

Oponentský posudek na magisterskou práci bc. Anety Sládkové

Název: Neuroanatomie proteinu *Timeless* a jeho funkce v cirkadiálních a fotoperiodických hodinách larvy octomilky, *Chymomyza costata*

Školitel: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Konzultant: prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

Obecné zhodnocení:

Autorka předložené práce si předsevzala za cíl lokalizaci *Timeless*-pozitivních neuronů v mozku octomilky *Chymomyza costata*. Tento zajímavý modelový organismus si pro tuto práci vybrala z důvodu, že je na jedné straně velmi podobný (morfologicky i funkčně) octomilce *Drosophila melanogaster*, ale zároveň díky svému fotoperiodickému fenotypu umožňuje molekulárně biologickou analýzu funkce cirkadiálních i fotoperiodických hodin v jednom organismu a tak reálnými daty ověřit teoretický koncept jejich interakce. Předchozí poznatky o míře exprese genu *Timeless* u *C. costata* naznačují jeho odlišnou roli v porovnání s jeho úlohou v centrálním oscilátoru *D. melanogaster*. Navíc je zjevné, že gen *Timeless* je u této octomilky potřebný k indukci diapauzy. Nicméně přesná lokalizace a množství tohoto proteinu v CNS diapauzních a reprodukčně aktivních jedinců nebyla doposud uspokojivě osvětlena.

Celková kvalita práce:

Práce je standardně členěná, velmi kvalitně sepsaná s minimem pravopisných chyb, překlepů a jiných formálních nedostatků. Z hlediska rozsahu stran splňuje kladené podmínky na magisterské práce na Přírodovědecké Fakultě Jihočeské University. Nicméně, můj osobní dojem je, že experimentální práce není příliš propracovaná a rozhodně se na základě získaných poznatků nedá mluvit o naplnění vytyčených cílů.

Název práce: Dle mého úsudku název příliš neodráží téma předložené práce. O roli genu *Timeless* ve fotoperiodicky a cirkadiálních hodinách se toho příliš nedozvíme.

Úvod je poměrně dobře čtivě sepsaný. Autorka v něm provází čtenáře současnými poznatky o fungování cirkadiálních a fotoperiodických hodin, nicméně předložené informace nejsou dobře provázané a u některých odstavců mi unikal vztah k později nastíněným cílům práce. Naopak některé informace, které jsou pro pochopení práce podstatné, pak v úvodu zcela chybí (jako třeba role serotoninu a melatoninu v indukci diapauzy).

Cíl práce – myslím, že vhodnější by bylo definovat jasně testovatelné a ověřitelné cíle práce.

Metody – vzhledem k tomu, že byla v práci využita v podstatě jen jedna metoda, připadá mi text metod nesmyslně rozvlklý. Ve výsledku je pak sestavení samotného protokolu velmi komplikované. Mimo to mi neseď popis kombinace jednotlivých protilátek s následně použitými fluorescenčními kanály (vše je zobrazeno v zeleném kanále). Rád bych se také na delší chvíli zastavil u experimentu kolokalizací se sekvenční aplikací primárních a sekundárních protilátek ze stejného zvířete. Tento přístup považuji při analýze kolokalizace jako velmi obtížný a vyžadující celou řadu kontrol a optimalizací. Stejně tak by k detekci a následné subcelulární lokalizaci proteinů pomohlo strukturální barvení membrán a jader analyzovaných tkání. V metodách naprosto postrádám informace o počtu analyzovaných jedinců. Popis jednotlivých srovnávaných skupin je velice matoucí.

Lokalizace protilátky Per do jádra není nikterak potvrzena a tvrzení, že značí centrální oscilátor (což bylo mnohokrát ověřeno s *Drosophily*) je pochybné vzhledem k tomu, že třeba protein *Timeless* se ve své lokalizaci mezi těmito druhy liší.

Výsledky - jsou sepsány stručně a výstižně, přesto mám nějaké komentáře a dotazy...

1. Jak je možné, že signál získaný z kontrolních tkání inkubovaných jen s pre-imunním sérem značí buňky, které pak v tkáni s protilátkou chybí.
2. Zdá se, že *Per*-pozitivní buňky jsou lehce pozitivní na *Timeless* signál – dokonce jejich kolokalizace dává žlutý signál, jak to souvisí s rolí genu *Timeless* v cirkadiálním oscilátoru?
3. Zajímavým výsledkem je detekce buněk pozitivních na *Timeless* a Serotonin, které jsou v těsném sousedství a naznačující možnou vzájemnou interakci.
4. Nicméně pro posouzení colokalizace těchto signálů může být zásadní určení adekvátní cirkadiální fáze, protože se *Tim* exprese během dne mění (alespoň dle informací z úvodu). To bylo v práci ale zcela opominuto. Je podle autorky tento faktor důležitý, nebo se jedná jen o marginalitu.
5. Proč nebyla pro ko-lokalizaci použita protilátka z jiného zvířete?
6. V práci byly použité dvě protilátky proti genu *Timeless*. Ve výsledcích však nejsou plně rozlišené. Jak se od sebe liší a byl proveden pBLAST na určení jejich specifity?
7. Jak byl přesně vytvořen mutant ND, vzniká nějaký protein, případně RNA, kterou by bylo možné detegovat?

Diskuse a závěr jsou velmi povedené části práce, bohužel až tady se často čtenář setkává s novými informacemi a konečně chápe smysl celého experimentu.

I přes výše zmíněné kritické poznámky, považuji práci za způsobilou k obhajobě a jako výchozí známku pro skutečnou obhajobu navrhuji klasifikaci **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích, 7.7.2020 – Adam Bajgar, Ph.D.