ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC
INSTITUTE OF ANIMAL PHYSIOLOGY AND GENETICS
Laboratory of Mammalian Evolutionary Genetics
Brno, Czech Republic
Barbora Vošlajerová, Tel.: 532 290 138, Fax: 541 212 988, E-mail: barabimova@centrum.cz

Posudek na diplomovou práci Bc. Leony Havrdové: „Mechanismy přenosu chemických signálů u myšic rodu *Apodemus*"

Předložená diplomová práce se zabývá signály v chemické komunikaci u myšic rodu *Apodemus*, konkrétně identifikací lipokalinových proteinů v slinách a moči. Tyto proteiny jsou známé jako přenašeče signálů i samotné signální molekuly zejména u myši domácí.
Práce přináší velmi zajímavé výsledky: 1. Na rozdíl od myší, u myšic bylo prokázáno signifikantně vyšší množství kandidátních lipokalinů ve slinách a 2. Následná analýza vedla k potvrzení většiny sledovaných proteinů jako proteinů ze skupiny MUPs a OBPs 3. Mezi a vnitrodruhové srovnání kvantity jednotlivých proteinů odhalilo signifikantní rozdíly, které víceméně korespondují s dostupnými poznatky o sociálním systému a reprodukční strategii sledovaných druhů. Hlavním závěrem práce dle autorky je, že myšice patrně používají jiné mechanismy komunikace než myši, založené zejména na identifikovaných slinných proteinech.
K celkové práci a výše popsaným výsledkům mám dvě hlavní připomínky:

1. Na základě pouhé identifikace a přítomnosti kandidátních proteinů v sledovaných sekterech nemůžeme jasně formulovat závěr, že slouží ke komunikaci. I když výsledky mezi i vnitrodruhového porovnání četnosti proteinů korelují s reprodukčními strategiemi jednotlivých druhů, osobně bych v závěrech práce byla opatrnější, protože o přímé funkci těchto lipokalinů lze na základě výsledků jen spekulovat. **Máte nějaké důkazy, že myšice slinné proteiny opravdu ke komunikaci používají? Byly prováděny nějaké behaviorální analýzy (např. preferenční či výběrové testy, nebo testy zaměřené na allogrooming – autorkou v diskusi navržený možný mechanismus přenosu slinných signálů?).**

2. Práce se zabývá obecně signály v komunikaci myšic, těmito signály ale nutně nemusí být jen studované lipokaliny. Co další známé signály užívané v komunikaci, jako například MHC či právě ve slinách popsaná rozsáhlá skupina Androgen vážících proteinů (ABPs)? **Proč ostatním signálním molekulám není v práci věnován žádný prostor, a to ani v úvodu, kde by rozhodně měly být minimálně zmíněny?** Zejména v druhém případě (ABPs) myslím, že by v rozsáhlé a velmi recentní literatuře prof. Karna a prof. Laukaitis, jež v práci víceméně chybí, mohla autorka nalézt četné inspirace k interpretaci svých výsledků. **Identifikovali jste ve vašich vzorcích slin nějaké ABPs?**

Práce je velmi zajímavá, je sepsána srozumitelně a stručně, bohužel místy lehce na úkor jednoznačnosti (zejména v metodice viz dotazy níže). Práce se mi jeví maličko neučesaným a nevyváženým dojmem, jako by byla psána na poslední chvíli. Je zde poměrně rozsáhlý úvod, i když cíleně zaměřený jen na jednu (studovanou) skupinu kandidátních signálních molekul. Následuje stručná (dle mého místy neúplná) metodika, výsledky a v porovnání s úvodem sice jasná avšak dosti krátká diskuse. Mé domněnce odpovídají i relativně četné formální chyby (např. nejednotný formát citované literatury, latinská jména nejsou kurzívou, některé zkratky nevysvětlené, primární versus sekundární citace atd.).

Přesto jsem si práci se zájmem přečetla, a přes výše popsané drobné nedostatky nemám k práci výraznější připomínky. Níže uvádím některé poznámky, drobné připomínky a dotazy na diplomantku. **Prosím o zodpovězení pouze závažnějších dotazů - vyznačených tučně.**

3. Název práce neodpovídá obsahu, autorka se nezabývá mechanismy komunikace, nýbrž identifikací vybraných kandidátních signálních molekul. Bylo by tedy vhodnější např.: Identifikace lipokalinů v moči a slinách vybraných druhů myšic.

4. Abstrakt*: „... s využitím čipové elektroforézy .. byla vyloučena přítomnost lipokalinů v moči...“* Dále ve výsledcích, závěrech i diskuzi o vyloučení ale autorka nehovoří. Výsledky (graf. 5) prokazují proteiny s hmotností v daném spektru alespoň v minimálním množství u *A. sylvaticus* a ve větším u *A. uralensis*. Naopak virtuální gely v příloze 1. naznačují proteiny v daném spektru u některých jedinců *A. sylvaticus* a přítomnost daných „proužků“ chybí v moči *A. uralensis*. **Jsou tedy v moči obou druhů lipokaliny přítomny? Jak získala autorka data o relativní četnosti na základě gelů z čipové elektroforézy?**

5. Úvod Str. 16. Informační charakter MUPs – zapojení MUPs do komunikace. Jaký je rozdíl mezi body iii (MUP samotný má informační charakter) a iv (MUP interaguje přímo s olfaktorickými či vomeronasálními receptory)?

6. Úvod Str. 17: Proč je část o variabilitě MUPs mezi inbredními kmeny popisována v kapitole o poddruhově specifickém zastoupení? Byly zmíněné inbrední kmeny vybírány jako zástupci různých poddruhů? Klasické inbrední kmeny jsou totiž geneticky v převážné většině podobné poddruhu *M. m. domesticus* a nižší variabilita mezi nimi (než v divokých populacích) může být důsledkem právě odvození inbredních kmenů od několika málo původních jedinců a jejich vzájemná příbuznost.

7. Úvod Str. 18. U divokých samic nedochází k variabilitě MUPs v přítomnosti samce, respektive k zvýšení produkce MUPs (Stopka et al. 2007) což je v protikladu s experimenty s inredními kmeny. Vysvětlení, že důvodem je vyšší stres z přítomnosti samce se mi jeví jako nedostatečné, obzvláště uvažujeme-li o MUPs jako signálech jež by samice měly užívat aby právě samci signalizovaly svůj reprodukční stav. Není zde na místě spíše diskutovat biologický význam celkového množství MUPs? Co už je dostatečné pro signalizaci?

8. Úvod Str. 18. Individuální podpis a příbuznost. Závěr odstavce popisujícího variabilitu MUPs jako možného individuálního podpisu a schopnost rozpoznávání jednotlivých haplotypů jako mechanismu vedoucímu k vyhnutí se příbuzenskému křížení. Následuje rychlý obrat, že výsledky jsou kontroverzní, s odkazem na disperzi dospívajících samců a citace článku Janotová a Stopka 2009. Máte nějaká data o disperzi a reprodukci dospívajících samců mimo rodný dem? Tedy že by se dále nesetkávali s rodičovskými haplotypy? Myslím, že v literatuře podobná data dosud chybí a citovaný článek je pouze review a nepřináší původní data.

9. Úvod Str. 19. Pohlavní výběr: odstavec víceméně duplikuje odstavec iv. Individuální podpis, avšak zde je naopak popisována preference heterozygotních MUPs jež je v odstavci iv. rozporována.

10. Úvod Str. 20. Proč se primárně autorka věnuje prasečímu slinnému proteinu a nikoli slinným proteinům popsaným u myší (a to nejen z řad lipokalinů)? Přeci jen je myš podobnější myšici než prase.

11. Úvod str. 24-26: celá pasáž o cílové tkáni je dosti zkratkovitá a s prací až tak nesouvisí, vzhledem k tomu že se práce věnuje identifikaci signálních molekul a nikoli dále její percepci a mechanismu komunikace prostřednictvím těchto signálních molekul

12. Úvod str. 27: Etologie a ekologie myšic rodu Apodemus – u nás žije ještě čtvrtý druh *A. agrarius,* o kterém v celé práci není nikde zmínka. **Proč je tento druh zcela opominut?** (a to i v úvodu?). Vzhledem k výrazné agresivitě samců myšice temnopásé by bylo zajímavé též srovnání s tímto druhem. **Máte nějaká data také o tomto druhu?**

13. **Metodika:** celá kapitola metodiky je psána velmi stručně a to na úkor jasnosti a srozumitelnosti. Seznamy chemikálií v jednotlivých pufrech a roztocích, stejně jako seznam použitého vybavení (jež dokládá spíše kvalitu laboratoře než schopnosti studenta) mohli být uvedeny až v příloze (pokud vůbec). Na místo toho by bylo vhodnější zmínit výběr testovaných druhů a jedinců, upřesnit sběr dat a vzorků, analýza získaných dat a následné statistické zpracování, které například v práci zcela chybí.

    Mapa obr. 3 znázorňuje 6 lokalit odchytu, avšak vždy bylo testováno jen 5 párů od každého druhu. **Jak byli vybíráni jedinci pro odběr vzorků? Pocházeli jedinci jednoho druhu ze stejné lokality, či**

z více, nebo naopak z každé lokality byl testován vždy jen jeden pár z každého druhu? Byly stejné druhy odchyceny na stejné lokalitě?

14. Práce porovnává proteiny v sekterech dvou blízce příbuzných a morfologicky velmi podobných druhů myšic – lesní a křovinné. **Jak byly oba druhy odlišeny?** Je známo, že oba druhy odlišit na základě morfologie, zejména u mladých jedinců, je velmi obtížné a velmi nespolehlivé. Oba druhy jde potvrdit geneticky pomocí jednoduché PCR reakce. Metodika jest popsána v práci citovaném článku Bryja et al 2008. **Jste si jistí, že nemohlo dojít k záměně jedinců obou druhů?**

15. **Str. 32- odběr vzorků: Tabulka 2 – Proč je u moči myši domácí objem vzorku 10x menší než u ostatních vzorků? Jak probíhal odběr vzorků?** – Byly odběry hned napoprvé úspěšné? Pokud ne, za jak dlouho byl odběr opakován?, byly takto získané vzorky míchány**?**

16. Str. 33. Vyhodnocení dat z Experionu: … pro kvantitativní analýzu byla použita data shrnutá ve výsledné tabulce (Single table) **– Jaká je to tabulka? A kde se v práci nachází? Jak byla z čipové elektroforézy a virtuálních gelů určena četnost sledovaných proteinů?** Autorka píše, že pomocí této metody byla potvrzena či nepotvrzena přítomnost proteinů. Pak ale by bylo data třeba testovat ANCOVOU nikoli ANOVOU, neboť se jedná o kategoriální proměnnou a ne kvantitativní. Autorka ale evidentně pracuje s kvantitativními daty. **Jak je tedy definována četnost proteinu?** Pokud je to počet proužků na gelu ve sledované oblasti (17-24kDa) **jak víte, že každý proužek opravdu představuje lipokaliny a né jiné proteiny o shodné velikosti?**

17. V práci je testována a porovnávána kvantita sledovaných proteinů mezi různými vzorky (pohlaví, druhy…). Vzorky byly odebírány buď odmočením, či výplachem dutiny ústní. Z vlastní zkušenosti vím, že tak získáme nejen různé množství, ale též různě koncentrované vzorky, závislé na aktuálním fyziologickém stavu odebíraného zvířete. Odlišná koncentrovanost vzorků může následně ovlivnit porovnávanou kvantitu sledovaných proteinů. **Jak je v práci ošetřena koncentrace odebraných vzorků?**

18. Diskuse je psána stručně a jasně.

    Str. 44. „moč obou druhů myšic… neobsahuje statisticky významné množství proteinů…“ proto jsme usoudili, že myšice využívají chemickou komunikaci založenou na jiném principu….“ **Co znamená statisticky nevýznamné množství ve vztahu k biologické významnosti potřebného množství signálu k úspěšné komunikaci? Kolik proteinů je třeba ke komunikaci?** Dále se v diskusi opakovaně vztahuje množství proteinů (respektive četnost proteinů) a „lepší“ komunikace popř. selekční tlak na více nalezených proteinů u více promiskuitních druhů. **Existují nějaké práce, které by prokazovaly, že má-li zvíře více variant proteinu, nebo celkově více proteinů, pak komunikuje lépe či více?**

Přes některé dílčí nedostatky jsem přesvědčena, že diplomová práce Leony Havrdové je kvalitní, dobře zpracovaná a přináší některé zajímavé poznatky. Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Sitné 10.9. 2014

RNDr. Barbora Vošlajerová, Ph.D.