

Izolace a charakterizace cirkadiánních genů *period* a *timeless* a charakterizace cirkadiánního chování u zavíječe moučného (*Ephesia kuehniella*)

Magisterská práce Aleny Kobelkové měla 2 cíle: (1) molekulární charakterizace cirkadiánních genů *period* a *timeless* u zavíječe moučného, (2) ověření, zda líhnutí larev a pohybová aktivita dospělých samců má cirkadiánní charakter.

Hlavní úsilí bylo věnováno molekulární analýze. Autorce se podařilo získat částečné sekvence kódujících částí genu *period* (40%) a genu *timeless* (50-60%). Domnívám se, že i tato částečná charakterizace obou genů představuje úspěšné splnění prvního cíle magisterské práce. Autorka se navíc pokusila charakterizovat koncové sekvence obou genů metodou 3' a 5' RACE, ale analýzu se nepodařilo dokončit. Také počet kopií obou genů se zatím nepodařilo Southern analýzou určit. Tento neúspěch je vzhledem k metodické náročnosti pochopitelný a snahu o detailnější analýzu obou genů je nutné ocenit.

Druhá část práce, věnovaná cirkadiánním rytmům v chování je zpracována mnohem méně důkladně. V případě líhnutí larev byl prokázán stimulační vliv světla, ale uspořádání pokusu neumožnilo zjistit, zda jde o cirkadiánní rytmus, jak si autorka sama zřejmě uvědomuje. V případě pohybové aktivity byl cirkadiánní rytmus prokázán, alespoň u dvou jedinců uvedených jako příklad.

K této druhé části práce mám několik dotazů a připomínek.

(1) Vzhledem k tomu, že charakterizace rytmů v chování má být využita pro hledání souvislosti s molekulárními údaji, není jasné, proč pro rytmy v pohybové aktivitě byl použit divoký kmen a ne bělooký kmen, který byl použit pro molekulární analýzy.

(2) Pokud jde o rytmy v líhnutí larev, v práci jsou rozporné údaje o použitém kmenu:

str. 12: "Pro zjištění časového rozvrhu líhnutí larevbyl použit divoký kmen.."

str. 25: "Pro pokus s líhnutím larev byl použit bělooký kmen.."

(3) Při líhnutí larev půjde s velkou pravděpodobností o interakci mezi dobou vývoje a vlivem světelného režimu. Protože vajíčka byla vykladena během 24 hodin, mohl by rytmus v líhnutí larev alespoň částečně odrážet oviposiční rytmus. Jaký je na to Váš názor?

(4) Autorka uvádí, že perioda pohybové aktivity je "s nejvyšší pravděpodobností" 23.5 hodin v konstantní tmě. Toto tvrzení je doloženo jedním periodogramem (obr. 18). Není jasné, zda jde o průměr z více jedinců nebo zda všichni měření jedinci měli stejnou periodu. Chybí údaj o počtu měřených jedinců.

Celkově je práce napsaná jasně a přehledně. Literární úvod a metodika svědčí o teoretickém i praktickém zvládnutí problematiky, především v oblasti molekulární biologie. Získané výsledky jsou dobrým startem pro další studium molekulárních mechanismů cirkadiánních rytmů. Proto práci vřele doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 26.1.2006



Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Izolace a charakterizace cirkadiálních genů *period* a *timeless* a charakterizace cirkadiálního chování u zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*)

autorka: Bc. Alena Kobelková

vedoucí práce: RNDr. Ivo Šauman, Ph.D.

oponent: Doc. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

Práce měla dva základní cíle (formulované na straně 11), jejichž splnění vyžadovalo zvládnutí dvou velmi rozdílných metodických přístupů. Prvním cílem bylo zjistit nukleotidovou strukturu genů *period* a *timeless* u zavíječe moučného a porovnat ji se známými strukturami u jiných organismů. Druhým cílem bylo charakterizovat pohybové chování a líhnutí dospělců zavíječe s ohledem na rytmický a cirkadiální charakter. Z práce je patrné, že autorka zaměřila své úsilí převážně na splnění prvního cíle. Je ovšem třeba konstatovat, že i skromněji zvolený cíl, omezený pouze na první část, by byl naprosto dostatečný pro magisterskou práci.

Úvodní kapitola (str. 1 – 10) je zpracována na skutečně vynikající úrovni. Ovšem pokud opět přihmouříme oko nad faktem, že části týkající se obou cílů jsou značně nevyrovnané. Rozbor molekulární podstaty biologických hodin u hmyzu je podán velmi čtivě a jasně, s historickou perspektivou a je přitom dostatečně detailní a přesný. V textu je jen několik drobných gramatických chyb. Jedna z nich se vyskytuje ovšem už i na obálce práce: slovo "cirkadiální" je jednou s jedním a podruhé se dvěma "n". Na straně 1 potom čteme například: "circalunární" s "c", ale "cirkadiální" s "k". Chybně je použito i slovo "circanuální". Faktických chyb je velmi málo a mají spíše charakter nepřesností. Například: na straně 3 je uveden výčet 7 genů, které u hmyzu tvoří centrální mechanismus cirkadiálního oscilátoru. V současnosti se někdy přiřazuje ještě pár dalších genů: *PAR domain protein 1*, *casein kinase 2*, *pigment dispersing factor* a *shaggy* i když je pravda, že názor na to, co ještě je a co už není centrálním mechanismem, se různí. Na straně 5 se píše o E-boxu jako o struktuře 6 aminokyselin (záměna s nukleotidy).

Kapitola Metody (str. 12 – 26) je opět perfektní, pokud se týče popisu použitých metod analýzy genové struktury. Byly použity standardní metody izolace nukleových kyselin, reverzní transkripce, PCR amplifikace, klonování, sekvencování a "Southern" blotování. Jelikož v průběhu práce nastaly určité technické obtíže, bylo nutné spektrum použitých metod ještě rozšířit nad obvyklý rámec a optimalizovat některé kroky, což nepochybně přispělo ke zvýšení autorčiny praktické erudice. Snad jediná drobná otázka k této části: Proč byl pro analýzu genů použit bělooký kmen zavíječe a ne divoký kmen? Metodika pokusů pro zjištění rytmických a cirkadiálních parametrů chování zavíječe je popsána jen velmi zběžně.

Výsledky jsou uvedeny na str. 27 – 35 a na přílohách. Zaklonování obou genů bylo úspěšné a podařilo se získat poměrně dlouhé fragmenty nukleotidové struktury cDNA (u genu *period* celkem 1344 bází a u genu *timeless* celkem 2115 bází). 3' a 5' konce se nepodařilo dosud úplně charakterizovat. Potíže, které provázejí amplifikaci cDNA úseků pomocí 3' a 5' RACE technik jsou normální. Souvisí především s těžkostmi při designu vhodných degenerovaných primerů, kde lze doporučit jedině trpělivé

zkoušení dalších kombinací. Kritickým krokem bývá také nedostatečný nebo variabilní výsledek homopolymerického "tailingu" pomocí terminální transferázy při 5' RACE, manuál firmy Invitrogen nabízí několik optimalizačních kroků. Získané cDNA sekvence byly převedeny na sekvence proteinů a tyto byly porovnány pomocí fylogenetické analýzy. Ta ukázala jejich blízkou příbuznost k sekvencím několika dalších motýlích druhů. Připomínám, že v databázích jsou kromě použitých druhů také úplné cDNA sekvence genů *period* a *timeless* u mušky *Chymomyza costata*, mohly by tedy být přidány k analýze. Southern blotování se nepodařilo. Z práce je jasné, že autorka provedla celou řadu modifikací a kontrolních testů, které vylučují subjektivní chybu.

Nejpravděpodobnější příčinou nezdaru je nešťastně zvolená proba, která může tvořit sekundární struktury. Řešením je syntéza nové proby nebo zkrácení na jednom, druhém, či na obou koncích. Umístění proby přes intron je rovněž nevhodné a může ovlivňovat její hybridizaci, popřípadě stabilitu její vazby na blotovanou gDNA. Výsledky analýzy chování je nutno považovat pouze za předběžné. Zdá se, že líhnutí je stimulováno světlem, ale že endogenní (cirkadiánní složka) není u tohoto "gatingu" příliš silná nebo zcela chybí (viz obr. 16). Naproti tomu lokomoční chování se jeví silně rytmické, se zřetelnou endogenní složkou. Není zřejmé, kolik jedinců bylo použito pro analýzu lokomoce. Graf na obr. 18 dokonce ukazuje, že rytmus lokomoce by mohl být ultradiánní?

Diskuse výsledků týkajících se struktury genů *period* a *timeless* je opět nadstandardně dobrá. Velmi podrobná a čtivá. Diskuse druhé části práce je, adekvátně k získaným výsledkům, stručná.

Můj celkový dojem z práce je velmi kladný. Především chci vyzdvihnout vynikající stylistickou úpravu a logickou strukturu celé studie. Téma biologických hodin není jednoduché, přesto je cítit, že autorka jasně pochopila širší rámec. Toto zdaleka není obvyklé u studentských prací, které jsem dosud oponoval nebo četl. Autorka evidentně strávila v laboratoři mnoho času a zvládla základní techniky molekulární biologie, včetně jejich drobných modifikací a úprav, jež právě umožňují proniknout k jejich podstatě a hlouběji jim porozumět. Technické potíže je tak možné chápat i v kladném smyslu. Cíle práce byly splněny jen částečně. Analýza struktury genů pokračuje a je pravděpodobné, že bude dokončena. Předběžné výsledky analýzy chování mohou být použity jako startovní čára pro podrobnější studii.

Předložená magisterská diplomová práce splňuje formální i obsahové požadavky a proto ji doporučuji jako kvalitní podklad k obhajobě.

Vladimír Košťál
v Českých Budějovicích, dne 26. 1. 2006