

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Bc. Lenky Zdechovanové

**Molekulární a environmentální faktory spojené s diapauzou a stárnutím
hmyzu**

Oponent: Vladimír Košťál
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav a
Jihočeská Univerzita v Č.B., Biologická fakulta

V úvodu je potřeba poznamenat, že předložená práce má nesmírně zajímavé a aktuální téma, a že dílčí otázky byly položeny velmi zajímavě, což je samozřejmě velkou zásluhou především školitelky, Doc. Magdaleny Hodkové. Jsem si jist, že práce na podobném tématu musela studentku zaujmout a, podle mého soudu, je to znát na celkově zdařilém výsledku její práce.

Předložená práce má 46 stran a je členěna do obvyklých kapitol. Po formální stránce nelze vytknout téměř nic. Vlastně jsem našel jedinou gramatickou chybu, a to na straně 35 („hodiny se sami nastavují“).

Úvod, zpracovaný na 11 stranách, je napsán svěže a přitom dostatečně přesně. Svědčí to o dobrém porozumění studentky tématu, o její schopnosti logicky uspořádat velmi obsáhlou literaturu (seznam použité literatury obsahuje více než 90 záznamů), a postihnout podstatné souvislosti. Mám několik skutečně drobných dotazů nebo spíš poznámek k Úvodu:

- 1) Na str. 6 je uvedeno, že „téměř všechny děje ... probíhají rytmicky“. Patrně se tím myslí rytmy zejména denní a cirkadiánní. Můžete upřesnit výraz „téměř všechny“, existují nějaké kvalifikované odhady? V případě sezónních odpovědí hmyzu, jako je právě diapauza, nejde doslova o rytmičnost, neboť život jedince bývá kratší než jeden rok, ale spíše o sezónní fenotypy (často uváděné pod označím „životní cyklus“, „life cycle“).
- 2) Na str. 9 bych doplnil, že důležitou regulační drahou spojující centrální pacemaker savců s perifériemi je také melatonin sekretovaný z pineální žlázy a jeho receptory na perifériích.
- 3) Na str. 10 je malá nepřesnost ve vyjádření: U mutantů mušky *C. costata* nejde o absenci genu *tim*, nýbrž o poruchu jeho exprese (gen *tim* je v genomu celý a strukturně téměř shodný jako u divokého kmene. Nese ovšem velkou delecii v promotoru, která patrně způsobuje poruchu v regulaci transkripce).
- 4) Na str. 11 je věta: „Stárnutí je fascinující proces s obrovskou diverzitou“. Po této větě následuje výčet oné diverzity: „Krysa žije 3 roky, veverka 25 let.“ Tento výčet působí trochu komicky ...

Celkově je ovšem Úvod vynikající. Rozhodně jeden z nejlepších, jaký jsem kdy v magisterské práci četl.

Cíle, jak už bylo řečeno, jsou formulovány velmi zajímavě, přesně, ambiciózně a přitom důvěryhodně.

Materiál a metody jsou na 9 stranách. Opět velmi precizně zpracovaná kapitola. Nemám pochyb, že studentka všechny uvedené metody perfektně zvládla. Dotazy:

- 5) V jaké fázi ovariálního cyklu se nacházely samice *P. apterus* použité pro experimenty (resp. pro pitvy)? Fáze cyklu by mohla ovlivňovat sledované parametry.
- 6) Drobná nepřesnost se vyskytla na str. 20, bod 5) izolace RNA: jednak je použit termín „inkubace při pokojové teplotě“, ale jde o pouhé rozpouštění, nikoli o děj, který by zasloužil označení inkubace. A následuje překlep: „promíchání DNA“ (myslí se RNA).

Výsledky jsou uvedeny na 9 stranách. Zejména první část, týkající se exprese genů *per* a *Pdpl* působí silně přesvědčivě a, podle mně, jde o velmi zajímavá a dobře publikovatelná data. Poznámky:

- 7) U výsledků na Obr. 3 mohl být doplněn post-hoc statistický test po ANOVě (např. Tukey nebo Bonferroni), který by ukázal míru rozdílnosti mezi jednotlivými treatmenty INTACT, SHAM a -CA.
- 8) Na str. 30 (a dále v textu) je tvrzení, že „zjištění jasně dokazují, že *juvenilní hormon* má určující vliv na expresi genů ...“. Přesnější by bylo tvrdit, že alatektomie má tento vliv. Ale rozumím tomu tak, že JH je hlavním produktem orgánu *corpora allata* a tím také nejvíce podezřelým. Ale asi nelze zcela apriorně vyloučit, že účinnou látkou může být i něco jiného, třeba dosud neznámého.
- 9) Docela překvapivý je výsledek, který ukazuje, že antigen podobný insulinu je asi 2x hojnější v mozcích krátkodenních než dlouhodobých ploštic. Intuitivně by se dal očekávat opak. V Diskusi (na str. 38) je nabídnuto vysvětlení, že může jít o rozdíl mezi hromaděním a výdejem antigenu. Ale další výsledky ukazují, že antigenu v hemolymfě je stejné množství jak u SD tak u LD ploštic. Další možné vysvětlení by mohlo být to, že byly použity ploštice relativně „mladé“, t.j. do 14 dnů po svléknutí. Minimálně první týden po svléknutí ovšem ploštice vykazují velmi vysokou metabolickou rychlost a velkou fyziologickou dynamiku a to i za SD podmínek. Tomu může odpovídat také pozorovaná relativně vysoká hladina antigenu. Možná by bylo zajímavé sledovat hladinu insulin-like antigenu i u „starších“ diapauzních ploštic?

Diskuse je vedena velmi erudovaně na 4 stranách. Studentka dokazuje, že svoje výsledky dokáže zhodnotit i se značným přesahem z fyziologie hmyzu až k fyziologii savců. Mám jedinou drobnou poznámku:

- 10) V prvním odstavci je uvedeno, že výsledky práce „potvrzují domněnku“ uvedenou v práci školitelky, že tukové těleso je zodpovědné za pozorovaný rozdíl v abundanci transkriptů „hodinových genů“ v hlavách *P. apterus* pěstovaných za SD a LD podmínek. Souhlasím, s malou výhradou: rozdíl pozorovaný u genu *period* Magdou Hodkovou a kol. byl 10 násobný, ale rozdíl pozorovaný v této práci byl pouze 2 násobný. Takže se zdá, že tukové těleso nedává „úplné“ vysvětlení.

Moje celkové hodnocení předložené práce už plyne z předchozího textu. Jedná se o práci mimořádně vysoké úrovně. Doporučuji hodnocení známkou výborná, dvakrát podtržená.

V Českých Budějovicích, dne 14. 5. 2007-05-14



.....
Vladimír Košťál



Dr Michal Žurovec
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel: 38777 5283
E-mail: zurovec@entu.cas.cz

České Budějovice 24.5.2007

Oponentský posudek na magisterskou práci Lenky Zdechovanové: “Molekulární a environmentální faktory spojené s diapauzou a stárnutím hmyzu“.

Magisterská práce Lenky Zdechovanové navazuje na předchozí výsledky měření relativní hladiny *per* mRNA (Syrová a ost. 2003), podle kterých byl prokázán rozdíl v expresi v hlavách diapauzních a nediapauzních samic. V dalších pokusech (Šauman a ost., nepublikováno) se hledal rozdíl v koncentraci *per* mRNA v mozcích, ale tam nalezen nebyl. Záhadu kolísání hladiny *per* mRNA v hlavách ploštic řeší až tato práce, kdy se podařilo prokázat, že zmíněný rozdíl v expresi spočívá v tukové tkáni.

Předložená práce kromě toho obsahuje navazující pokusy se sledováním hladiny dalšího transkriptu *Pair domain protein 1* a pokusy s alatektomizací ploštic, při kterých vyšlo najevo, že po alatektomizaci dochází ke zvýšení hladiny *per* mRNA jako v podmínkách dlouhého dne. Závěr práce je věnován detekcí homologů inzulínu v mozku ploštic.

Celá práce má 46 stran, je psaná dobrou češtinou. Rozsah jednotlivých kapitol je přiměřený, snad jen úvod je příliš rozvláčný. Část výsledků, která se týká detekce inzulínu působí trochu izolovaně. Práce je doplněna kvalitními obrázky a rozsáhlým seznamem použité literatury. K formální ani obsahové stránce nemám žádné výhrady. K autorce mám jen několik dotazů:

- 1) Kolik nezávislých pokusů v podobě izolací RNA a Real time RT-PCR bylo provedeno?
- 2) Zkoušel někdo mikroinjikovat do ploštic JH, případně inzulín a sledoval jejich vliv na expresi *per* a *Pdp1* a na navození diapauzy?
- 3) Domnělý inzulínu podobný protein migroval jako 40 kDa, předpokládané molekulové hmotnosti známých bombyxinů však spadají do rozmezí 4-7 kDa. Zkoušela autorka použití hustšího gelu a analýzu lehčích proteinů?
- 4) Může autorka na základě vlastních výsledků a údajů z literatury navrhnout jakýsi pracovní model navození diapauzy?

Celkově hodnotím práci velmi kladně. Autorka zvládla celou řadu moderních a zajímavých metod fyziologie a molekulární biologie a získala zajímavé výsledky. Práce splňuje veškeré požadavky na magisterské práce a doporučuji ji k obhajobě jako výbornou.

Michal Žurovec