

Posudek na diplomovou práci Bc. Martiny Jonákové „Cirkadiánní rytmy u sekundární řasy *Chromera velia*“

Ve své diplomové práci se Martina Jonáková věnuje velmi zajímavému a málo prozkoumanému fenoménu, totiž cirkadiánním rytmům živých organismů, na modelu nedávno popsané řasy *Chromera velia*. Mimořádná důležitost tohoto organismu spočívá především v jeho blízké příbuznosti s výtrusovci a z ní vyplývající možnost, že by studium plastidu *C. velia* mohlo přispět k pochopení původu apikoplastu. Vzhledem k tomu, že plastidy *C. velia* i příbuzného druhu *Vitrella brassicaformis* jsou z několika hledisek podivné (např. co se fotosyntetických pigmentů týče), domnívám se, že jejich studium sice apikoplastu skutečně prospěje, ale že konečný obrázek evoluce plastidů chromalveolát bude značně komplikovanější, než jak ho maluje chromalveolátní hypotéza. Chromeridi také představují poměrně samostatnou linii fotosyntetických organismů a jejich výzkum přispívá ke znalostem diverzity životních projevů živých organismů. Druh *C. velia* se ukázal být dobrým modelovým organismem pro studium cirkadiánních rytmů, protože přeměna kokální buňky na bičíkovce je skutečně nepřehlédnutelná změna. Ovládnutí života chromery týmem Doc. Oborníka, projevené např. řízenou exflagelací, považují za mimořádné a je zjevné, že *C. velia* je na dobré cestě stát se modelovým organismem.

Počáteční teoretický úvod práce M. Jonákové se skládá ze dvou kapitol, Úvod a Literární přehled. Toto členění, ačkoli v diplomových pracích zcela obvyklé, není v této práci příliš šťastné. Kapitola Úvod se totiž skládá z (jediné) podkapitoly Obecný mechanismus cirkadiánních hodin, která jednoznačně patří do Literárního přehledu. Kapitoly Úvod a Literární přehled by bylo mnohem lepší sloučit do jediné kapitoly. Jinak jsou obě kapitoly (celkem 14 stran) napsány velice čtivě, kultivovaným jazykem a srozumitelně vysvětlují problematiku cirkadiánních rytmů u různých skupin organismů. Jasně z nich vyplývá, proč je důležité cirkadiánní rytmy studovat a proč je právě *C. velia* pro toto studium vhodným modelovým organismem. Při podrobnějším hledání nedostatků se mi podařilo najít občasné gramatické chyby, především v interpunkci (zpravidla několik na stránku), a několik překlepů a neobvyklých, nepřesných nebo zavádějících vyjádření, např. „peroxireduxiny“ (str. 2), „kultivací jednotlivých částí těla much byla zjištěna přítomnost...“ (str. 5), „nitratová reduktáza“ (str. 8), „bezškrobnatý mutant“ (str. 9), „charakteristikovat“ (str. 11), „ani jedna z ... metod nedokázala izolovat protein...“ (str. 11), „Faviidae“ (str. 15), „blastom obrněnek“ (str. 17). Tyto drobné nedostatky však v žádném případě nesnižují vysokou kvalitu úvodních kapitol.

K literárnímu přehledu mám následující otázky:

1. Tvrzení, že u *Arabidopsis thaliana* bylo ve studii Hannah *et al.* (2005) objeveno 22 043 genů reagujících na snížení teploty, se mi zdá nesprávné. Mohla by to autorka uvést na pravou míru?
2. Exflagelace je u *C. velia* rychlý proces. Zůstávají v kokálních nepohyblivých buňkách bazální tělíska bičíků, anebo jsou vytvářena *de novo* jako v případě heteroloboseí?
3. Nesouhlasím s tvrzením na str. 16, že *C. velia* je jediný fotosyntetický alveolát, který neobsahuje chlorofyl *c*. Kterí další nefotosyntetiční alveoláti neobsahují chlorofyl *c*?

4. Mohla by autorka vysvětlit „nejasné postavení chromery na samé hraně definic rostlin a živočichů“ (str. 17)? A jak takové definice znějí?

Jako cíle práce si autorka stanovuje nalezení genů *C. velia*, jejichž produkty by se mohly podílet na řízení cirkadiálních cyklů, a vůbec zjistit, zda tyto cykly u *C. velia* existují. K jejich splnění si autorka osvojila celou škálu mikrobiologických, molekulárně-biologických, bioinformatických a molekulárně-fylogenetických metod. Popis těchto metod trochu pokulhává za literárním přehledem a trochu kazí celkový dojem z práce. V kapitole Materiál a metody je možno nalézt řadu nepřesností, které, ač se mohou zdát drobné, ztěžují pochopení některých pasáží nebo přímo uvádějí čtenáře v omyl. Proč bylo médium filtrováno přes filtr s otvory 22 μm ? Není správný údaj 0,22 μm ? Proč je u kultivačních lahví uveden povrch, např. 300 cm^2 ? Nebyl míněn objem? U $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ nechápu, proč je uveden objem, když se jedná o pevné látky. Pokud je míněn roztok, není uvedena jeho koncentrace, která by stejně nejspíš měla být přepočítána na anhydrát. Stejně tak není uvedena koncentrace u X-gal a IPTG. Skutečně byli bičíkovci pozorováni pouze při zvětšení 40x? Při jejich několikamikrometrové velikosti se mi to zdá málo. Nejedná se pouze o zvětšení objektivu? Údaje v rpm nejsou informativní, centrifugace zjevně probíhala v různě velkých centrifugách. Co znamená pojem „buněčný roztok“? „RNase Free DNA“ jistě není používána pro odstranění DNA kontaminace. Spíše se jedná o „RNase-Free DNase“.

Tři věci považuji za zásadnější a bylo by lepší, aby se k nim autorka vyjádřila:

5. Autorka kvantifikovala počet bičíkovců během mnoha pozorování: „Kultura byla pozorována [pomocí inverzního mikroskopu] v jediném náhodně vybraném poli po dobu dvou minut, kdy byli sčítáni všichni bičíkovci, kteří se dostali do pole mikroskopu“. To považuji za chybu, mnohem lepší by podle mě bylo počítat bičíkovce v definovaném objemu, protože takto nejsou zaručeny stejné podmínky všech počítání. Kromě toho předpokládám, že při použití inverzního mikroskopu nelze najednou pozorovat všechny roviny ve sloupci média a někteří bičíkovci nemuseli být zpozorováni.

6. V popisu izolace RNA mi chybí důležitý krok precipitace proteinů, DNA, polysacharidů apod. a jejich oddělení od RNA, např. pomocí TRI reagentu. Stačí k tomu samotný BAN?

7. Z věty „K vektoru jsem přidala 5 – 20 ng vyčištěné cDNA“ (str. 24) by mohlo vyplývat, že autorka vytvářela cDNA knihovnu. To by ovšem nedávalo smysl v kontextu další pasáže, ze které zase vyplývá, že autorka klonovala PCR produkty. Mohla by to vysvětlit?

Výsledky jsou prezentovány na 9 stranách a jejich součástí je řada grafů, dva fylogenetické stromy a jejich popisy. Na obr. 7 by pro přehlednost bylo lepší vyznačit i počet bičíkovců v konstantním světle, i když by všechny hodnoty byly 0. Věta „třetí den se již objevovali bičíkovci sporadicky i u kultury držené v konstantním světle“ (str. 30) naznačuje, že druhý den v kultuře držené v konstantním světle žádní bičíkovci nebyli. Přitom jich tam naopak bylo mnohem více.

Poměrně krátká, ale výstižná diskuse zahrnuje 4 strany a považuji ji za vydařenou. Poslední věta kapitoly 5.4. na str. 34, patřící podle textu k Výsledkům, by měla patřit do diskuse a je zde velmi důležitým výrokiem. Míří na ni také má poslední otázka:

8. Z toho, že sledované geny začaly exprimovány dvě hodiny před rozsvícením (jednalo se o kultury udržované v podmínkách 12:12) autorka usuzuje, že počátek jejich exprese nebyl iniciován rozsvícením, ale pravděpodobně vnitřním oscilátorem. Nemohlo by to ale být i tak,

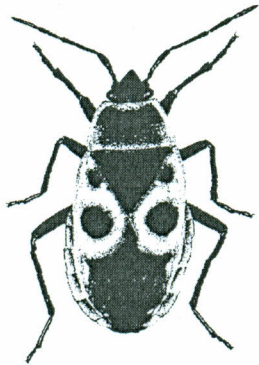
že počátek jejich exprese byl iniciován desetihodinovou tmou, a tedy že zde cyklus světlo/tma hraje významnou roli? Na str. 36 vyvozuje, že indukce světlem je pro normální průběh exprese CRY-DASH 2 důležitá.

V seznamu literatury na konci práce mile překvapí jednotná forma literatury (snad až na výskyt zkratky „PNAS“), tak častý problém diplomových prací. Počet citací je přiměřený práci tohoto typu, pouze snad až příliš často jsou citována různá review. Citaci článku v časopisu Živa nepovažuji za vhodnou.

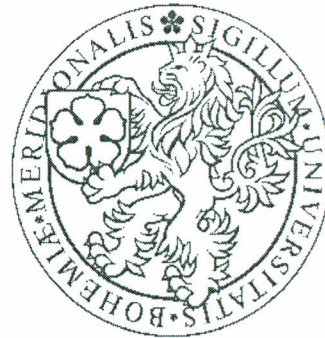
Celkově vzbuzuje předložená práce dobrý dojem a zmíněné výtky příliš nesnižují její kvalitu. Autorka snad mohla věnovat více času kontrole popisu metod. Na druhé straně lze vyzvednout závažnost tématu, pochopení problematiky a spektrum nepříbuzných metod, které autorka použila. Je jasné, že získané výsledky, jejichž kvantitu i kvalitu považuji z hlediska magisterského projektu za nadprůměrnou, představují teprve začátek dlouhé cesty. Diplomovou práci Bc. Martyiny Jonákové doporučuji k obhajobě a příslušné komisi navrhuji kladné hodnocení.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK
Viničná 7
128 44 Praha 2





Ivo Šauman
Biology Center AS CR
Institute of Entomology
Czech Academy of Sciences
and
University of South Bohemia
Faculty of Science
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
CZECH REPUBLIC



e-mail: sauman@entu.cas.cz

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Martiny Jonákové:

“Cirkadiánní rytmy u sekundární řasy *Chromera velia*”.

Předkládaná magisterská práce Martiny Jonákové je zaměřena na zjištění existence či neexistence funkčních cirkadiánních biologických hodin u relativně nedávno objeveného druhu symbiotické sekundární řasy *Chromera velia*. Jedná se o zcela průkopnickou práci, neboť dle dostupných informací nebyla žádná podobná studie u tohoto evolučně velice zajímavého organismu dosud publikována. Práci též dle mého názoru přidává na významu skutečnost, že se autorka pokusila o korelaci cirkadiánních rytmů na úrovni morfologické (pozorováním různých vývojových stádií této řasy) s rytmy molekulárními - na úrovni genové exprese dvou potenciálních kandidátů cirkadiánních hodinových genů. Z metodického přehledu je dále zřejmé, že autorka úspěšně zvládla celou řadu základních i pokročilejších metod molekulární biologie včetně kvantitativní Real Time PCR. Vlastní magisterská práce je napsána na 49 stranách a skládá se z anotace, úvodu, literárního přehledu, části materiál a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru a seznamu použité literatury. Celkem 88 citací původních vědeckých prací použitých při vypracování magisterské práce svědčí o schopnostech autorky samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou. Samotná práce je napsána přehledně, srozumitelně a čtivě s relativně malým počtem překlepů a chyb a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci. Velice také oceňuji stručné a srozumitelné vytyčení hlavních cílů práce.

K předkládané magisterské práci nemám žádné zásadní faktické připomínky. Na veškeré důležité otázky, které v průběhu čtení magisterské práce vyvstaly, autorka velice fundovaně odpověděla v diskuzi své práce. Pouze pro ujasnění žádám autorku o komentář k následujícím dotazům nebo připomínkám:

1. Část 4.4, strana 21: Co je to „nejlepší čtecí rámeček“?
2. Část 4.5, strana 22: Autorka zde uvádí, že použila „dva nespecifické primery“ s odkazem na Tab. 2. Pod pojmem „nespecifické primery“ bych si představoval použití tzv. degenerovaných primerů, ale žádný takový v Tab. 2 uveden není. Prosím o klarifikaci.
3. Část 4.10, strana 26: Pro čtenáře mimo obor cirkadiánních rytmů by bylo vhodné alespoň stručně objasnit, co je míněno pojmem „při režimu 12 : 12 a stejné intenzitě světla“.

4. Část 4.10, strana 27, obrázek 6: Zajímalo by mě, proč byly vždy první čtyři odběry vzorků prováděny po jedné hodině a zbývajících jedenáct odběrů po dvou hodinách.
5. Část 5.1, strana 29-30: Proč bylo pozorování cirkadiánní rytmicky bičíkatých stádií prováděno pouze v průběhu subjektivního dne (ZT0 – ZT12) a ne po celých 24 hodin, tak jako u měření exprese obou studovaných cirkadiánních genů?
6. Pomocí programu BLAST se podařilo nalézt pouze velice omezený počet kandidátů cirkadiánních genů u *C. velia*. Zajímalo by mě, jaké alternativní metodické (experimentální) přístupy by autorka navrhla pro hledání dalších kandidátů hodinových genů u tohoto organismu.
7. A poslední, spíše teoretický dotaz: Jakými genetickými přístupy by bylo možné prokázat, že nalezení kandidáti představují skutečné funkční geny cirkadiánních biologických hodin u *C. velia*.

Závěrem bych rád vyjádřil své přesvědčení, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a tudíž ji doporučuji k obhajobě.



V Českých Budějovicích dne 16.1.2012

Ivo Šauman