

Posudek na magisterskou diplomovou práci Petra Klempta „Olfaktorické receptory spermií sociálních a solitérních hlodavců“

Práce P. Klempta (76 stran) se zabývá molekulární analýzou transkriptomu a expresí genů kódujících receptory tří skupin čichových receptorů (odorantové, vomeronasální, a receptory asociované se stopovými aminy) v čichových tkáních a testes dvou druhů myšic (*Apodemus sylvaticus* a *A. uralensis*). (Mimochodem, snad se jednou dožiju dne, kdy i na staroslavném Učení Karlově zoologové přijmou skutečnost, že *microps* je pouze mladším synonymem *uralensis* a začnou používat správný název. Národní hrdost je sice pěkná věc, ale snad se nebude zesnulý prof. Kratochvíl otáčet v hrobě, když budeme myšici malookou nazývat *Apodemus uralensis*.)

Autor si vytýčil 3 cíle: 1) pomocí 454 pyrosekvenování zjistit repertoáry těchto receptorů a porovnat je mezi oběma sledovanými druhy i oběma typy tkání; 2) změřit relativní míru exprese vybraných receptorových genů a 3) ověřit, zda se čichové receptory exprimují v jednotlivých stádiích spermatogeneze.

Bylo ukázáno, že testes obsahují bohatý repertoár čichových receptorů, z nichž některé zde byly popsány autorem práce vůbec poprvé (VR2, TAAR), byla odhalena i vysoká úroveň jejich exprese, která je u některých receptorů v testes dokonce signifikantně vyšší než jejich exprese v čichových tkáních. Dalším zajímavým zjištěním je odlišná hladina exprese odorantových a vomeronasálních receptorů u obou druhů myšic: zatímco u víceméně sociálně monogamní myšice malooké zřejmě vyšší nároky na výběr partnera vedou ke zvýšené expresi odorantových receptorů, pro promiskuitní myšici křovinnou je důležitější exprese genů účastnících se kompetice spermií (vomeronasální receptory).

Když pomínu drobné stylistické nedostatky (Abstrakt by měl být psán v první osobě jednotného čísla, transkriptomové sekvenování – správně sekvenování transkriptomu apod., cíle na str. 61-62 by neměly být součástí Výsledků, podobně některé další části Výsledků by měly být spíše součástí Diskuse) a překlepy (StarSoft na str. 62 a 64 – správně StatSoft, 10^9 na str. 61 – správně 10^{-9} , apod.) je práce velmi pěkná a svědčí o pílí autora. Podobně velký počet citací (cca. 120 položek) nasvědčuje dobré orientaci v literárních pramenech. Snad jen bych si dovolil upozornit na určitou nevyváženost práce: zatímco úvodní pasáže včetně rozsáhlého literárního přehledu (cca. 25 stran) a podrobný popis metod (cca. 20 stran) tvoří naprostou většinu rozsahu diplomové práce, Výsledky a Diskuse dohromady zabírají jen 15 stran. Na druhou stranu některé pojmy by si zasloužily alespoň stručné vysvětlení, např. je-li (vcelku oprávněně) věnovaná vyšší pozornost feromonům, alespoň několika slovy by měl být vysvětlen také termín kairomon; není jasné, co znamená hodnota A260/280 a A260/230 (v legendě k Tabulce 1 jsou tato označení 2x chybně); ne každý ví, co je to CDS primer; podobně ne každý čtenář je odborníkem na buněčné sortování – pojem FACS se v práci objevuje celkem 4x, nikde však tato zkratka není vysvětlena atd.

Také popis metodiky měření exprese by si zasloužil některé další informace. Např. kolikrát byl každý vzorek měřen? K tomu, aby bylo možno výsledky analýzy exprese pomocí qPCR považovat za spolehlivé, se doporučují minimálně 3 opakování, z popisu se však zdá, že každý vzorek byl měřen pouze jednou. Je tomu tak? Pokud ano, do jaké míry jsou podle autora naměřené hodnoty spolehlivé? Jak probíhalo stanovení kalibrační křivky? Asi by mělo být uvedeno, že geny RPLP1 a ATP5b použité jako standardy jsou tzv. „house keeping“ geny, jejich exprese by tudíž měla být stabilní v různých tkáních i různých obdobích ontogenetického vývoje. O genu RPLP1 však byly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi v srdečních buňkách v neonatálním a adultním stadiu. Myslíte si, že tato skutečnost mohla nějakým způsobem ovlivnit vaše výsledky? Pokud ano, proč nebyl použit např. mnohem častěji používaný aktin, který tímto problémem netrpí?

Další otázka se týká materiálu. Do jaké míry může být spolehlivost výsledků negativně ovlivněna skutečností, že byl analyzován pouze jeden samec od každého druhu v případě sekvenování a dva v případě měření exprese? Pravda, repertoár receptorů se mezi konspecifickými jedinci možná příliš neliší (ale můžeme se na to spolehnout?), ale hladina exprese už může mezi jedinci výrazně kolísat. K použité metodice nemám žádné další výhrady, snad jen na str. 62: pokud tomu rozumím správně, byly párově testovány rozdíly mezi druhy, mezi tkáněmi a navíc pro různé geny – v tom případě hrozí inflace chyby I. druhu („false positives“) a měla pravděpodobně být použita Bonferroniho korekce nebo jiná forma korekce hladiny významnosti.

Závěrem bych ještě jednou rád vyzvedl kvalitu práce. Jako člověk zabývající se hybridizací a speciací u domácích myší můžu jen doufat, že k podobnému typu analýz budou použity i tyto taxony. Jestliže feromony a čichová komunikace může „hrát zásadní roli při speciaci a tvorbě mezidruhových bariér“ (str. 24), pak je třeba mít na paměti, že při porovnávání dvou tzv. „dobrých“ druhů, jakými obě myšice bezesporu jsou, nedokážeme odlišit procesy a mechanismy vedoucí ke vzniku reprodukční bariéry mezi nimi od těch, které vznikly až v důsledku existence této bariéry. K podobnému účelu jsou proto mnohem vhodnější druhy incipientní, tj. druhy ve stadiu vzniku (*species in statu nascendi*). Práci samozřejmě doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 20. května 2013

Prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc.

P.S. Je-li to na Univerzitě Karlově zvykem, navrhuji známku výbornou (A). Pakliže tomu tak není, považujte tuto poznámku za bezpředmětnou.