



**Biologické centrum AVČR**  
Entomologický ústav



**Jihočeská Univerzita**  
Přírodovědecká fakulta

**Doc. Ing. Vladimír Košťál, CSc.**

Branišovská 31,  
370 05 České Budějovice,

Tel: +420 387 775 324

Fax: +420 385 310 354

E-mail: [kostal@entu.cas.cz](mailto:kostal@entu.cas.cz)

Web: <http://www.entu.cas.cz/kostal/>

### **Posudek školitele na doktorskou dizertaci:**

Název práce: Insect chronobiology.

studentka: Alena Kobelková

školitel: Vladimír Košťál

Předkládaná doktorská dizertace shrnuje výsledky, které Alena získala během svého čtyřletého výzkumného úsilí, jež započalo ve únoru roku 2006 a během něhož Alena postupně pracovala ve dvou spolupracujících laboratořích Entomologického ústavu BC AV ČR a rovněž prošla stáží na Ohio State University, Columbus, Ohio. První rok doktorského studia Alena převážně věnovala dokončení experimentů, které navazovaly na její magisterskou práci na téma izolace a charakterizace hodinových genů *period* a *timeless* u zavíječe moučného (laboratoř molekulární chronobiologie ENTÚ, Ivo Šauman). V její laboratoři (laboratoř diapauzy hmyzu ENTÚ, V. Košťál) strávila Alena období zhruba od druhé poloviny roku 2007 do konce roku 2008, kdy se zabývala regulací buněčného cyklu v souvislosti se vstupem do diapauzy u mušky *Chymomyza costata*. Během té doby úspěšně klonovala několik genů kódujících významné faktory buněčného cyklu (*dacapo*, *cyclin D*, *cyclin E*). Dále připravila velkou sérii vzorků cDNA z larválních mozků a křídelních disků mušek *C. costata*, jež byly vystaveny různým fotoperiodickým režimům. Tato část práce byla velmi náročná na čas a pracovní úsilí, neboť se jednalo o synchronizaci a pitvy mnoha stovek larev v různých denních a nočních časech, následné izolace celkové RNA a syntézy cDNA pomocí reverzní transkripce. Alena rovněž provedla transkripční analýzu zaklonovaných genů pomocí kvantitativního real-time PCR. Koncem roku 2008 jsme se rozhodli mírně upravit směr Alenina výzkumu, zejména proto, aby jí bylo umožněno naučit se další metody a získat větší erudici. Modelový organismus zůstal stejný, *C. costata*. Zbytek svého doktorského studia Alena věnovala analýze promotoru hodinového genu *timeless* (laboratoř molekulární chronobiologie ENTÚ, David Doležel). Z našich předchozích studií vyplynulo, že gen *timeless* by mohl být významným prvkem, který spojuje

cirkadiánní rytmičnost a sezónní cykly u této mušky. Našli jsme mutaci v promotoru, která patrně zapříčinila poruchy v transkripci *timu* a způsobila tím jednak ztrátu cirkadiánních rytmů v chování dospělců a zároveň ztrátu schopnosti fotoperiodické indukce diapauzy u larev. Aleně se podařilo vyrobit mnoho různých konstruktů, které kombinují různě zkrácené nebo upravené verze promotoru genu *timeless* a reportérový gen kódující luciferázu. *In vitro* analýza transkripce ve Schneiderových buňkách potvrdila, že mutace v promotoru je zodpovědná za poruchy transkripce a také poměrně detailně popsala vliv jednotlivých *cis* elementů promotoru na jeho transkripční aktivitu. Poslední Aleninou aktivitou v rámci jejího doktorského studia byla tříměsíční stáž v laboratoři Davida Denlingera na Ohio State (duben až červen roku 2009). Zde se Alena podílela na charakterizaci hodinových genů *period* a *timeless* u komára *Culex pipiens*.

Předkládaná dizertace reflektuje neobvykle pestrý průběh Alenina doktorského studia. Jde o soubor tří článků, jejichž společným jmenovatelem je idea funkčního propojení molekulárních mechanismů které vytvářejí časovou strukturu organismu na denní a sezónní ose. Tedy biologických cirkadiánních hodin a fotoperiodického sezónního kalendáře. Dizertace je jistě významným příspěvkem k úsilí o ověření této hypotézy. Velmi kladně oceňuji zejména Alenin ambiciózní, samostatný a přitom svědomitý přístup k práci. Vždy se snažila vycházet z pečlivé teoretické přípravy. Zvládla celou škálu různých metod. Pracovala pozorně a kriticky kontrolovala postup svého výzkumu. Svoje výsledky dokázala uspořádat a zpracovat tak, že mohly být podkladem pro několik publikovaných prací, jež jsou součástí předkládané dizertace.

Děkuji Aleně za její významný příspěvek k výsledkům všech laboratoří, kterými během studia prošla. Jsem přesvědčen, že osobnostní charakteristiky uchazečky, suma získaných znalostí a dovedností, a především kvalita předložené doktorské dizertace jsou jednoznačnými podklady, které opravňují komisi k udělení vědecké hodnosti PhD.

V Českých Budějovicích  
dne 15. září 2010

.....  
Vladimír Košťál