC ( $\Delta$ CYC) w wybranych komórkach, a to powoduje zatrzymanie rytmicznych zmian ekspresji genów i białek zegara, czyli w efekcie wyłączenie danego oscylatora. Dzięki zastosowaniu tej metody wykazałam, że zegar w komórkach glejowych pełni istotne funkcje w regulacji poziomu snu, zarówno w trakcie dnia jak i w nocy. Kolejne eksperymenty pozwoliły ustalić, że nie wszystkie typy komórek glejowych uczestniczą w tym procesie. Za utrzymanie aktywności w trakcie dnia odpowiada glej astrocytarny, glej chiazmy wzrokowej i glej epitelialny, natomiast za obniżenie poziomu snu w nocy tylko glej epitelialny. Glej perineurialny nie bierze udziału w regulacji snu i aktywności.

Wiadomo, że oscylatory glejowe są zaangażowane w utrzymanie rytmiki stopnia rozgałęzienia wypustek neuronów zegara sLNv w grzbietowej części mózgu (Herrero et al., 2017). W mojej pracy wykazałam, że są za to odpowiedzialne astrocyty oraz glej chiazmy wzrokowej, natomiast glej epitelialny reguluje amplitudę tych zmian. Podjęłam także próbę znalezienia mechanizmu, dzięki któremu komórki glejowe mogą regulować procesy behawioralne. W przypadku komórek gleju epitelialnego jest to uczestnictwo w tworzeniu synaps trójdzielnych w obrębie kartusza wzrokowego oraz w regulacji neurotransmisji poprzez białko Ebony.

Ostatni artykuł wchodzący w skład osiągnięcia (IV) jest kontynuacją badań nad rolą gleju w regulacji rytmów okołodobowych. Wykorzystując technikę sortowania komórek wyznakowanych za pomocą GFP uzyskaliśmy mRNA z oczyszczonej frakcji komórek glejowych mózgu. Porównując wyniki poziomu ekspresji genów w różnych porach doby wykazaliśmy, że autofagia w gleju zachodzi w sposób rytmiczny, a jej poziom jest wyższy w trakcie godzin nocnych. Dodatkowo zaburzenie autofagii w gleju poprzez wyciszenie ekspresji genów *atg5* i *atg7* powoduje zwiększony poziom snu w trakcie nocy. Analogiczne eksperymenty zostały wykonane z użyciem szczepów transgenicznych pozwalających na manipulacje genetyczne tylko w konkretnych typach komórek glejowych u osobników dorosłych (technika TARGET). Uzyskane wyniki pokazały, że zmiany poziomu snu obserwowane wcześniej były wynikiem zaburzenia autofagii w astrocytach, pozostałe komórki glejowe nie biorą udziału w tej regulacji. Poszukując mechanizmu, dzięki któremu procesy degradacyjne w obrębie astrocytów regulują behawior, wykazaliśmy, że jest on związany z kontrolą okołodobowej plastyczności neuronalnej w zakończeniach wypustek neuronów sLNv w grzbietowej części mózgu. Utrzymanie prawidłowego rytmu zmian stopnia rozgałęzienia tych wypustek jest zależne od autofagii w astrocytach. Może być to związane z regulacją przebudowy błony komórkowej, a co za tym idzie zmianami kształtu i wielkości

komórek glejowych, niezbędnymi do utrzymania właściwej struktury rozgałęzień dendrytów neuronów sLNv. Uzyskane wyniki znacząco wpłynęły na poznanie mechanizmów regulacji zegara centralnego poprzez zegary peryferyczne.

## 5. Omówienie innych osiągnięć naukowych

### Okres przed doktoratem

Moje zainteresowanie chronobiologią zaczęło się w trakcie przygotowywania pracy magisterskiej w Zakładzie Cytologii i Histologii UJ. Pracę „Okolodobowa ekspresja białka mPer1 oraz reszt cukrowych glikokoniugatów w komórkach Panetha jelita krętego myszy karmionych nocą” obroniłam w 2007 roku. W tym czasie nauczyłam się wykonywania reakcji immunohistochemicznej i obsługi mikroskopu konfokalnego, który stał się jednym z moich głównych narzędzi badawczych. W 2007 roku rozpoczęłam projekt w ramach doktoratu z wykorzystaniem innego modelu badawczego, jakim jest *Drosophila melanogaster*. Praca na owadach pozwoliła mi na wykorzystanie zalet tego organizmu modelowego, takich jak duża pula dostępnych szczepów transgenicznych, co niezwykle ułatwiło planowanie dalszych badań. W trakcie doktoratu odbyłam staż w Zakładzie Genetyki Uniwersytetu w Leicester w Anglii, gdzie nauczyłam się przygotowywania wektorów ekspresyjnych niezbędnych do tworzenia nowych szczepów transgenicznych. Nawiązałam także współpracę naukową z dr Ezio Rosato, która jest kontynuowana do dnia dzisiejszego. W tym czasie prowadziłam badania mające na celu opisanie szczegółowej lokalizacji białka CRY w układzie wzrokowym *Drosophila melanogaster*. Moim największym osiągnięciem było wykazanie, że jeden z neuronów zegara, 5ty sLNv, wysyła wypustki do płytki lamina i reguluje rytmy w układzie wzrokowym za pośrednictwem neuroprzekaźnika ITP. Dodatkowo pokazałam, że neurony DN3 kontaktują się bezpośrednio z głównymi neuronami zegara, LNv, za pomocą sieci wypustek. Badania te były finansowane z grantu promotorskiego. Po złożeniu pracy do recenzji odbyłam 3-miesięczny staż w Istituto Italiano di Tecnologia w Genui, prowadząc badania nad ssaczym zegarem okołodobowym w modelu *in vitro*, pod kierunkiem dr Davide de Pietri Tonelli. Wyjazd ten był finansowany z programu Erasmus Praktyki. Po powrocie z Włoch, w październiku 2012 roku obroniłam pracę doktorską „Lokalizacja i funkcja kryptochromu w układzie wzrokowym *Drosophila melanogaster*”. Wyniki z rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w dwóch pracach (Damulewicz i in., 2011, 2013).

W trakcie trwania doktoratu uczestniczyłam również w realizacji badań w ramach grantów dr hab. Anny Osyczka dotyczących wpływu biomateriałów na komórki podścieliska

szpikowego w hodowli *in vitro* oraz roli białka BMP w osteogenezie. Wyniki te zostały opublikowane w 2011 roku (Skarzynska i in., 2011).

### **Okres po doktoracie**

W kolejnych latach kontynuowałam badania nad zegarem biologicznym z wykorzystaniem modelu owadziego. W 2013 roku rozpoczęłam staż podoktorski w Instytucie Entomologii Czeskiej Akademii Nauk w Czeskich Budziejowicach. W ramach grantu unijnego “Establishment of *Pyrrhocoris apterus* as a new model species for chronobiology” pod opieką dr Davida Dolezela realizowałam badania dotyczące wpływu zegara biologicznego na regulację diapauzy u owadów. *P. apterus* jest owadem nie modelowym, w związku z czym badania rozpoczęliśmy od charakteryzacji mechanizmu molekularnego zegara okołodobowego. Wykazaliśmy, że pomimo, że owady te wykazują dobowe zmiany zachowania, nie posiadają rytmicznej ekspresji genów zegara w mózgu (Kotwica-Rolińska i in., 2021). Badaliśmy także rolę peptydów insulinopodobnych w regulacji diapauzy u tych owadów. Dodatkowo brałam udział w badaniach, dzięki którym wykazaliśmy, że CRY w układzie wzrokowym karaczanów bierze udział w magnetorepcji (Bazalova i in., 2016), a także w badaniach roli TIM w kompensacji temperaturowej u *D. melanogaster* (Singh i in. 2019) oraz w regulacji zegara okołodobowego u *P. apterus* (Kotwica-Rolinska et al., 2022a), a także roli PDF w fotoperiodyzmie u *P. apterus* (Kotwica-Rolinska et al., 2022b).

W 2014 roku wróciłam do Krakowa, żeby podjąć się realizacji projektu dotyczącego roli hemoksygenazy (HO) w regulacji zegara biologicznego. Enzym ten jest zaangażowany w rozkład hemu do tlenku węgla, jonów żelaza i bilirubiny, dzięki czemu zmniejsza poziom stresu oksydacyjnego. Wykazaliśmy, że w siatkówce *D. melanogaster* hemoksygenaza wykazuje rytmiczną ekspresję kontrolowaną zarówno przez zegar jak i przez światło (Damulewicz i in. 2017). Dodatkowo pokazaliśmy, że HO zabezpiecza fotoreceptory siatkówki przed uszkodzeniami DNA przez UV (Damulewicz i in., 2017, 2018).

W 2015 roku otrzymałam grant Sonata finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. W ramach tego projektu nawiązałam współpracę z Instytutem Biologii Uniwersytetu Padeńskiego. Dodatkowo wyjechałam ponownie do Anglii, gdzie pod kierunkiem dr Joerna Steinert uczyłam się wykonywania eksperymentów z wykorzystaniem elektrofizjologii komórek nerwowych *Drosophila*. Wykonaliśmy szereg eksperymentów pokazujących wpływ CRY na funkcjonowanie synaps motoneuronów larwy, które są przygotowywane do publikacji.

Jednym z zagadnień badawczych w tym projekcie była próba odpowiedzi na pytanie czy zmiany w poziomie BRP spowodowane mutacją *cry* wpływają na zmiany ultrastruktury miejsca aktywnego synapsy oraz ilości uwalnianych pęcherzyków synaptycznych. Wykorzystując zdjęcia wykonane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykonaliśmy pomiary ilości synaps tetradycznych, wielkości miejsca aktywnego (tzw. T-bar) oraz ilości uwalnianych pęcherzyków synaptycznych w wybranych punktach czasowych. Dodatkowo wykonane zostały rekonstrukcje 3D badanych synaps w celu wykonania szczegółowego opisu dobowej plastyczności synaptycznej. Wykazaliśmy, że w trakcie szczytu porannej aktywności owadów ilość uwalnianych pęcherzyków jest większa niż w trakcie nocy, kiedy muszki są nieaktywne. Co ciekawe, całkowity poziom pęcherzyków w obydwu badanych punktach czasowych jest podobny, różnica polega na tym, że w trakcie nocy nie są one transportowane do miejsca aktywnego i uwalniane do przestrzeni synaptycznej. Dodatkowo w tym czasie wielkość synaps jest większa, co sugeruje, że mogą być one bardziej wrażliwe na bodźce świetlne pojawiające się w trakcie nocy.

Porównanie wyników uzyskanych dla owadów szczepu dzikiego oraz mutantu *cry*<sup>0</sup> pokazało, że CRY jest niezbędne do utrzymania prawidłowej ilości pęcherzyków synaptycznych w ciągu doby. U dzikich owadów ilość tych pęcherzyków na początku dnia oraz w trakcie nocy jest zbliżona, podczas gdy u mutantów *cry*<sup>0</sup> ich poziom w godzinach porannych jest znacznie obniżony, co może powodować zaburzenia fotorecepcji (Damulewicz i in., 2021).

Grant Sonata został rozliczony trzema pracami oryginalnymi, z czego jedna wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

W 2018 roku otrzymałam grant Opus finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Badania prowadzone w ramach tego projektu mają na celu wykazanie, że autofagia w konkretnych typach komórek może mieć wpływ na pracę zegara biologicznego. Projekt jest w trakcie realizacji, część badań dotycząca komórek glejowych została opublikowana i wchodzi w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

W 2018 roku otrzymałam stypendium w ramach programu Mobilność Plus na wyjazd do Argentyny. Wyniki uzyskane we współpracy z dr Fernandą Ceriani zostały opublikowane w pracy omówionej w ramach Osiągnięcia. W 2019 roku otrzymałam stypendium im. Bekkera finansowane przez NAWA na roczny pobyt w Padwie. Wraz z prof. Gabriellą Mazzotta wykonaliśmy eksperymenty pokazujące, że CRY może tworzyć kompleksy z kalmoduliną. Utworzenie takich kompleksów powoduje dodatkową stabilizację wiązania CRY z białkiem szlaku fototransdukcji INAD (Mazzotta i in., 2018). Badania nad kompleksami CaM-CRY są przez nas kontynuowane, w przygotowaniu jest kolejna praca.

Po powrocie do Polski w 2020 roku zostałam zatrudniona na Uniwersytecie Jagiellońskim jako adiunkt w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki. Kontynuuję realizację grantu Opus którego jestem kierownikiem oraz grantu Opus, którego jestem wykonawcą. Podjęłam również pracę dydaktyczną.

W 2019 roku zostałam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej pana mgr Bartosza Doktor. Pod moją opieką doktorant przeprowadził eksperymenty mające na celu wykazanie wpływu mutacji związanej z rozwojem choroby Parkinsona na plastyczność synaptyczną, zegar biologiczny i zachowanie owadów (Doktor i in., 2018, 2019). Bartosz Doktor obronił rozprawę doktorską w 2020 roku.

W 2020 roku zostałam również promotorem pomocniczym pracy doktorskiej pani mgr Bernadetty Bilskiej. Pod moją opieką prowadziła ona badania dotyczące wpływu zegara na wrodzoną odpowiedź immunologiczną u owadów (Bilska i in., 2022). Bernadetta Bilska obroniła rozprawę doktorską w 2022 roku.

### **Plany na przyszłość**

Moja praca badawcza w najbliższym czasie będzie się koncentrować nad 3 głównymi tematami: **a)** rolą komórek glejowych w regulacji rytmów okołodobowych: w ramach uzyskanego Minigrantu z funduszy PobBios UJ podjęłam się scharakteryzowania, które typy komórek glejowych stanowią oscylatory biologiczne i wpływają na regulację zachowania owadów. Na bazie tych wyników chciałabym skupić się na wybranych typach gleju i ustalić jakim zmianom okołodobowym podlegają (kształt, poziom ekspresji genów i białek) oraz w jaki sposób komunikują się one z neuronami zegara; **b)** wpływem światła w trakcie rozwoju embrionalnego i larwalnego na funkcjonowanie zegara biologicznego u dorosłych owadów: badania wstępne wykazały, że owady rozwijające się w całkowitej ciemności wykazują zmieniony poziom snu i aktywności. Jest to związane m.in. z tym, że na etapie rozwoju larwalnego ciała grzybkowate osiągają mniejsze rozmiary w warunkach stałej ciemności. W swoich badaniach chciałabym sprawdzić jaki to ma wpływ na dalszy rozwój owada – poziom ekspresji genów, zdolność do zapamiętywania i uczenia się, postęp procesów neurodegeneracyjnych w trakcie starzenia; **c)** wpływem zanieczyszczenia światłem na rozwój choroby Parkinsona (PD): wykorzystując owady będące modelem PD chciałabym prześledzić postęp zmian neurodegeneracyjnych typowych dla tej choroby (zanik neuronów dopaminergicznych, zaburzenia lokomotoryczne, zaburzenia zegara, zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego) u owadów, które będą hodowane w nietypowych dla nich warunkach

światlnych: przy stałym dostępie światła o niskiej intensywności w trakcie nocy, intensywnych kilkuminutowych błyskach światła w trakcie nocy, ekspozycji na dodatkowe 2 godziny światła niebieskiego w godzinach wieczornych. Wybrane warunki świetlne są podobne do ekspozycji na światło typowej dla ludzi mieszkających w dużych miastach: sen w warunkach słabego oświetlenia pochodzącego z latarni ulicznych, dodatkowa ekspozycja na światło w trakcie nocy po zapaleniu lampy czy wieczorna praca przy komputerze, oglądanie telewizji, korzystanie ze smartfona. Uzyskane wyniki mogą mieć bardzo duże znaczenie w zrozumieniu mechanizmu postępu choroby Parkinsona, która jest jedną z chorób cywilizacyjnych.

### **Informacje o odbytych stażach naukowych:**

#### **Okres po doktoracie:**

- **2019-2020** roczny staż w ramach programu Bekkera, Department of Biology, Padova University, Padwa, Włochy
- **2018-2019** 8-miesięczny staż w ramach stypendium Mobilność Plus, CONICET, Buenos Aires, Argentyna
- **2017** 2 miesięczny staż w Department of Toxicology, Leicester University, Wielka Brytania
- **2016** 3- miesięczny staż w Department of Biology, Padova University, Padwa, Włochy
- **2013** post doc; Department of Molecular Chronobiology, Institute of Entomology, Czech Academy of Science, Ceske Budejovice, Czechy

#### **Okres przed doktoratem:**

- **2012** 3- miesięczny staż; Istituto Italiano di Tecnologia; Genua, Włochy
- **2010** 3-miesięczny staż w Department of Genetics, Leicester University, Wielka Brytania

## Informacje o udziale w projektach:

### Po doktoracie:

- **2019-2020 kierownik projektu** „The role of Cryptochrome in the visual system of *Drosophila melanogaster*” projekt w ramach stypendium im. Bekkera, NAWA, nr PN/BEK/2018/1/00348/DEC/1; Department of Biology, Padova University, Włochy
- **2019-2023 wykonawca w grantie** „Rola zegara okołodobowego, oksygenazy hemowej i czynnika Nrf2 w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Związek pomiędzy zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej a chorobą Parkinsona - badania na modelu *Drosophila*.” Opus, NCN, 2018/29/B/NZ3/02591 prof. dr hab. Elżbiety Pyza, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński,
- **2018-2023 kierownik grantu** „Rola autofagii w regulacji zegara okołodobowego u *Drosophila melanogaster*”, grant Opus, NCN, 2017/27/B/NZ3/00859, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński,
- **2018 kierownik projektu** „Regulacja plastyczności synaptycznej przez zegar okołodobowy u *Drosophila melanogaster*”, program Mobilność Plus nr 1671/MOB/V/2017/0, CONICET, Argentyna
- **2015-2019 kierownik grantu** „Regulacja plastyczności synaptycznej przez zegar okołodobowy u *Drosophila melanogaster*” grant Sonata, NCN, nr 2014/15/D/NZ3/05207” Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński,
- **2013 -2016 główny wykonawca w grantie** "Rola hemoksygenazy w regulacji zegara okołodobowego u *Drosophila melanogaster*” grant OPUS, NCN, nr 2012/07/B/NZ3/02908; prof. dr hab. Elżbiety Pyza; Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński,
- **2012-2013 główny wykonawca w grantie** “Establishment of *Pyrrhocoris apterus* as a new model species for chronobiology” European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013, grant agreement n° 316304); dr Davida Dolezela, Institute of Entomology, Czech Academy of Science, Ceske Budejovice, Czechy



### **Przed otrzymaniem tytułu doktora:**

- **2011-2012 grant promotorski** “Regulacja rytmów okołodobowych w pierwszym neuropilu wzrokowym *Drosophila melanogaster*”, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
- **2007 – 2009 wykonawca w grantie** “Mechanisms of recombinant human bone morphogenetic protein 2 - mediated osteogenesis of human bone marrow stromal cells: regulatory signaling pathways and effect of aging”; Marie Curie International Reintegration Grant within the 6th European Community Framework Programme; dr Anny Osyczka; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński,
- **2006 – 2007 wykonawca w grantie** “Regulatory kinases in BMP –mediated hMSC osteogenesis”; NIH 5R03AG026047-02; dr Anny Osyczka, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński,

### **6. Działalność dydaktyczna, popularyzatorska i inna**

Poza działalnością naukową jestem zaangażowana w pracę dydaktyczną. W trakcie studiów doktoranckich oraz w trakcie zatrudnienia na UJ prowadziłam liczne kursy dla studentów kierunków Biologia i Neurobiologia: Podstawy mikroskopowania, Analizę instrumentalną komórki, Techniki mikroskopowe w badaniach neurobiologicznych, Techniki neuroanatomiczne oraz wykład Mózg człowieka-rozwoj i ewolucja. Jestem koordynatorem dwóch z wymienionych kursów, przygotowuje również swój kurs autorski: *Drosophila* jako model w badaniach neurobiologicznych. Od roku 2020 pełnię funkcję opiekuna studentów drugiego stopnia kierunku Neurobiologia. Byłam promotorem 6 prac licencjackich, obecnie pod moją opieką swoje prace wykonuje dwójka licencjatów oraz dwójka magistrantów. Dodatkowo pełniłam funkcję promotora pomocniczego dwóch przewodów doktorskich (dr Bartosz Doktor, 2020; dr Bernadetta Biliska, 2022).

W ramach pracy popularyzatorskiej byłam współorganizatorem Festiwalu Nauki, Nocy Biologów oraz Nocy Naukowców. Jestem autorem prac popularnonaukowych w czasopiśmie *Wszechświat i Kosmos*, współpracuję z kołem studenckim *Neuronus*, dla którego prowadziłam wykłady, a także nagrałam dla nich podcast dostępny online na *NeuronuSound*. Od 2019 roku jestem członkiem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika, pełniąc funkcję Sekretarza Zarządu. Jestem również członkiem *Society for Research on Biological Rhythms*.

Brałam udział w organizacji międzynarodowej konferencji *Neurofly 2018*, która odbywała się w Krakowie, pełniąc funkcję sekretarza. Organizowałam również sesję chronobiologiczną

w ramach konferencji FENS2021 jako moderator tej sesji, która odbyła się online. Recenzowałam prace w czasopismach *Frontiers in Physiology*, *Scientific Reports* oraz *Cellular and Molecular Life Science*.

## Literatura

- Benito J, Houl JH, Roman GW, Hardin PE. 2008. The blue-light photoreceptor CRYPTOCHROME is expressed in a subset of circadian oscillator neurons in the *Drosophila* CNS. *Journal of Biological Rhythms*. doi:10.1177/0748730408318588
- Berndt A, Kottke T, Breitzkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M, Wolf E. 2007. A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry* **282**:13011–13021. doi:10.1074/jbc.M608872200
- Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P. 2004. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science (New York, NY)* **304**:1503–6. doi:10.1126/science.1096973
- Cheng Y, Hardin PE. 1998. *Drosophila* photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without period mRNA cycling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**:741–750.
- Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. 2006. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Current Biology* **16**:441–449. doi:10.1016/j.cub.2006.01.034
- Edey I, Zwiebel LJ, Dembinska ME, Rosbash M. 1994. Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:2260–2264. doi:10.1073/pnas.91.6.2260
- Glossop NRJ, Hardin PE. 2002. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *Journal of cell science* **115**:3369–3377.
- Górska-Andrzejak J, Chwastek EM, Walkowicz L, Witek K. 2018. On variations in the level of PER in glial clocks of *Drosophila* optic lobe and its negative regulation by PDF signaling. *Frontiers in Physiology*. doi:10.3389/fphys.2018.00230
- Górska-Andrzejak J, Keller A, Raabe T, Kilianek L, Pyza E. 2005. Structural daily rhythms in GFP-labelled neurons in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **4**:721–726. doi:10.1039/b417023g

- Helfrich-Förster C. 2004. The circadian clock in the brain: A structural and functional comparison between mammals and insects. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **190**:601–613. doi:10.1007/s00359-004-0527-2
- Hunter-Ensor M, Ousley A, Sehgal A. 1996. Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* **84**:677–685. doi:10.1016/S0092-8674(00)81046-6
- Knowles A, Koh K, Wu J-T, Chien C-T, Chamovitz DA, Blau J. 2009. The COP9 Signalosome Is Required for Light-Dependent Timeless Degradation and *Drosophila* Clock Resetting. *Journal of Neuroscience* **29**:1152–1162. doi:10.1523/JNEUROSCI.0429-08.2009
- Koh K, Evans JM, Hendricks JC, Sehgal A. 2006. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep: wake cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:13843–13847. doi:10.1073/pnas.0605903103
- Lee C, Parikh V, Itsukaichi T, Bae K, Edery I. 1996. Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science*. doi:10.1126/science.271.5256.1740
- Marrus SB, Zeng H, Rosbash M. 1996. Effect of constant light and circadian entrainment of *perS* flies: evidence for light-mediated delay of the negative feedback loop in *Drosophila*. *The EMBO journal*.
- Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW, Myers MP, Wager-smith K, Rothenfluh-hilfiker A, Young MW. 1996. Light-Induced Degradation of TIMELESS and Entrainment of the *Drosophila* Circadian Clock Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2890841> JSTOR is a not-for-profit service that helps schola. *Science* **271**:1736–1740.
- Özkaya Ö, Rosato E. 2012. The Circadian Clock of the Fly: A Neurogenetics Journey Through Time, *Advances in Genetics*. doi:10.1016/B978-0-12-387687-4.00004-0
- Peschel N, Chen KF, Szabo G, Stanewsky R. 2009. Light-Dependent Interactions between the *Drosophila* Circadian Clock Factors Cryptochrome, Jetlag, and Timeless. *Current Biology* **19**:241–247. doi:10.1016/j.cub.2008.12.042
- Pyza E, Meinertzhagen I a. 1995. Monopolar cell axons in the first optic neuropil of the housefly, *Musca domestica* L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**:407–418.

- Pyza E, Meinertzhagen IA. 1999. Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropil in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology* **40**:77–88. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199907)40:1<77::AID-NEU7>3.0.CO;2-0
- Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R, Kyriacou CP. 2001. Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology* **11**:909–917. doi:10.1016/S0960-9822(01)00259-7
- Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*. doi:10.1126/science.8128246
- Siwicki KK, Eastman C, Petersen G, Rosbash M, Hall JC. 1988. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* **1**:141–150. doi:10.1016/0896-6273(88)90198-5
- Vosshall LB, Young MW. 1995. Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron*. doi:10.1016/0896-6273(95)90039-X
- Weber P, Kula-Eversole E, Pyza E. 2009. Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **4**:4–12. doi:10.1371/journal.pone.0004290
- Yu Y, Dong W, Altimus C, Tang X, Griffith J, Morello M, Dudek L, Arnold J, Schüttler HB. 2007. A genetic network for the clock of *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.0611005104
- Zerr DM, Hall JC, Rosbash M, Siwicki KK. 1990. Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **10**:2749–2762.