

Diplomová práce Olgy Bazalové se zabývá cirkadiánními rytmy mouchy domácí, konkrétně získáním dosud neznámých kódujících sekvencí 5 hodinových genů, změřením cirkadiánních profilů exprese těchto genů a také pozorováním pohybové aktivity much v závislosti na teplotě vnějšího prostředí.

Diplomová práce obsahuje všechny důležité kapitoly, tedy úvod, cíle, metodiku, výsledky, diskuzi, závěr, přehled literatury a také přílohy s fotografiemi použitého vybavení. Práce je napsána přehledně s menším počtem překlepů (viz. níže). Kapitola úvod byla příliš stručná, soustředila se především na mezidruhové rozdíly v detailech molekulárního oscilátoru. S výjimkou 2 krátkých odstavců je věnována výhradně popisu cirkadiánních rytmů na genové úrovni. Postrádal jsem alespoň krátkou zmínku o behaviorálních rytmech hmyzu, o anatomii hodin a vztahu centrálních a periferních hodin u hmyzu. Kapitola Materiál a metody je napsána velmi pěkně, s řadou příloh dokumentujících důkladnou optimalizaci použitých experimentálních metod. Autorka překonala obtíže spojené s použitím neosekvenovaného modelového organismu a podařilo se jí splnit naprostou většinu uvedených pracných cílů. Výsledky jsou prezentovány a diskutovány přehledně a srozumitelně.

K práci mám dále několik dotazů a připomínek:

1. Úvod, odstavec 1: Ne všechny organismy byly v průběhu evoluce vystaveny periodickým cirkadiánním změnám a ne každý živočich má funkční systém vnitřních hodin. Zná autorka nějaké příklady?
2. Zajímalo by mne, jakým způsobem byly navrženy primery pro získání sekvence intronů? Byla místa sestřihu vytipována na základě homologie s *Drosophilou*?
3. Autorka získala kompletní kódující sekvenci pouze u genu *dbt* pomocí primer walking. Lze pomocí RACE získat úplnou sekvenci 5' konce mRNA? Je to technicky nebo prakticky obtížné?
4. V práci mi chybí statistické srovnání (např. pomocí ANOVA) rozdílů v expresi genů při různých teplotách, např. není zřejmé, zda je signifikantně vyšší amplituda exprese genu *cwo* při 17°C oproti vyšším teplotám.
5. Grafy 4.5, 4.6 a 4.7 by byly přehlednější s popisem časové osy.
6. Obrázky 3.1 a 4.4 jsou špatně čitelné. Zejména obr. 4.4 je matoucí, protože na první pohled nelze rozlišit popis osy y u histogramu a tak amplitudy pohybové aktivity při různých teplotách vypadají stejné.
7. Myslí si autorka, že by bylo možné zjistit přítomnost genu *Cry2* v genomu mouchy i jinak než kompletní sekvencí? Například pomocí Southern blotu nebo FISH – jako kontrolu proti hybridizaci *Cry2* sondy s *Cry1* pak využít *Drosophilu* (-) a *Tribolium* nebo včelu (+)?

Překlepy:

Strana 7, řádek 13: prokaryontní nebo prokaryotní

8/17: fyziologických

10/7: obsahuje

10/14: paralelní  
13/28: antisense  
15/4: Detailní  
15/5: lokalizován  
36/8: jednotlivých  
42/29: v mozcích  
43/14: dishevelled

Přes uvedené nedostatky předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze dne 14.5.10

Martin Sládek, Ph.D.





## Oponentský posudek na magisterskou práci Olgy Bazalové: "Cirkadiánní rytmy mouchy domácí (*Musca domestica*)".

Magisterská práce Olgy Bazalové je pokračováním analýzy cirkadiánních hodin Mouchy domácí a jejich srovnáním s circ. hodinami octomilky.

Samotná práce je napsána přehledně a čtivě, s minimálním počtem překlepů a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci. Zdařile napsaný Úvod, Diskuze a dlouhý seznam použité literatury ukazuje že autorka úspěšně pronikla do problematiky. Oddíl Metody svědčí o tom, že autorka rutinně zvládla celou řadu metod molekulární biologie. A to od běžných, až po metody náročné fyzicky i psychicky (odběry muších hlaviček každé 2 hodiny po dobu 2 dnů, celkem několik tisíc hlaviček). Oddíl Výsledky obsahuje velký objem dat, které autorka nashromáždila a je důkazem jejího vysokého pracovního nasazení. Konkrétně autorka v rámci své magisterské práce úspěšně:

- získala dosud neznámé sekvence transkriptů čtyř genů cirkadiánních hodin (cwo, pdp1ε, ck2β, ck1ε)
- změřila množství transkriptů těchto čtyř genů plus třech dalších (per, tim, pdh) pomocí metody „real-time“ RT-PCR ve třech různých teplotách (17, 25, 35°C) a dvou různých světelných režimech (LD, DD)
- zmonitorovala pohybovou aktivitu Mouchy domácí ve čtyřech různých teplotách (17, 25, 30, 35°C)

**K předkládané magisterské práci mám následující, pouze drobné formální připomínky a dotazy:**

- v případě analýzy výsledků z „real-time“ RT-PCR by mne zajímalo, jaký typ výpočtu byl použit ve zmiňované excelovské tabulce (strana 25), konkrétně zda kromě hodnot Ct byly v tomto výpočtu použity i konkrétní hodnoty efficiency jednotlivých párů primerů, a jestli ano, jak tyto hodnoty efficiency autorka získala.

- v případě grafického znázornění profilů hladin mRNA jednotlivých genů (obr.4.5., 4.6. a 4.7.) by mne zajímal bližší komentář měřítka osy Y (= rel. hladina mRNA), konkrétně proč je někdy zvoleno maximum 100% (obr.4.6.D – per varA) a jindy například 0,03 (obr.4.5.- cwo).

- v případě srovnání hladin mRNA splicingových variant genu per by mne zajímalo, jak se autorka při výpočtu vyrovnala se skutečností, že 3 použité páry primerů (tab.3.1. – primery k amplifikující transkripty period/period varA/period varB) dávají PCR produkty o různých délkách (118bp, 319bp, 235bp), a tedy při jejich detekci barvivem SYBR Green stejná hladina fluorescence (treshold) neodpovídá stejné hladině PCR produktu.

- v případě profilů mRNA jednotlivých genů získaných v průběhu dvou dnů v režimech LD a následně DD (obr.4.7.) by mne zajímalo, čím si autorka vysvětluje snížení amplitudy v DD režimu, když cirkadiánní molekulární hodiny jsou endogenní a jednou z jejich charakteristik je že pokračují v „tikání“ i za stálé tmy.

- autorka zmiňuje možnost, že v naměřeném profilu hladin mRNA na úrovni celých hlav může být skutečný profil hladin těchto mRNA v mozku maskován. Zajímalo by mne autorky názor na to, kde jinde v hlavě (kromě mozku) mohou být geny circ. hodin exprimovány.

**Domnívám se, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích dne 21.5.2010

Jan Stehlík

