

## Opponent assessment of thesis by Silvie Fexová: Circadian clock of two insect model species – *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*

The thesis is about molecular mechanism of circadian clock in two insect species – the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the red-flour beetle *Tribolium castaneum*. The author utilizes two very distinct experimental approaches: combination of several mutant alleles of three different clock genes via genetic crossing of fruitflies with subsequent behavioural analysis of their locomotor activity; and biochemical and molecular biological examination of clock gene expression of the red-flour beetle.

The thesis is very well written in perfect English with only a few mistypes (see below) and it is fun to read. The author showed skills both in scientific writing and in a broad range of experimental techniques. The *Drosophila* part of the thesis brought some novel and interesting results and the sheer number of mutant lines generated and analyzed is staggering. The *Tribolium* part of the thesis introduced a model organism never before used in chronobiology, and although the results are mostly negative, this stems from the original and risky attempt rather than from inadequate experimental approaches or a lack of skills. Although the *in situ* hybridization failed, the author tried hard to troubleshoot this complex labour-intensive procedure and finally suggested a reasonable approach to further optimize the method. Also the immunodetection of *Tribolium* clock proteins failed due to bad antibody despite authors best efforts.

I have the following comments and questions:

### Introduction:

I miss a description of *Drosophila* peripheral clock in the text, *i.e.* the expression of clock genes outside of dorsal and lateral neurons and how it is entrained. Can you mention it briefly?

I also miss a short summary (possibly included in table 1) of the mutants used in the subsequent experiments (*e.g.* which mutants are null/loss-of-function,...).

The thesis should include detailed AIMS, preferably as a separate chapter after introduction and before methods.

### Results - *Drosophila*:

What is the difference between  $cry^{01}$ ,  $cry^{02}$  and  $cry^{03}$  mutants?

It might be useful to place a reference in the text to the figures in supplement (for the 3 major results).

I understand why there is no statistical analysis of the results, considering their number and that most of them would be nonsignificant, however I would at least like to know, if the  $per^L; +/+; cry^m$  mutant free running period at 28°C differed significantly from the other  $cry$  mutants – simple t-test would be sufficient.

### Results - *Tribolium*:

Plot in Fig. 8c –  $perA$  levels in larval samples were below the detection limit of the method. Yet on a first glance the plot suggests an almost circadian rhythm in  $perA$  expression. This is greatly misleading as the only variation in the data stems from the different levels of housekeeping gene expression. Such a plot must not be included; table or textual description would be sufficient.

Plots in Fig. 8+9 – I don't see a reason why should the same plots include both normalized and raw expression levels on the common axis; if the author really wanted to graphically stress the difference in relative expression between the splice variants, it would have been better to plot only raw data with appropriately scaled axis.

Plots in Fig. 8+9 – What do the error bars represent? I assume they stand for SEM of 3 independent experiments (*i.e.* from 3 separate RT PCR runs)? This must be mentioned specifically, preferably in the legend.

I also suggest the use of a separate standard cDNA included in all runs, from which the standard curve will be generated and to which the data from all time point measurements will be normalized. This would allow showing error bars at ZT0, although I understand if it couldn't be used due to limited cycler capacity.

Mistypes:

- Page 6, paragraph 4, line 4: reset
- Pg 8, par 2, line 11: led
- Pg 12, par 3, line 16: GST-pulldown
- Pg 19, par 2, line 3: trough
- Pg 20, par 1, line 2: proven
- Pg 21, line 10: constant
- Pg 23, par 3, line 15: protein
- Pg 24, par 1, line 5: reduces
- Pg 31, par 3, line 1: lies
- Pg 32, legends: scheme
- Pg 37, par 3, line 6: missing )
- Pg 49, par 5, line 4: Fig 11

Conclusion: In my opinion, the work despite the above comments meets all requirements and therefore I recommend the thesis for acceptance. I propose the grade 1.

In Prague, 18.1.2010

  
Mgr. Martin Sládek, Ph.D.



## Oponentský posudek

### na diplomovou práci Silvie Fexové: *Circadian clock of the two insect model species: Drosophila melanogaster and Tribolium castaneum.*

Práce, kterou předkládá diplomantka Silvie Fexová, se zabývá molekulárně genetickou podstatou řízení cirkadiánních rytmů u dvou vybraných modelových druhů hmyzu. Autorka je členkou badatelského týmu, který patří ke světové špičce v oboru biologických hodin, a na kvalitě díla je vidět, že je součástí tohoto zkušeného týmu právem. Práce na první pohled zaujme tím, že je psána anglicky, což – pokud vím – není pro diplomové práce běžný standard. Angličtinou autorka vládne evidentně stejně snadno a přirozeně jako češtinou, což má místy ten důsledek, že styl se blíží hovorovému. To by možná pro pozdější publikování nemuselo být ideální, ale v diplomce tím alespoň dokazuje, že je jejím osobním a autentickým dílem. Dalším příjemným překvapením je obsáhlé a velmi kvalitní review komplikované problematiky genových oscilací. Autorka se umí orientovat ve spleti někdy si protirečících výsledků a umí najít vysvětlující historickou linii, která vede čtenáře k pochopení současného stavu poznání obtížného tématu. Dokazuje, že umí s nadhledem provést syntézu literárních dat a to, co je podstatné, srozumitelně předat dál.

Trochu příliš ostrý se mi zdá přechod mezi tímto čtivým uvedením a navazující částí Materiál a metody, kdy se rovnou skočí do detailů laboratorní práce. Chybí tu přechod co a proč se vlastně dále dělá. Doporučoval bych na konci Úvodu - kdy už čtenář ví, jak poznání postupovalo - zopakovat a jasně formulovat otázky, které zatím zůstávají otevřené a které právě chce autorka svou experimentální prací nějak řešit. Tedy trochu konkrétnější cíle, než jen obecné věty z 1. strany Úvodu. Ideální by bylo mít už také dopředu zformulovanou představu (hypotézu), co se dá čekat a co by z toho plynulo. Autorka určitě s nějakým povědomím svého příspěvku do celku poznání do práce vstupovala. Na druhou stranu chápu, že se v neznámém terénu nedá vše předvídat a že se dílčí cíle objevují až za pochodu.

Části věnované metodice a výsledkům jsou opět velmi kvalitní a svědčí o tom, že autorka zvládla celou škálu metod moderní špičkové biologie od RT PCR, přes *in situ* hybridizaci k imunocytochemii a behaviorálním metodám včetně zpracování jejich výstupů ve formě řady příložených tabulek grafů a diagramů.

Navazující část Diskuse je důkazem vyspělé a samostatné schopnosti autorky srovnat vlastní data s cizími, diskutovat případné rozpory a navrhnout hypotézu řešení i kroky k jejímu ověření. Ačkoliv zdaleka ne vše vyšlo podle představ, autorka získala množství cenného materiálu užitečného nejen pro další práci své laboratoře, ale i pro světovou chronobiologickou komunitu.

Prosil bych o zodpovězení těchto otázek, které mne při čtení zaujaly:

- 1) Jaký má autorka názor na případy zpomalení cyklu při působení vyšší teploty (mutace  $per^L$  a  $tim^{rit}$ ). Neměl by se cyklus za vyšší teploty rozběhnout naopak rychleji?
- 2) Jakým způsobem funguje entrainment – synchronizace s vnějšími světelnými rytmy - u *Tribolia*, kde chybí fotosensitivní kryptochrom 1?
- 3) Poznámka k „nejhoršímu nálezu“, že totiž *Tribolium* nevykazuje periodicitu ve tmě: Existuje nějaký jiný takový známý případ? Není vlastně neexistence endogenních hodin něčím naopak velmi cenným z hlediska poznání fylogeneze a významu rytmicity?

**Závěrem: Předloženou diplomovou práci hodnotím jako velice kvalitní a doporučuji její přijetí.**

V Brně, 23.1. 2010

Doc. RNDr. Martin Vácha, Ph.D