

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra zoologie



**Evoluce a exprese odoranty vázajících proteinů
u vybraných zástupců rodu *Mus***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

David Vinkler

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Pavel Stopka, PhD.

Konzultant: Mgr. Romana Stopková, PhD.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 8. 2011

Poděkování

Děkuji svému školiteli, Pavlu Stopkovi, za jeho ochotné a trpělivé vedení této práce. Dále bych chtěl poděkovat Romaně Stopkové za pomoc s experimentální částí práce a rovněž za četné konzultace. Nelze opomenout ani ostatní členy naší laboratoře, které nebudu uvádět jmenovitě, abych náhodou na někoho nezapomněl. V neposlední řadě náleží obrovský dík mým rodičům, a to za jejich obětavou a nikdy neutuchající podporu během celého mého studia.

Abstrakt

OBP představují malé, ve vodě dobře rozpustitelné proteiny, které jsou ve velkém množství exprimovány v blízkosti čichových neuronů, a jejichž hlavním úkolem je vázat a přepravovat lipofilní odoranty ve vodném prostředí nosní sliznice savců a jiných obratlovců. Ačkoliv OBP známe bezmála 30 let, a víme toho poměrně dost o jejich struktuře a molekulární podstatě, máme stále velmi málo informací o genové expresi těchto proteinů a funkcích, které v organismu vykonávají. Tato práce přináší nové poznatky ohledně tkáňové specificity OBP a předkládá několik nových sekvencí genů řídících tyto proteiny u vybraných zástupců rodu *Mus*.

Klíčová slova: odoranty vázající proteiny, evoluce, genová exprese, shluky genů, genová duplikace, myš

Abstract

Odorant-binding proteins (OBPs) are small soluble proteins expressed at high levels in the proximity of olfactory receptors. OBPs act as solubilizers and carriers of the lipophilic odorants in the aqueous mucus of mammals and other vertebrates. OBPs have now been studied nearly thirty years, but in comparison to the wealth of data available on their structural chemistry and molecular biology, our knowledge about gene expression and function of these proteins is still insufficient. This work provides new insights into the tissue specificity of OBP and presents several new sequences of genes governing these proteins in selected species of mice.

Key Words: odorant-binding proteins, evolution, gene expression, gene clusters, gene duplication, mouse

Obsah

1. Úvod.....	6
1.1 Chemická komunikace a přidružené jevy	6
1.2 Odoranty vázající proteiny	13
1.3 Krátký exkurz do fylogeneze rodu <i>Mus</i>	21
1.4 OBP: Současný stav poznání u myši domácí	25
2. Cíle práce	27
3. Materiál a metody	28
3.1 Původ biologického materiálu.....	28
3.2 Odběr vzorků a izolace RNA	28
3.3 Sekvence.....	30
3.4 Genotypizace	35
3.5 Genová exprese	39
4. Výsledky	42
4.1 Sekvence.....	42
4.2 Genotypizace	50
4.3 Genová exprese	58
5. Diskuse.....	65
6. Závěr.....	69
7. Seznam použité literatury.....	70
8. Přílohy	80
8.1 Seznam aminokyselinových sekvencí použitých pro zkonstruování evolučního stromu savčích OBP	80

1. Úvod

1.1 Chemická komunikace a přidružené jevy

Nejprve je třeba zdůraznit, že tato podkapitola by neměla suplovat úvod do studia chemické komunikace jako takové, jejím hlavním cílem je zasadit níže řešenou problematiku do širších souvislostí a zároveň vytyčit jakýsi myšlenkový rámec, v němž bychom se měli pohybovat po zbytek této práce.

Všechny živé organismy na Zemi nějakým způsobem vnímají chemické látky přítomné v jejich prostředí. Chemická signalizace patří k evolučně nejstarším a současně nejrozšířenějším formám dorozumívání a orientace ve světě živé přírody, čehož si vcelku záhy všiml i člověk. První písemné zmínky o účincích nejrůznějších substancí na chování lidí a zvířat se datují již z dob raně historických (Rabelais 1565), byť ještě nemají charakter vědeckého pojednání. V roce 1609 Charles Butler popsal, jak jediné uvolněné včelí žihadlo dokáže atrahovat a k útoku vyprovokovat ostatní včely (Butler 1609). Dnes víme, že původcem tohoto jevu je isopentyl-acetát, aktivní složka poplašného feromonu, jenž svolává dělnice k obraně úlu a podněcuje v nich útočnost vůči vetřelcům (Boch et al. 1962). Pionýrské studie chemické komunikace mezi samcem a samicí pocházejí z pera velkého francouzského přírodopytce 19. a počátku 20. století, J. H. Fabreho (Fabre 1879). Definitivní potvrzení existence sexuálních atraktantů však přinesly až experimenty na konci padesátých let minulého století, kdy laureát Nobelovy ceny, německý biochemik Adolf Butenandt, izoloval ze samic bource morušového (*Bombyx mori*) látku nazvanou bombykol (Butenandt et al. 1959). Jednalo se o první určení chemické struktury látek ovlivňujících vnitrodruhové (intraspecifické) chování organismů – feromonů.

Termín feromon zavedli v polovině předešlého století Karlson a Lüscher (1959), a to pro přírodní chemikálie, které jsou do prostředí vylučovány jedincem určitého druhu a u jiného jedince téhož druhu po přijetí spouštějí specifické behaviorální nebo fyziologické reakce. Jak už napovídá sám název (z řeč. *pherein* – přenášet a *hormon* – stimulovat) a fakt, že se jim dříve říkalo ektohormony, feromony mají leccos společného právě s „pravými“ hormony (povětšinou je produkují a sekretují specializované žlázy; jsou vysoce účinné i ve velmi malém množství; vážou a transportují je speciální bílkoviny). Přesto mezi nimi existují zjevné rozdíly, na základě kterých je definujeme. Zatímco hormony jsou zpravidla uvolňovány soustavou endokrinních žláz přímo do krevního oběhu živočicha nebo působí lokálně v místě/tkání svého vzniku, feromony jsou žlázami s vnější sekrecí vyměšovány na povrch

těla a šířeny dále do vnějšího prostředí. Prvně jmenovaní regulují životní funkce jednotlivých orgánů a významně se podílejí na udržování homeostázy daného organismu, kdežto druzí hrají roli jakéhosi komunikačního posla mezi jedinci stejného druhu (Karlson a Lüscher 1959). Feromony jakožto fylogeneticky velmi staré a univerzální chemické signály nalezneme v celé živočišné říši různými bezobratlými počínaje až k savcům, člověka nevyjímaje, přičemž rozlišujeme řadu funkčních typů. Rozeznáváme kupříkladu feromony sexuální (vábí opačné pohlaví), agregáčn (jedinci se pod jejich vlivem shromažďují do velkých shluků), již zmíněné poplašné (vyvolávají únikové nebo obranné reakce) či značkovací a orientační (navádí třeba ke zdroji potravy) (Wyatt 2003). Podle druhu účinku je dále dělíme na působkové feromony (primers), které způsobují dlouhodobější změnu fyziologie recipienta a posléze i změnu jeho chování, a feromony-spouštěče (releasers), které bezprostředně po přijetí spouštějí určité chování (McClintock 1998, Brennan a Zufall 2006).

Feromony patří mezi takzvané semiochemikálie, konkrétněji řečeno infochemikálie, tedy látky používané organismy pro chemický přenos informace, kam kromě nich řadíme ještě mediátory mezidruhové (interspecifické) komunikace, kterým říkáme allelochemikálie (Regnier 1971, Dicke a Sabelis 1988). Ty rozdělujeme na základě toho, zda je signál výhodný pro vysílatele nebo příjemce, na allomony (přinášejí užitek vysílateli signálu), kairomony (přinášejí užitek příjemci signálu) a synomony (přinášejí užitek oběma) (Sbarbati a Osculati 2006). Současná definice semiochemikálií zahrnuje rovněž v prostředí přítomné živiny a toxiny, které na rozdíl od výše uvedených infochemikálií nemusí nutně přenášet nějaký signál, neboť jsou pro daný organismus prospěšné či škodlivé samy o sobě (Nordlund a Lewis 1976). Nicméně obě skupiny se navzájem prolínají a doplňují, poněvadž i živiny a toxiny mohou v některých případech nést určitou informaci; rozlišit mezi nimi je proto mnohdy neskutné, záleží na jaký funkční aspekt zrovna klademe důraz.

Většina organismů a zvláště pak živočichů není při vzájemném dorozumívání odkázána jen na chemické podněty, pro předávání zpráv využívají různé informační kanály, které dle momentální potřeby všelijak kombinují. Vedle pachového známe kanál akustický, optický či elektrický. Nelze opomenout ani dotykovou neboli taktilní komunikaci. Volba vhodného transportního kanálu se odvíjí převážně od receptorové výbavy určité živočišné skupiny a závisí samozřejmě rovněž na konkrétní situaci (Veselovsky 2005). V úplné tmě by kupříkladu demonstrace chrupu – za světla jinak velmi účinný signál hrozby některých savců – byla nesmyslná a ve výsledku také poněkud marná. Je zřejmé, že každý kanál má své výhody a nevýhody (tabulka 1). Pachové signály snadno překonávají terénní překážky a nejsou energeticky náročné; hlavní předností je však jejich daleký dosah a to, že pachová značka

poměrně dlouho účinkuje i bez přítomnosti vysílajícího, byť po jisté době vyprchá a je třeba ji obnovit. Na druhou stranu se pachy pomalu šíří a jejich přesná lokalizace může být vinou nepříznivých povětrnostních podmínek značně ztížena (Franck 1996).

Chemickým sloučeninám, které jsou nositeli pachu, říkáme odoranty. Abychom mohli nějakou látku prohlásit za odorant, musí splňovat dvě základní podmínky: musí být těkavá, aby pronikla skrz nosní sliznici k čichovým receptorům, a zároveň musí být přítomna v dostatečně vysoké koncentraci, aby podráždila čichové neurony. Potenciálním zdrojem pachu mohou být veškeré látky ať už organického, nebo anorganického, charakteru, které do prostředí uvolňují molekuly, poněvadž právě ty tvoří podstatu nejrůznějších pachů. Odoranty přinášejí celou řadu důležitých informací: signalizují přítomnost potravy nebo naopak predátora, živočich se díky nim orientuje ve svém životním prostředí, vyhýbá nebezpečí (Touhara a Vosshall 2009).

Tabulka 1 Typy signálů a jejich vlastnosti. (Upraveno podle Alcock 1984 in Veselovsky 2005, s. 189).

	Typ signálu			
vlastnosti	chemický	akustický	optický	hmatový
dosah	daleký	daleký	omezený	krátký
šíření	pomalé	rychlé	rychlé	rychlé
omezení překážkou	ne	ne	ano	ano
lokalizace	variabilní	střední	dokonalá	dokonalá
energetický výdaj	malý	vysoký	malý	malý

Jak jsem již uvedl na začátku, chemicky zprostředkované interakce mezi organismy a jejich okolím náleží k vývojově nejstarším komunikačním projevům. Není proto žádným překvapením, že chemoreceptory zachycující chuťové a čichové podněty (vést mezi nimi ostrou hranici je zvláště u vodních skupin obtížné) mají rovněž všichni obratlovci. Zatímco chuťové pupeny nebo pohárky mohou být u nižších obratlovců různě roztroušeny i na povrchu těla, čichové vjemy jsou registrovány velkým počtem receptorů, které jsou soustředěny do anatomicky samostatného systému – čichového orgánu (Gaisler a Zima 2007). Ten u čelistnatců zprvu tvoří pár směrem k tělu slepých váčků na předním konci hlavy, jejichž komunikaci s vnějším prostředím zajišťují vnější nozdry (*nares*). Během evoluce se pak u některých svaloploutvích vyvinuly ještě vnitřní nozdry (*choanae*), jež spojují čichové váčky s

dutinou ústní (Roček 2002). Tyto vnitřní nozdry zřejmě představovaly důležitou predispozici pro přechod obratlovců na souš, proto není divu, že je po svých předcích zdědili také všichni čtvernožci dýchající vzdušný kyslík. Dutiny čichových váčků u nich vytvářejí složitý labyrint chodeb a záhybů vystlaných čichovou sliznicí, který zároveň slouží jako přivaděč vzduchu do dýchacích orgánů (Roček 2002). Novinkou čtvernožců je také spojení nosních dutin s vnitřním koutkem oka v podobě slzných kanálků (Gaisler a Zima 2006).

U některých obojživelníků, plazů a řady savců můžeme kromě vlastního čichového orgánu najít ještě takzvaný vomeronasální neboli Jacobsonův orgán, který leží ve formě slepých kapes na dně přední části nosní dutiny (Halpern a Martínez-Marcos 2003). Vomeronasální orgán přijímá stimuly z nosní nebo ústní dutiny (v závislosti na druhu) prostřednictvím aktivního čerpacího mechanismu, jehož podstatou je vazokonstrikce cévek, která vede k silnému toku hlenu do kapes tohoto orgánu (Meredith a O'Connell 1979). Tento orgán postrádají želvy, krokodýli, ptáci a někteří savci, naproti tomu nabyl nebývalého významu u šupinatých plazů.

V otázce evolučního původu a funkce vomeronasálního orgánu není dosud jasno. Většina biologů je toho názoru, že vomeronasální systém není odpovědí na terestrický způsob života, a to ze dvou dobrých důvodů: mají jej recentní obojživelníci žijící ve vodě a paleontologické důkazy svědčí o tom, že poslední společný předek obojživelníků a blanatých obratlovců byl vodní živočich (Eisthen 1997). Obecně se mělo za to, že čichová sliznice a vomeronasální systém vykonávají odlišné funkce. Zatímco čichová sliznice měla být zodpovědná za vnímání obecných odorantů, vomeronasálnímu systému byla přisuzována role v percepce feromonů. Recentní studie demonstrovaly, že oba chemosenzorické systémy se do značné míry funkčně překrývají, poněvadž i čichová sliznice je zapojena do detekce feromonů (Xu et al. 2005, Tirindelli et al. 2009).

Chemoreceptory jak čichové sliznice, tak vomeronasálního orgánu mají podobu bipolárních smyslových buněk umístěných různě hustě v podpůrném epitelu, který je u suchozemských obratlovců prostoupen i mukózními buňkami (Halpern 1987, Meredith 1991, Halpern a Martínez-Marcos 2003, Tirindelli et al. 2009). Specifikem těchto smyslových buněk je to, že jejich vlákna vedou přímo do mozku – v prvním případě do hlavního čichového laloku (main olfactory bulb) a v druhém do vedlejšího čichového laloku (accessory olfactory bulb) (Halpern 1987, Meredith 1991, Liman 1996, Brennan a Zufall 2006, Tirindelli et al. 2009). Zatímco hlavní čichový lalok zprostředkovává přenos pachových vjemů k čichovým centrům hemisfér koncového mozku, vedlejší čichový lalok aktivuje primitivní struktury mozku jako je amygdala a hypotalamus, které jsou spojeny s emočními prožitky,

agresivitou, ovlivňují sexuální chování a rozmnožování a v neposlední řadě se podílejí na humorálním řízení organismu (Wysocki 1978, Halpern 1987, Meredith 1991, Meredith 1998, Halpern a Martínez-Marcos 2003, Tirindelli et al. 2009).

Vlastní vyhodnocení čichového vjemu je poměrně složitý proces, který mimo jiné závisí na tom, zda se určitý živočich s daným typem pachového signálu setkal již v minulosti. Jestliže se některé pachové podněty pravidelně opakují, jedinec si je ukládá do takzvané čichové paměti – příslušný podnět pak vyvolá odpovídající reakci i po delší době (Meredith 1998).

Z obratlovců dosáhli vrcholu ve vývoji čichového orgánu zejména savci, kteří jsou jeho prostřednictvím schopni rozlišit tisíce různých pachů. Vnímání pachů je řízeno nadrodinou genů pro čichové receptory (olfactory receptors), což jsou transmembránové receptory spřažené s G proteinem (G-protein coupled receptors), které se skládají ze sedmi v plasmatické membráně zanořených alfa šroubovic, na něž je ze spodní strany napojen G protein (Buck a Axel 1991). Předpokládá se, že třetí, pátá a šestá alfa šroubovice tvoří kapsu, do které se navážou molekuly odorantů, čímž dojde k aktivaci G proteinu na vnitřní straně membrány (Buck a Axel 1991, Hall et al. 2004, Katada et al. 2005). Ten se odloučí od receptoru a spustí signalizační kaskádu uvnitř buňky. Obecně se soudí, že každý čichový neuron exprimuje pouze jeden nebo nanejvýš několik málo ze stovek možných funkčních genů pro čichové receptory (Chess et al. 1994, Kishimoto et al. 1994, Malnic et al. 1999, Serizawa et al. 2000), avšak poslední práce ukazují, že tomu tak být nemusí (Mombaerts 2004). Na druhou stranu bylo prokázáno, že neurony exprimující stejné receptory tvoří v čichové sliznici jakési ohraničené, diskrétní populace (Strotmann et al. 1992, Vassar et al. 1993, Strotmann et al. 1994).

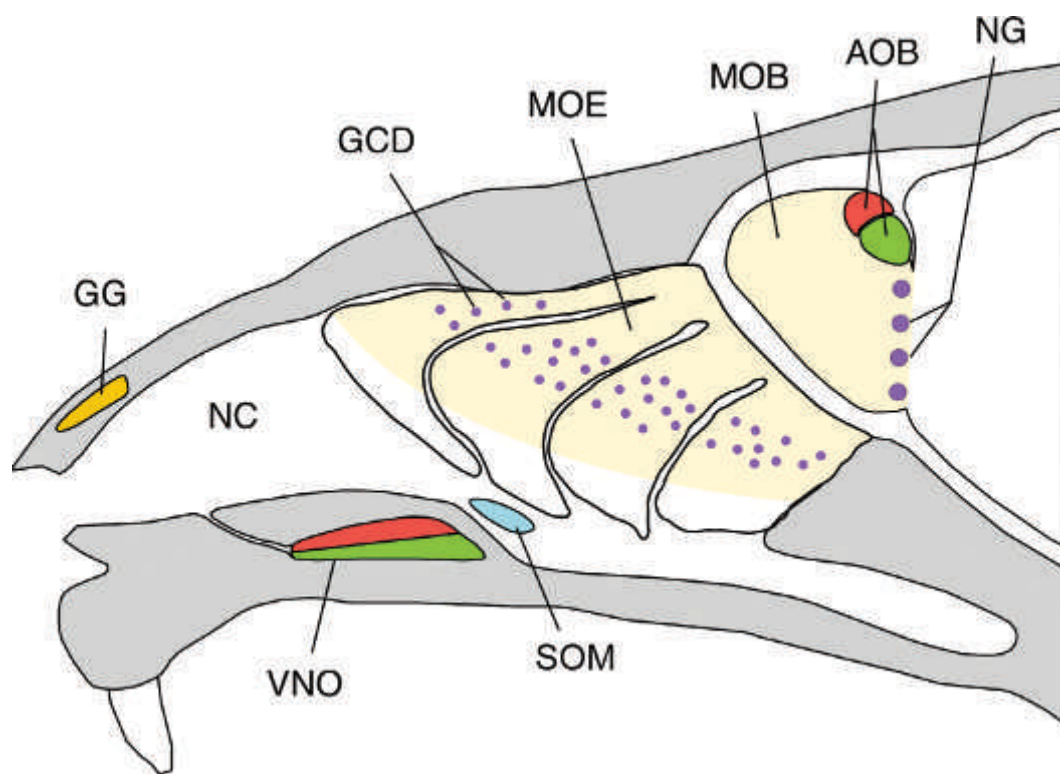
Tato extrémně početná rodina, v rámci obratlovců vůbec největší, má zhruba 1000 členů, což odhadem představuje asi každý třicátý až padesátý gen savčího genomu, nicméně zde existují výrazné mezidruhové rozdíly v jejich počtu (Young et al. 2002). Navíc nezanedbatelnou část tvoří pseudogeny. Například z přibližně 800 genů kódujících čichové receptory je u člověka plných 50 % pseudogenů (Glusman et al. 2001, Zozulya et al. 2001, Niimura a Nei 2003). Naproti tomu u myši, jejíž genom obsahuje okolo 1 400 těchto genů, činí podíl pseudogenů jen 20–25 %, z čehož vyplývá, že myš má bezmála třikrát tolik funkčních genů pro čichové receptory nežli člověk (Zhang a Firestein 2002, Young et al. 2002, Niimura a Nei 2005). Přes 1000 genů pro čichové receptory mají kromě myši ještě druhy jako potkan či vačice, kdežto na opačném konci spektra stojí primáti včetně zmíněného člověka nebo zástupce ptakořitných, ptakopysk, u kterých nalezneme méně než 400 těchto

genů (Niimura a Nei 2007). Je tedy zřejmé, že velikost této genové rodiny se v průběhu evoluce značně mění, přičemž počet funkčních genů v jednotlivých liniích je důsledkem dlouhodobé interakce mezi duplikacemi genů na jedné straně a jejich ztrátami na straně druhé – podle funkčních požadavků daného druhu (Niimura a Nei 2007).

Poměrně nedávno byla u myši objevena druhá rodina čichových receptorů, které označujeme zkratkou TAARs (trace amine-associated receptors) (Liberles a Buck 2006). TAARs jsou v určitých ohledech podobné receptorům pro biogenní aminy jako je serotonin nebo dopamin. Tato nová rodina zahrnuje u myši 15 členů, které jsou, s výjimkou TAAR1, exprimovány v čichové sliznici (Liberles a Buck 2006). Bylo zjištěno, že nejméně čtyři tyto receptory váží malé molekuly aminů, přičemž každý z nich rozpoznává specifickou sadu ligandů, mezi něž patří β -fenylethylamin, isoamylamin a trimethylamin, které jsou přirozenou součástí myší moči (Tirindelli et al. 2009). β -fenylethylamin, ligand pro mTAAR4, je obsažen v moči lidí a hlodavců, jeho koncentrace stoupá v situacích, kdy je zvíře vystaveno stresu (Paulos a Tessel 1982, Snoddy et al. 1985, Grimsby et al. 1997). Isoamylamin a trimethylamin – první se váže na mTAAR3, zatímco druhý na mTAAR5 – jsou ve vysokých koncentracích přítomny v samčí moči (Nishimura et al. 1989). Bylo prokázáno, že isoamylamin působí jako feromon, jenž urychluje nástup puberty u samic myši (Nishimura et al. 1989), což spolu s výše řečeným poukazuje na roli těchto receptorů v sociálním chování (Tirindelli et al. 2009).

Některí vačnatci, hmyzožravci, hlodavci, šelmy a kopytníci mají zachován vomeronasální orgán (Halpern a Martínez-Marcos 2003). Na rozdíl od šupinatých plazů ho však zřejmě používají jen za určitých okolností, třeba v souvislosti s rozmnožováním. Například kopytníci a kočkovité šelmy určují říjnost samice tím, že pootevřou tlamu, vyhrnou horní pysky a nasají pachové podněty až do vomeronasálního orgánu. Toto zvláštní gesto, známé jako flémování, lze pozorovat i u samic některých savců. Vomeronasální systém se podle všeho uplatňuje rovněž v agresivním a rodičovském chování nebo při individuálním rozpoznávání jedinců (Halpern a Martínez-Marcos 2003).

Kromě toho najdeme v čichovém systému savců ještě další, ne tak známé, chemosenzorické oddíly jako je například Maserův septální orgán (Septal organ of Maser) a nervový uzel Gruenberga (Gruenberg ganglion), jejichž funkce však není dosud plně objasněna. Přehled jednotlivých chemosenzorických oddílů savců podává na příkladu myši obrázek 1.



Obrázek 1 Čichový systém myši. Schéma zobrazuje jednotlivé chemosenzorické oddíly v čichovém systému myši. MOE – hlavní čichová sliznice; VNO – vomeronasální orgán; MOB – hlavní čichový lalok; AOB – přídatný čichový lalok. Chemosenzorická funkce nebyla ještě ustanovena pro takzvaný „the guanylyl cyclase type-D system“ (GCD) a nervový uzel Gruenberga (Grueneberg ganglion; GG). NC – nosní dutina; NG – glomeruli olfactorii; SOM – Maserův septální orgán. (Převzato z Brennan a Zufall 2006).

Důležitou otázkou je to, jak se molekuly chemických látek dostanou k čichovým receptorům. U původně vodních obratlovců jsou transportovány proudem vody, kdežto u suchozemských obratlovců je nosičem pachových vjemů vdechovaný vzduch, což představuje určitou potíž. Problém spočívá v tom, že čichové receptory jsou u terestrických živočichů lokalizované ve vodném prostředí nosní sliznice (u členovců plní analogickou funkci výběžky kutikuly s chemoreceptory zvané sensilly), ačkoli detekují odoranty, které jsou primárně hydrofóbní. Jinými slovy, aby se jakákoli hydrofóbní molekula nesoucí určitou informaci dostala až na místo transdukce signálu, to jest k membráně čichového neuronu, musí napřed nějakým způsobem překonat hydrofilní bariéru nosní sliznice, která izoluje čichové receptory od vnějšího prostředí. Jedním z možných řešení mohou být přenašeče bílkovinné povahy jako jsou například odoranty vázající proteiny (odorant-binding proteins; dále jen OBP), které se ve velkém množství pohybují v blízkosti olfaktorických neuronů a kolem nichž se bude točit jádro této práce.

1.2 Odoranty vázající proteiny

Na úvod nutno podotknout, že na našem pracovišti se vzhledem k jeho zaměření zabýváme pouze problematikou obratlovčích OBP. Tato práce a následující text se tedy bude – pokud nebude uvedeno jinak – týkat hlavně jich.

Analogické proteiny totiž nacházíme rovněž u hmyzu (Hekmat-Scafe et al. 2000), kde sice hrají podobné role, jaké přisuzujeme i jejich obratlovčím protějškům, nicméně strukturně se od nich značně liší (Pelosi 1998). Obecně se soudí, že OBP hmyzu a obratlovců mají nezávislý původ a k obdobným funkcím dospěly v důsledku dlouhého konvergentního vývoje (Pelosi 1998, Steinbrecht 1998). Nasvědčuje tomu i fakt, že k přechodu na souš došlo opakovaně v několika různých liniích živočichů, přičemž lze předpokládat, že se nějakí předchůdci OBP jakožto adaptace k terestrickému způsobu života objevily už během počátečních fází osidlování pevniny.

OBP představují malé (17–20 kDa), ve vodě dobře rozpustitelné proteiny, které jsou ve velkém množství exprimovány v blízkosti olfaktorických neuronů, a jejichž hlavním úkolem je vázat a přepravovat lipofilní odoranty ve vodném prostředí nosní sliznice savců a jiných obratlovců (Pelosi 1994, Pelosi 1998, Steinbrecht 1998). Tato poněkud vágní a neúplná definice vymezuje OBP vůči ostatním funkčně či strukturně spřízněným proteinům na základě dvou kritérií: prvním je tkáňová lokalizace a druhým schopnost vázat rozličné těkavé sloučeniny, tedy potenciální odoranty (Tegoni et al. 2000). Zejména druhé uvedené hledisko lze označit za dosti problematické, poněvadž odoranty nereprezentují žádnou jasně a jednoznačně definovanou třídu sloučenin. Prakticky jakákoli molekula chemické látky, která je dostatečně malá (menší než 300–400 relativní molekulové hmotnosti) a volatilní, aby dosáhla čichové sliznice, může být prohlášena za odorant, a to bez ohledu na její strukturu nebo fyzikálně-chemické vlastnosti (Tegoni et al. 2000). Navíc – jak postupně uvidíme – ani první kritérium není bez chyb. Prozatím nám však nezbyvá nic jiného než se této, třeba nevyhovující, definice přidržet.

Přes výše uvedené nejasnosti to byla právě schopnost vázat nejrůznější ligandy, jež stála za objevením OBP, a to jak u obratlovců, tak u hmyzu. Zatímco vůbec první obratlovčí OBP byl izolován z nosní sliznice skotu prostřednictvím velmi silného odorantu, 2-isobutyl-3-methoxypyrazinu (Pelosi et al. 1982, Bignetti et al. 1985), jeho hmyzí protějšek byl identifikován u můry druhu *Antheraea polyphemus* pomocí jejího specifického sexuálního feromonu (Vogt a Riddiford 1981). Tento rozdíl obě rodiny nadále dobře charakterizuje, neboť celá jedna třída hmyzích OBP váže feromony (pheromone-binding proteins; PBP),

kdežto u obratlovců tato schopnost zatím není známa (Vogt a Riddiford 1981, Pelosi 1994, Pelosi a Maida 1995, Pelosi 1998). Podobný přístup, jaký byl zvolen v případě kravského OBP, byl posléze úspěšně aplikován při identifikaci většiny dalších obratlovčích OBP (Dal Monte et al. 1991, Pes et al. 1992, Felicioli et al. 1993, Pes a Pelosi 1995, Garibotti et al. 1997). Je potřeba říci, že s jednou výjimkou, kterou tvoří žáby druhů *Rana pipiens*, *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* (Lee et al. 1987, Millery et al. 2005), dosud známe tyto proteiny jen u savců. Máme-li z nich vybrat aspoň některé, pak jmenujme například krávu, prase, králíka, myš, potkana a nověji třeba slona nebo normíka (Pevsner et al. 1985, Pevsner et al. 1988a, Dal Monte et al. 1991, Pes et al. 1992, Pes a Pelosi 1995, Briand et al. 2000, Lazar et al. 2002, Stopková et al. 2010).

Ve snaze demonstrovat vazebné schopnosti OBP bylo použito několik běžných odorantů, přičemž většina těchto studií byla provedena na kravském a prasečím OBP, jelikož mohou být snadno purifikovány v relativně velkém množství (Pevsner et al. 1990, Dal Monte et al. 1993, Hérent et al. 1995). Nejlepšími ligandy, které vázaly při disociační konstantě v řádu 0,1–1 μM , se ukázaly být heterocyklické dusíkaté látky jako pyrazin a thiazol, terpenoidy a jejich deriváty jako menthol a thymol a středně velké alifatické alkoholy a aldehydy (Pevsner et al. 1990, Dal Monte et al. 1993, Hérent et al. 1995). Lze tedy konstatovat, že OBP nejsou specifické pro jeden nebo několik málo druhů molekul, jako například příbuzný retinol vázající protein, naopak mají schopnost vázat široké spektrum hydrofóbních sloučenin střední velikosti (Pelosi 1998, Tegoni et al. 2000). Na druhou stranu to naznačuje, že fyziologický ligand OBP nebyl ještě objeven; někteří autoři uvažují o feromonech, nicméně výzkum v této oblasti stojí teprve na svém počátku a tak o tom můžeme zatím nanejvýš spekulovat (Pelosi 2001). V této souvislosti vyvstává důležitá otázka, zda OBP mohou cíleně diskriminovat mezi různými odoranty, nebo vážou bez rozdílu veškeré z fyzikálně-chemického hlediska vyhovující sloučeniny. Některé práce dokazují, že minimálně určité třídy hmyzích OBP jednotlivé chemické sloučeniny rozlišují a interagují pouze se specifickou podmnožinou informačních molekul (Vogt a Riddiford 1981, Du a Prestwich 1995, Steinbrecht 1996, Wojasek a Leal 1999, Sandler et al. 2000). Vzhledem k již zmiňovaným velkým funkčním podobnostem obou rodin, nelze toto vyloučit ani u obratlovčích OBP. Problém je však v tom, že jmenované studie vesměs pracovaly se sexuálními feromony, což u obratlovců zatím není možné, jak už bylo řečeno.

S pokrokem laboratorních technik a interpretačních metod máme k dispozici stále více sekvencí OBP, ať už aminokyselinových, nebo nukleotidových, což nám umožňuje je navzájem poměrně snadno porovnávat a posléze kategorizovat, na základě čehož pak můžeme

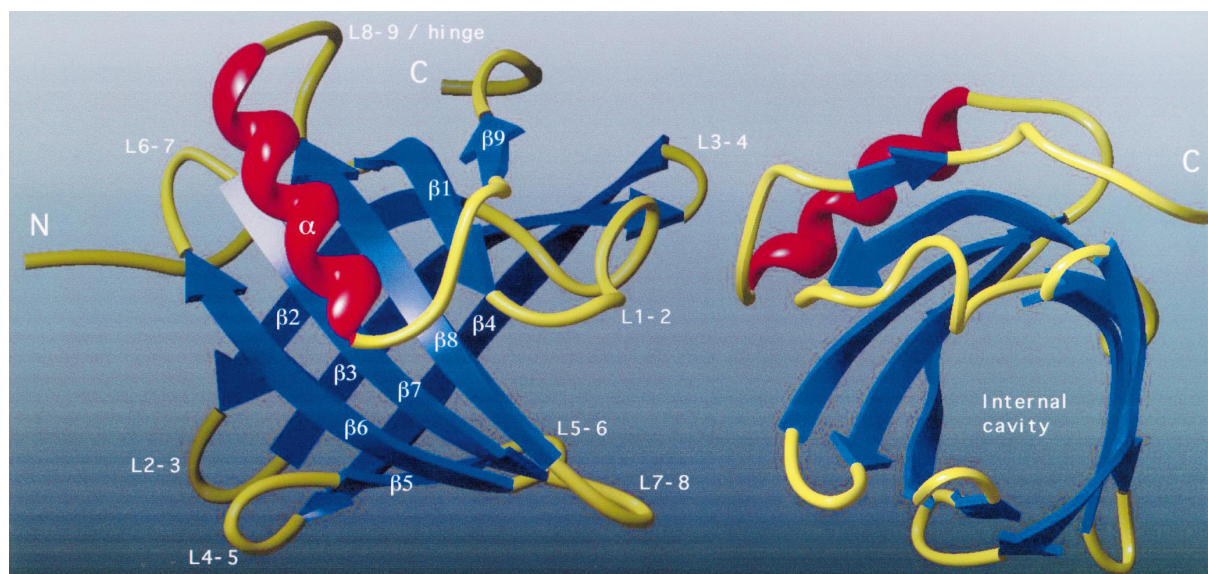
v této proteinové rodině ustanovit určité přirozené třídy. Zajímavým společným rysem jak hmyzích, tak obratlovcích OBP je to, že proteom téměř každého druhu, kde se vyskytují, obsahuje několik různých typů těchto proteinů. Uvedme několik příkladů: tři OBP byly popsány u prasete (Dal Monte et al. 1991, Scaloni et al. 2001), dva u myši (Pes et al. 1992, Pes a Pelosi 1995, Pes et al. 1998), tři u potkana (Pevsner et al. 1988a, Dear et al. 1991a, 1991b, Ohno et al. 1996, Briand et al. 2000, Löbel et al. 2001), tři u králíka (Garibotti et al. 1997) a nejméně osm u dikobraza (Felicoli et al. 1993, Ganni et al. 1997). V této souvislosti je však třeba poznamenat, že ne všechny proteiny klasifikované jako OBP opravdu do této rodiny patří, jak ukazují některé podrobnější analýzy (Stopková 2009). Pozoruhodná je zvláště ta skutečnost, že rozdíly v sekvenci aminokyselin jednotlivých OBP jsou obecně vzato vyšší v rámci jednoho druhu než mezi druhy. Z toho můžeme usuzovat na existenci různě početných tříd OBP, jejichž členové se vzájemně dosti liší, mají rozdílné vlastnosti, a dá se důvodně předpokládat, že i funkce (Pelosi 1998).

Takovéto třídění založené na srovnání aminokyselinových sekvencí známe u hmyzu, kde doposud rozlišujeme tři třídy OBP: již zmíněné PBP (Vogt a Riddiford 1981) a dvě třídy „obecných OBP“ (general odorant-binding proteins; GOBP1 a GOBP2) (Breer et al. 1990, Vogt et al. 1991). Podobnému uspořádání u obratlovců v současné době pořád brání nedostatek dostupných sekvencí. Navíc jsou obratlovcí OBP různorodější, což může být zapříčiněno například fylogenetickými vzdálenostmi nebo vlivem prostředí (Pelosi 1998).

Struktura OBP

OBP obratlovců patří mezi členy starobylé nadrodiny proteinů zvaných lipokaliny (z řeč. *lipo* – tuk a *calyx* – pohár), které můžeme najít u celé řady organismů bakteriemi počínaje (Bishop et al. 2006) a člověkem konče (Breustedt et al. 2006). Lipokaliny jsou nevelké mimobuněčné proteiny složené přibližně z 200 aminokyselinových zbytků, které vážou a transportují malé hydrofóbní molekuly (Flower 1996, Flower et al. 2000). Charakteristickým rysem těchto proteinů jsou v rámci rodiny značně velké rozdíly v aminokyselinovém řetězci (identita sekvencí často nedosahuje ani 20 %) a navzdory tomu vysoce konzervovaná terciární struktura (Flower 1995, Flower et al. 2000, Salier 2000). Tu tvoří především osm polypeptidových řetězců antiparalelního beta skládaného listu, jenž dohromady s alfa šroubovicí a dalšími motivy formuje pro lipokaliny typický uzavřený beta barel, jak je ukázáno na obrázku 2 (Sansom et al. 1994, Flower et al. 2000, Skerra 2000, Tegoni et al. 2000). Takto sbalený protein je v první řadě definován centrální dutinou (internal cavity) neboli takzvaným „pohárem“ (calyx), o němž se domníváme, že naváže do kapes ve svém

středu hydrofóbní molekuly odorantů a umožní tak jejich transport na místo určení (Flower 1996, Tegoni et al. 2000). Prostorovou strukturu lipokalinů stabilizuje různý počet disulfidických můstků, jež vznikají kovalentní vazbou mezi postranními řetězci sousedních cysteinů (Flower 1996, Tegoni et al. 2000). Obvykle jsou přítomny dvě tyto disulfidické vazby, i když ani jedna není mezi lipokaliny výjimkou. Jediný dosud známý lipokalin se třemi disulfidickými můstky je retinol vázající protein, kdežto na opačné straně stojí kravský OBP, jenž tuto vazbu, jako jeden z mála, postrádá úplně (Flower et al. 2000, Tegoni et al. 2000).

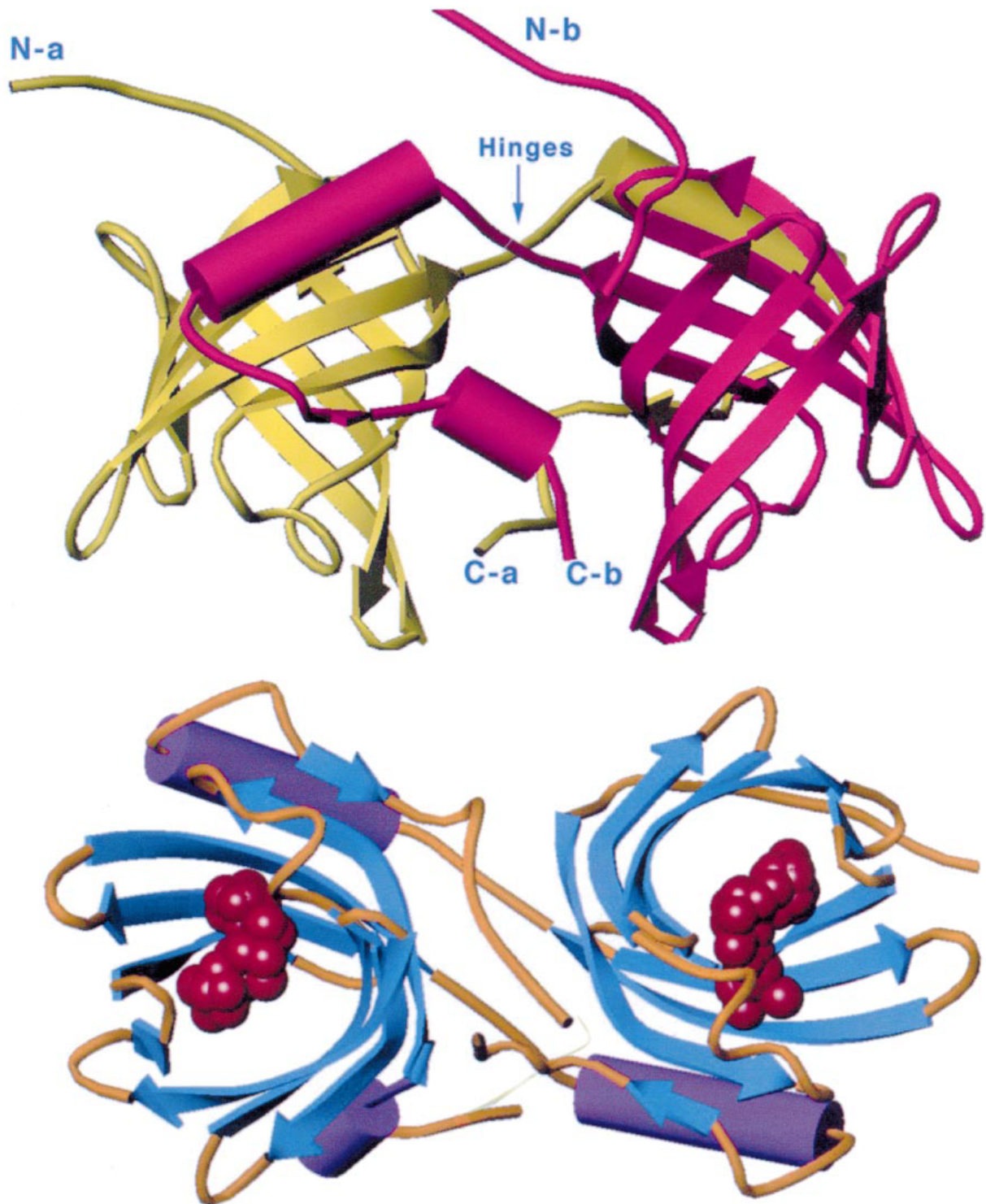


Obrázek 2 Grafické znázornění (stužkové; Ribbon representation) prasečího OBP. Nalevo: červeně je naznačena alfa šroubovice (α -helix), modrými šipkami jsou vyznačeny polypeptidové řetězce beta barelu (β -strands) a žlutě smyčkové úseky (loops – L); pořadí odpovídá jejich pozici v sekvenci aminokyselin. Napravo: pohled na centrální dutinu (internal cavity). (Upraveno podle Tegoni et al. 2000).

V protikladu k nízké identitě sekvencí je exon/intronové uspořádání lipokalinů poměrně stabilní. Většina obratlovcích lipokalinů vykazuje typickou soustavu 7 exonů a 6 intronů, přičemž částečně kódující exon 1 má v evoluci variabilní velikost, kdežto exony 2–5, které kódují řetězce beta listu, jsou strukturně i velikostně konzervované. Stop kodon leží na exonu 6 nebo řidčeji na exonu 7 (Salier 2000). Lipokaliny rozdělujeme na základě přítomnosti (nebo absence) tří konzervativních oblastí ve struktuře sbaleného proteinu (structurally conserved regions; SCRs) na takzvané „kernel“ a „outlier“ lipokaliny (Flower et al. 2000). Každou oblast charakterizuje až na výjimky neměnný motiv v sekvenci aminokyselin. SCR1 obsahuje motiv GxW (Y/F(W/H), SCR2 motiv T(N/D)(Y/N)xxY a SCR3 motiv K/R (Flower 1996, Salier 2000). První z nich je zakotven na začátku exonu 2, druhý v exonu 4 a třetí hned zkraje

exonu 5 (Salier 2000). Lipokaliny patřící do skupiny „kernel“ sdílejí všechny tři sekvenční motivy, zatímco členové skupiny „outlier“ ztratily třetí anebo druhý, což je častější případ (Salier 2000). Někdy je uváděn ještě motiv CxxxC, jenž je typický pro většinu členů rodiny OBP a některé další blízce příbuzné lipokaliny jako je například probasin nebo „female lacrimal protein“ (FLP) (Stopková et al. 2009).

OBP, které řadíme do skupiny „outlier“, jsou ve všech zmíněných ohledech typickými lipokaliny. Za jakýsi prototyp je již od svého objevení považován kravský OBP, byť nemá disulfidický můstek, jak už bylo uvedeno. Jeho 3D struktura, která byla paralelně pomocí různých krystalografických technik rozluštěna nezávisle na sobě dvěma vědeckými týmy, odhalila, že je to za přirozených podmínek dimer (Bianchet et al. 1996, Tegoni et al. 1996). Kravský OBP je ukázkovým případem takzvané výměny domén (domain swapping), kdy je určitý prvek sekundární nebo terciární struktury jednoho proteinu nahrazen identickým prvkem struktury proteinu jiného (Bennet et al. 1995). Výsledkem takové výměny je vznik větší proteinové molekuly, kterou drží pohromadě interakce mezi dvěma vazebnými místy. V souladu s tímto se alfa šroubovice jednoho monomeru kravského OBP nachází v pozici, kde by za normálních okolností byla alfa šroubovice monomeru druhého, jak dobře ilustruje obrázek 3 (Tegoni et al. 2000). Centrální kapsa, která se vytvoří na rozhraní mezi oběma monomery, komunikuje s mukózním sekretem čichové sliznice a předpokládá se, že může představovat další vazebné místo pro hydrofóbní ligandy (Tegoni et al. 1996, Tegoni et al. 2000). Schopnost utvářet oligomery mají rovněž OBP myši nebo potkana, naopak prasečí OBP je monomer (Pelosi 1994, Spinelli et al. 1998).



Obrázek 3 Stužkový model dimeru OBP. Sekundární struktura proteinu je znázorněna válci (alfa šroubovice) a šipkami (řetězce beta listu). Nahoře: grafické zobrazení výměny domén (domain swapping); monomer A je vyznačen žlutě, zatímco monomer B růžově. Dole: fialově je naznačena alfa šroubovice, modře vlákna beta listu a hnědě jiné motivy. Hypotetické molekuly navázané v centrálních dutinách obou monomerů jsou zobrazeny červeně. (Upraveno podle Tegoni et al. 2000).

Expres a funkce OBP

Ačkoliv OBP známe bezmála 30 let, a víme toho poměrně dost o jejich struktuře a molekulární podstatě, máme stále velmi málo informací o genové expresi těchto proteinů a funkcích, které v organismu vykonávají. Dosavadní studie nám vesměs říkají, že OBP jsou syntetizovány různými typy nosních žlázek v čichové a dýchací sliznici jako jsou například Bowmanovy a jiné seromucinózní žlázy (Pevsner et al. 1986, Avanzini et al. 1987, Pevsner et al. 1988b, Krishna et al. 1995, Ohno et al. 1996, Pes et al. 1998, Utsumi et al. 1999). Tato skutečnost může být do jisté míry dána tím, že první OBP byl izolován z nosní sliznice, v důsledku čehož se další pozornost pochopitelně soustředila především na tuto a přilehlé oblasti.

Kromě OBP známe i další nízkomolekulární proteiny, které se pohybují v podobných prostorech, přičemž se zdá, že v určitých tkáních OBP jakoby nahrazují nebo lépe řečeno alternují. Vomeromodulin je glykoprotein, jenž byl objeven ve vysokých koncentracích v mukózním sekretu vomeronasálního orgánu, nikoli však v hlenu hlavní čichové sliznice (Khew-Goodall et al. 1991); zatímco u OBP je tomu přesně naopak (nebo se tak alespoň soudí). Na základě toho byla OBP přisouzena role jakéhosi nosiče obecných odorantů, kdežto vomeromodulin měl podle tohoto schématu zastávat podobnou úlohu v případě feromonů (Khew-Goodall et al. 1991, Krishna et al. 1994). Na druhou stranu bylo prokázáno, že žlázkami vomeronasálního orgánu jsou secernovány dva proteiny (vomeronasal secretory proteins; VNSP-1 a VNSP-2), lipokaliny blízce příbuzné OBP, které slouží jako přenašeče feromonů (Miyawaki et al. 1994). Vzhledem k významné podobnosti OBP a VSNP, někteří biologové považují za rozumné zařadit je do jedné třídy a předpokládat, že sdílejí také stejné funkce (Pelosi 2001). Jinými slovy přikládají OBP roli v percepci feromonů a za cílovou tkáň označují spíše vomeronasální orgán než samotnou čichovou sliznici (Tegoni et al. 2000, Pelosi 2001). Z výše uvedeného vyplývá, že situace je značně komplikovaná a nepřehledná, protože v oblasti nosu spolu interaguje několik identických nebo podobných proteinů, které se navzájem zastupují a všelijak doplňují.

Podíváme-li se blíže na funkce OBP, zjistíme, že úroveň našich znalostí je ještě omezenější než v případě tkáňové lokalizace těchto proteinů. Pochopení fyziologických funkcí OBP představuje od doby jejich objevení největší problém. To však neznamená, že neexistují žádné hypotézy vysvětlující role OBP v organismu – je tomu právě naopak. Navržené hypotézy pokrývají téměř všechny aspekty transdukce signálu, od transportu přes percepci až po deaktivaci. V krátkosti lze hypotetické funkce OBP shrnout takto:

OBP transportují širokou škálu různých lipofilních odorantů ve vodném prostředí nosní sliznice savců a jiných obratlovců (Pevsner a Snyder 1990).

V poslední době došlo k odklonu od této koncepce ve prospěch OBP jakožto přenašečů více specifických ligandů – například feromonů (Tegoni et al. 2000, Pelosi 2001).

OBP mohou diskriminovat mezi jednotlivými odoranty a působit tak jako jakýsi periferní filtr, který určuje, jaké molekuly budou prezentovány čichovým receptorům (Steinbrecht 1998). Diskriminační hypotéze nahrává skutečnost, že skoro u každého druhu, kde byly zatím OBP objeveny, existuje několik různých typů těchto proteinů.

Kromě toho mohou OBP působit jako takzvaný „scavenger“, to znamená, že mohou z okolí čichových receptorů vychytávat a odstraňovat nežádoucí nebo dokonce toxické sloučeniny (Steinbrecht 1998, Grolli et al. 2006). Takto mohou kupříkladu bránit přesycení čichových receptorů v případě příliš vysoké koncentrace odorantů (Schofield 1988, Burchell 1991). Je zřejmé, že oblast nosu je neustále vystavena přítomnosti nejrůznějších substancí, které pro smyslové buňky často znamenají vážné nebezpečí. Proto je nezbytné, aby takové sloučeniny byly z dosahu čichových neuronů co nejdříve odstraněny. Jelikož mají OBP dobrou afinitu k aldehydům, které mohou být cyto- a genotoxické, zdá se, že představují dobré kandidáty na takovou roli „čističe“ nebezpečných a odpadních látek (Pevsner et al. 1990).

Rychlá deaktivace čichových stimulů je další důležitý proces, jehož se mohou OBP účastnit (Kaissling 1972). Jelikož koliduje s transportní funkcí, Vogt (1987) deaktivaci roli OBP později zamítl, nicméně Ziegelberger (1995) navrhl elegantní řešení, jak mohou OBP vykonávat obě funkce současně, aniž by si vzájemně překážely.

OBP mohou rovněž udržovat odoranty poblíž čichových receptorů a zesilovat tak pachový signál jdoucí do mozku (Taylor et al. 2008).

Jestliže čichový receptor rozpozná pouze komplex OBP/odorant, nikoli samotný odorant, přítomnost OBP může být nutnou podmínkou pro transdukcii signálu (Pelosi 1994). Některé důkazy naznačují existenci receptorů pro OBP (Boudjelal et al. 1996). V zásadě si lze představit tři možnosti, jak může komplex OBP/ligand interagovat s čichovým receptorem:

- receptor dokáže rozpoznat pouze komplex, nikoli samotný ligand;
- ligand může dosáhnout membrány receptoru jenom prostřednictvím OBP;
- ligand může komplex samovolně opustit (disociovat) a na receptor se navázat bez pomoci OBP (Pelosi 2001).

Na závěr je třeba poznamenat, že uvedené hypotézy se navzájem nevylučují, neboť OBP mohou vykonávat více funkcí najednou.

1.3 Krátký exkurz do fylogeneze rodu *Mus*

Rod *Mus* (čeleď Muridae, podčeleď Murinae) zahrnuje zhruba 30–40 druhů vesměs drobných, zevním vzhledem dosti nenápadných, terestrických hlodavců s převážně noční aktivitou (Marshall 1977, Musser a Carleton 1993). Nejbližšími příbuznými myši rodu *Mus* jsou myšice, krysy, potkani a další zástupci takzvaných pravých myši (Murinae). Pro systematickou biologii (a systematické biology) byl řád hlodavců odjakživa oříškem, což příliš nezměnila ani molekulární fylogenetika. Poznání fylogeneze tohoto druhově nejpočetnějšího řádu žijících savců komplikuje řada věcí. Krátce jsou to tyto obtíže: početné homoplasie, vysoké tempo molekulární evoluce, nerovnoměrná rychlost substitucí v jednotlivých liniích a/nebo krátké časové úseky mezi divergencí hlavních linií (Yang a Nielsen 1998, Gaisler a Zima 2007). Rovněž vnitřní systematika čeledi Muridae není dosud ustálená, neboť celá tato čeleď vznikla v evoluci náhle, explozivní radiací, což vždy představuje kámen úrazu při rekonstrukci fylogeneze jakékoli skupiny.

Výše řečené naštěstí v plné míře neplatí pro samotný rod *Mus*, i když zmíněným problémům se úplně nevyhneme ani zde. Fylogenezi tohoto rodu shrnuje obrázek 4. Časová osa je založena na základě hybridizace jaderné DNA (She et al. 1990, Chevret et al. 2002) a kalibrována dle divergence rodů *Mus* a *Rattus*, k níž došlo před přibližně 10 miliony let. Většina taxonomů člení rod *Mus* do čtyř podrodů: *Mus*, *Pyromys*, *Coelomys* a *Nannomys* (Marshall 1977). Monofylii prvně uvedeného shodně potvrzují četné práce, které se opírají o data získaná rozmanitými molekulárně biologickými přístupy (Bonhomme et al. 1984, Jouvin-Marche et al. 1988, She et al. 1990, Lundrigan et al. 2002). Posledně jmenovaná studie, postavená na analýze několika jaderných genů, odhalila v podrodu *Mus* tři hlavní klady: Za prvé klad myši domácí s poddruhy *M. m. musculus*, *M. m. castaneus*, *M. m. molossinus*, což je hybrid prvních dvou, a *M. m. domesticus*. Za druhé palearktický klad, kam řadíme společně s druhy *M. macedonicus*, *M. spicilegus* a *M. spretus* rovněž celý klad předešlý. Za třetí klad asijský, jenž zahrnuje druhy *M. cervicolor*, *M. cookii* a *M. caroli* (Lundrigan et al. 2002).

1. Klad myši domácí. Nejrecentnější skupinou celého rodu *Mus* je komplex druhů *Mus musculus*. Tyto polytypické druhy, které původně pocházejí z Asie, se postupem času rozšířily do všech koutů světa. Nejznámější zástupce tohoto komplexu blízké příbuzných myši představují *M. m. domesticus*, poddruh běžný v západní Evropě, Africe a na Blízkém východě, jenž byl člověkem zavlečen také do obou Amerik a Austrálie (Auffray et al. 1990); dále *M. m. musculus*, poddruh, jehož areál výskytu se táhne od střední Evropy přes Rusko a

severní Čínu až do Japonska; a *M. m. castaneus*, poddruh, jenž obývá území jdoucí od ostrova Srí Lanka do celé Jihovýchodní Asie, včetně Malajského souostroví (Sage et al. 1993, Guénet a Bonhomme 2003). Žádný z těchto poddruhů není od zbylých geneticky zcela izolován – v oblastech, kde se jejich areály rozšíření stýkají, je častým jevem různě silná introgrese nebo dokonce úplná hybridizace. Nejlépe zdokumentované případy takového mísení genů máme k dispozici z Evropy, kterou probíhá intenzivně studovaná hybridní zóna mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* a pak z Číny a Japonska, kde se spolu vcelku běžně kříží *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (Boursot et al. 1993, Sage et al. 1993, Macholán et al. 2003, Macholán et al. 2007). V Japonsku takto vznikla hybridní populace označovaná jako *M. m. molossinus* (Yonekawa et al. 1988).

Předpokládá se, že poddruhy *M. musculus* mají evoluční kořeny na indickém subkontinentu, odkud postupně pronikaly na nová území, aby posléze osídlily celou planetu (Din et al. 1996). Taxonomický status centrálních populací je stále nejasný, neboť jsou samy o sobě velice různorodé a vykazují významnou část celkové genetické variability všech rozlišovaných poddruhů (Boursot et al. 1993, Sage et al. 1993, Prager et al. 1998, Duplantier et al. 2002).

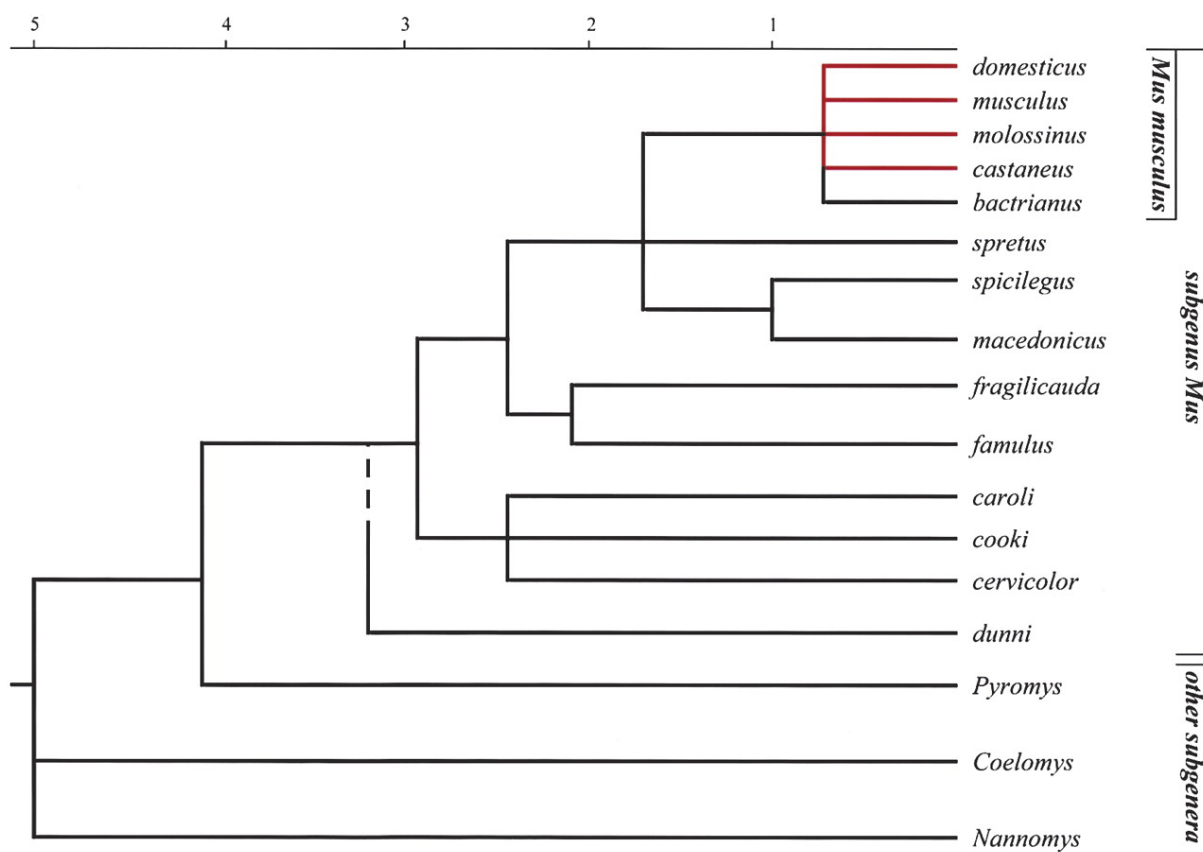
2. Palearktický klad. Ačkoli krátkoocasé myši druhů *M. macedonicus*, *M. spicilegus* a *M. spretus* žijí s některými zástupci komplexu *Mus musculus* sympatricky, ve volné přírodě s nimi zřídka hybridizují. Nicméně existují důkazy, že k výměně genetického materiálu může sporadicky docházet (Greene-Till et al. 2000, Orth et al. 2002). Naproti tomu v laboratorních podmínkách všechny tři výše zmíněné taxony kátkoocasých myší produkují s *M. musculus* životaschopné potomstvo, byť jsou hybridy samčího pohlaví sterilní, jak predikuje Haldaneovo pravidlo (Guénet a Bonhomme 2003). Zatímco monofyletické postavení palearktického kladu má silnou podporu (Bonhomme et al. 1984, She et al. 1990, Lundrigan et al. 2002), příbuzenské vztahy jednotlivých druhů v rámci tohoto kladu se stále diskutují.

3. Asijský klad. Asijské taxony *M. cervicolor*, *M. cookii* a *M. caroli* nejsou zdaleka tak dobře probádány jako zástupci předešlého kladu. Vzhledem k tomu, že nejsou dostatečně detailně prozkoumány areály jejich rozšíření, neznáme dosud všechny geografické rasy a tudíž ani celkovou genetickou variabilitu uvnitř těchto druhů. Přesto se zdá, že monofylie asijského kladu má pevné základy (She et al. 1990, Lundrigan et al. 2002), což se ovšem nedá říct o vnitřní systematické struktuře tohoto kladu – ta zůstává nadále nejasná.

Nezodpovězenou otázkou je rovněž vzájemná pozice jednotlivých podrodů (*Mus*, *Pyromys*, *Coelomys* a *Nannomys*) v rámci rodu *Mus*. Na vině může být nedostatek údajů

z posledně třech jmenovaných podrodů. Zejména poměrně velký podrod *Nannomys* skýtá bohatý zdroj informací pro budoucí studie. Abychom si na závěr představili alespoň nějaký druh mimo probraný podrod *Mus*, podíváme se v krátkosti na jednoho zástupce zmíněného podrodu *Nannomys*, jehož jsme použili při našich experimentech.

Myš africká neboli *Mus (Nannomys) minutoides* bývá označována za „nejmenšího hlodavce světa“; velikostí se blíží evropské myšce drobné (*Micromys minutus*), přičemž samci bývají zpravidla menší než samice. Jejím domovem jsou stepi a lesostepi subsaharské Afriky, ale nevyhýbá se ani blízkosti lidských sídel (místy působí jako vážný hospodářský škůdce). Najdeme ji převážně v Mosambiku, Jihoafrické republice, Svazijsku, Lesothu a Botswaně (Musser a Carleton 1993).



Obrázek 4 Evoluční strom rodu *Mus*. Vznik rodu *Mus* je kladen do doby před 5 miliony let, kdy se z hlavní linie začal vydělovat africký podrod *Nannomys*, jenž zahrnuje trpasličí myši jako *Mus (Nannomys) setulosus* nebo *Mus (Nannomys) minutoides*; dále asijský podrod *Coelomys*, kam patří například *Mus (Coelomys) pahari*; a krátce nato také podrod *Pyromys*, do něž řadíme například *Mus (Pyromys) plathythrix*. Větev vedoucí k myším sensu stricto (podrod *Mus*) začíná skupinou *Mus terricolor*, kterou zde reprezentuje *Mus dunni*, druh s dosud nevyjasněným postavením. Následující divergence, zhruba 3 miliony let stará, z linie jdoucí k myši domácí odštěpila tři blízce příbuzné druhy asijských myší (*Mus cervicolor*, *Mus cookii* a *Mus caroli*). O necelý milion let později se oddělily další dva v Asii žijící druhy: prvním je indický *Mus famulus*, který byl teprve nedávno zařazen do podrodu *Mus*, a druhým je dlouho neznámý *Mus fragilicauda* z Thajska. Předposlední uzel, datovaný do doby před 1,5 milionem let, představuje skupina tří, morfologicky velmi podobných, druhů krátkoocasých myší, které se vyskytují v Palearktu. Jsou to: *Mus spretus*, dobře známý druh obývající západní Mediterán; *Mus spicilegus*, myš budující nápadné nadzemní zásobárny semen, takzvané kurgančiky, s areálem výskytu v jihovýchodní Evropě; a *Mus macedonicus*, což je vikariant druhu *Mus spretus*, kterého nalezneme na jih od Kavkazu až k Jaderskému moři a rovněž na Blízkém východě. Nejrecentnější skupinou je pak komplex druhů *Mus musculus*. Červeně jsou vyznačeny taxony, které se podílely na vzniku klasických laboratorních kmenů. (Upraveno podle Guénet a Bonhomme 2003).

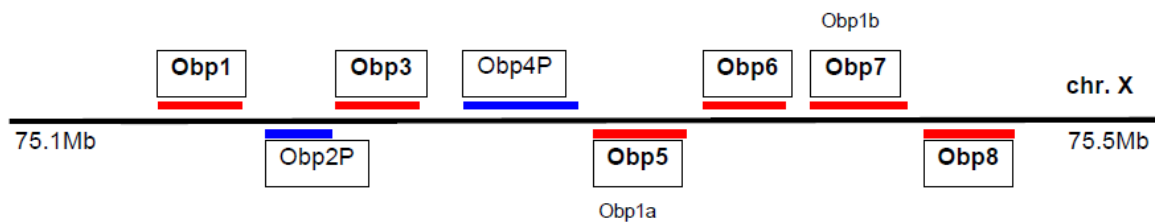
1.4 OBP: Současný stav poznání u myši domácí

Myš jakožto zástupce makrosmatických savců představuje ideální model pro studium chemické komunikace a související problematiky. V první polovině devadesátých let minulého století byly z nosní sliznice samce myši izolovány čtyři proteiny, které byly na základě dobré afinity k 2-isobutyl-3-methoxypyrazinu popsány jako OBP (Pes et al. 1992, Pes a Pelosi 1995). OBP-I, v přirozeném stavu heterodimer složený ze dvou různých podjednotek, se podobal ostatním tehdy známým OBP a také proteinu zvanému aphrodisin (>50% identita), což je přenašeč feromonů z rodiny lipokalinů, který se vyskytuje ve vaginálním sekretu samic křečka (Singer et al. 1986, Singer a Macrides 1993). Druhý objevený protein (OBP-II) byl velmi podobný OBP-I potkana, zatímco zbylé dva (OBP-III a OBP-IV) vykazovaly nápadnou shodu s některými zástupci MUPů (= hlavní močové proteiny; Major urinary proteins – Mups), lipokalinů, které jsou mimo jiné exprimovány slinnými žlázami (Shaw et al. 1983, Shahan et al. 1987). Tato shoda se posléze ukázala být jako zcela opodstatněná, poněvadž sekvenace odhalila, že jsou to opravdu MUPy. OBP-II, jenž má prvních 40 aminokyselin skoro z 80 % identických s OBP-I potkana, je nadále veden jako hypotetický protein a jeho sekvence není snadno dohledatelná (Pes a Pelosi 1995). V článku uvedená částečná sekvence odpovídá proteinům s našimi pracovními názvy Obp1 a Obp3 (terminologie bude vysvětlena níže). Jediné proteiny, nesoucí v současné době u myši označení OBP, tak představují podjednotky OBP-I, pojmenované jako Obp1a a Obp1b, které lze snadno najít ve veřejně přístupných databázích jako GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) a MGI-Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>).

Avšak důkladné prostudování databází odhalí nejméně osm genů (včetně dvou pseudogenů), vykazujících všechny výše popsané znaky OBP, které tvoří genový shluk o velikosti 0,5 Mb na chromosomu X, jak ukazuje obrázek 5. Vzhledem k tomu, že názvosloví OBP je z různých důvodů značně chaotické a nepřehledné, navrhuje těchto osm genů, podle jejich umístění na chromosomu, označovat jako Obp1–Obp8 (tohoto pojmenování se také přidržím ve zbytku této práce; zmíněné pseudogeny jsou pak označeny písmenem P). Identita sekvencí se v rámci genového shluku OBP pohybuje v rozmezí 58–99 %, z čehož je patrné, že zde existují ještě jakési přirozené podskupiny, a to konkrétně tři. První podskupinu představují geny Obp1, Obp2P a Obp3, které od sebe nelze téměř rozlišit, druhou geny Obp4P, Obp5 a Obp6 a třetí geny Obp7 a Obp8, rovněž takřka identické. Obp2P a Obp4P jsou nefunkční, do proteinu nepřekládané pseudogeny. Vyjma Obp5 (Obp1a) a Obp7 (Obp1b) jsou všechny ostatní geny v databázích zaneseny jako předpokládané (predicted). Pokud je

známo, u jiných druhů rodu *Mus* OBP zatím objeveny nebyly, i když je vysoce pravděpodobné, že se budou vyskytovat u všech nebo většiny zástupců tohoto rodu.

Domníváme se, že za zrodem tohoto genového shluku stojí opakované tandemové duplikace a následná divergence jednotlivých kopií. Tento druh duplikací vzniká většinou v důsledku nerovnoměrného crossing-overu mezi dvěma homologními chromosomy během meiózy. Výsledkem takové nereciproké rekombinace je duplikace určitého úseku DNA na jednom chromosomu a jeho delece na chromosomu druhém (Flegr 2005). K duplikacím může také vést nerovnoměrná výměna mezi dvěma chromatidami téhož chromosomu. Právě tandemové duplikace daly vzniknout jedněm z nejznámějších genových rodin včetně globinové nadrodiny (Shen et al. 1981) nebo rodiny Hox-genů (Holland a Takahashi 2005).



Obrázek 5 Genový shluk OBP u myši domácí. Schéma zobrazuje oblast na chromosomu X, kde jsou lokalizované tandemově duplikované geny řídící OBP u myši domácí. Obp1 – předpokládaný gen Gm14744 (ENSMUSG00000079522); Obp2P – předpokládaný gen Gm14750 (ENSMUSG00000082635), je to pseudogen, konkrétně duplikovaný pseudogen (nonprocessed pseudogene); Obp3 – 5430402E10Rik (ENSMUSG00000044121); Obp4P – předpokládaný pseudogen Gm16458 (ENSMUSG00000080890); Obp5 – Obp1a (ENSMUSG00000067684); Obp6 – předpokládaný gen Gm5938 (ENSMUSG00000079521); Obp7 – Obp1b (ENSMUSG00000067679); Obp8 – předpokládaný gen Gm14743 (ENSMUSG00000079519).

2. Cíle práce

V obecné rovině si tato práce kladla za cíl rozšířit naše vědomosti o genech, které v organismu řídí OBP. Zejména pak přispět k poznání v těch oblastech jejich výzkumu, kde máme dosud k dispozici málo informací, popřípadě vůbec žádné. K takovým nedostatečně probádaným oblastem bezesporu patří detailní studium genové exprese těchto proteinů. Znalost tkáňové specifity a regulace genové exprese OBP nám může mnohé napovědět o fyziologických funkcích těchto proteinů a jejich vlivu na chování daného živočicha. Proto jsme sestavili expresní profily všech genů kódujících OBP u dvou forem myši domácí – *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Této části projektu předcházela sekvenace jednotlivých variant genů pro OBP. Vzhledem k možné roli OBP v sociálním chování a individuálním rozpoznávání jedinců, bylo rovněž důležité odhalit případné sekvenční rozdíly mezi oběma zkoumanými poddruhy. Následná genotypizace na různorodém vzorku jedinců měla potvrdit nebo vyvrátit, zda jsou nalezené rozdíly zafixované uvnitř populací obou studovaných poddruhů. Ke studiu evoluční historie OBP nám posloužil bazální zástupce rodu *Mus*, myš africká (*Mus minutoides*).

Konkrétní dílčí cíle byly tyto:

- osekvenovat všechny známé i předpokládané varianty genů pro OBP u divokých myší poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, odhalit sekvenční rozdíly mezi oběma poddruhy;
- prostřednictvím genotypizace zjistit, zda jsou nalezené rozdíly zakonzervované uvnitř populací obou těchto poddruhů;
- identifikovat a osekvenovat geny kódující OBP u myši africké (*Mus minutoides*);
- zkonstruovat evoluční strom všech známých savčích OBP;
- pomocí real-time PCR kvantifikovat mRNA jednotlivých variant OBP a určit tkáňovou specifitu těchto genů u poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*;
- odhalit případné mezidruhové či pohlavní rozdíly v expresi OBP.

3. Materiál a metody

3.1 Původ biologického materiálu

Divoké myši taxonu *M. m. musculus* použité pro studium genové exprese a sekvenování byly odchyceny pomocí živochytných pastí na různých lokalitách v České republice. Zástupci linie *M. m. domesticus* pocházejí dílem z volně žijících populací obývajících Německo, dílem z našich vlastních chovů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Jedince myši africké (*Mus minutoides*) jsme získali ze Zoo Plzeň. Vzorky DNA vybrané pro genotypizaci pokrývají areály výskytu zkoumaných druhů v téměř celé západní polovině Palearktu.

3.2 Odběr vzorků a izolace RNA

Pitvu usmrcených zvířat a vyjmutí požadovaných orgánů/tkání prováděl zkušený morfolog a operatér, přičemž od každého individua obou pohlaví byly precizně odebrány tyto tkáně: vomeronasální orgán, nosní lymfatická tkáň (nasal-associated lymphoid tissue), čichová sliznice, Harderianova žláza, extraorbitální slzné (lakrimální) žlázy, podčelistní slinné žlázy, příušní slinné žlázy, prepuciální žlázy a játra. Od samců pak ještě testes, cauda epididymis a prostata a od samic ovaria a vagina (soupis všech odebraných tkání najdete také v příloze 1). Ihned po odejmutí, tak aby se předešlo jakékoli degradaci RNA, byly jednotlivé vzorky zmrazeny v tekutém dusíku, načež byly přendány do sterilních 2 ml polypropylénových mikrozkušavek Eppendorf s činidlem TRIzol od firmy Invitrogen. TRIzol je roztok fenolu a guanidin isothiokyanátu určený k izolaci celkové RNA z buněk a tkání, který během procesu homogenizace zachovává integritu RNA, zatímco dochází k rozrušení vlastních buněk a rozpuštění buněčných složek. Homogenizace vzorků, 50–100 mg tkáně v 1 ml TRIzolu (objem vzorku by neměl překročit 10 % objemu činidla), probíhala pomocí výkonného homogenizátoru při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Výsledný homogenát byl použit přímo k izolaci RNA nebo zmrazen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a za této teploty uchováván pro pozdější účely. Při izolaci RNA metodou fenol-chloroformové extrakce, kterou poprvé popsali Chomczynski a Sacchi (1987), jsme postupovali dle instrukcí výrobce v protokolu TRIzol® Reagent. Následuje popis jednotlivých kroků.

Před extrakcí samotnou se u některých typů tkání s vysokým obsahem proteinů, tuku, polysacharidů nebo mimobuněčné hmoty doporučuje z homogenátu pomocí centrifugace –

12 000 × g, 10 minut, 2 až 8 °C – odstranit nerozpustný materiál. Ten zůstane po odstředění při dně, zatímco takto přečištěný roztok TRIzolu obsahující RNA přemístíme do nové čisté 2 ml zkumavky. Pokračujeme přidáním chloroformu, jak bude popsáno níže. (Veškeré úkony provádíme v laminárním flow boxu, který před použitím vytřeme etanolem a sterilizujeme UV zářením; dbáme na čistotu práce).

1. Fázová separace

Na 1 ml TRIzolu přidáme 0,2 ml chloroformu a důkladně rukou 15 sekund protřepeme. Inkubujeme 2 až 3 minuty při 15 až 30 °C, poté vzorky stočíme v centrifuze – maximálně 12 000 × g, 15 minut, 2 až 8 °C. Po centrifugaci se obsah zkumavky rozdělí na tři jasně ohraničené fáze: spodní, červeně zbarvenou, fenol-chloroformovou, interfázi a vrchní bezbarvou vodnou. Veškerá RNA se nachází výlučně ve vodné fázi, která tvoří zhruba 60 % objemu původního homogenátu.

2. RNA precipitace

Obezřetně – je třeba vyvarovat se kontaktu s interfází – odebereme 400 µl RNA fáze do čistých zkumavek, kde ji smícháme s isopropanolem. Použijeme 0,5 ml isopropanolu na 1 ml TRIzolu užitého při počáteční homogenizaci. Inkubujeme 10 minut při 15 až 30 °C a potom opět odstředíme – tentokrát ne více než 12 000 × g, 10 minut, 2 až 8 °C. Vysrážená RNA, často viditelná už před centrifugací, se usadí v podobě bílé gelovité pelety na dně a po stranách zkumavky.

3. Promytí RNA

Odstraníme supernatant a peletu řádně promyjeme přidáním čistého 75% etanolu; nejméně 1 ml na 1 ml TRIzolu použitého při homogenizaci. Následuje „vortex“ – je vidět, jak se peleta uvolní ze dna – a centrifugace, nanejvýš 7 500 × g, 5 minut, 2 až 8 °C. (Pro dosažení vyšší čistoty RNA lze celý krok opakovat, byť může mírně klesnout výtěžek).

4. Rozpuštění RNA

Opatrně vylijeme etanol a peletu RNA krátce vysušíme (postačí 5 až 10 minut). Je důležité nenechat peletu přeschnout, neboť tím se významně sníží její rozpustnost. RNA rozpouštíme ve sterilní vodě zbavené enzymů degradujících RNA (RNase free water), množství odhadneme podle velikosti pelety a typu tkáně. Po přidání vody promícháme roztok pomocí laboratorní třepačky nebo pipety a inkubujeme 10 minut při 55 až 60 °C, čímž celou proceduru ukončíme. Získané vzorky skladujeme při teplotě –80 °C.

Ke stanovení koncentrace a ověření čistoty RNA jsme použili spektrofotometr NanoDrop ND-1000; následně jsme elektroforetickou analýzou zkontrolovali, zda nedošlo k narušení integrity RNA.

3.3 Sekvenace

Reverzní transkripce

Jelikož nás přednostně zajímala část překládaná do proteinu, nesekvenovali jsme celý gen včetně intronů, nýbrž pouze transkript. Z toho plyne nutnost přepsat RNA do takzvané komplementární DNA (complementary DNA; cDNA), k čemuž jsme využili účinný systém syntézy cDNA „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ firmy Fermentas. Nyní si krok za krokem ve stručnosti přiblížíme průběh celé metody (postupovali jsme podle příloženého protokolu RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, #K1622).

1. Po rozmrazení, promíchání a krátké centrifugaci všech zúčastněných složek (které dále uchováváme na ledu) vpravíme do sterilních 0,2 ml tenkostěnných mikrozskumavek pipetou v uvedeném pořadí tyto přísady: templát – v našem případě 1 µg RNA (doporučované rozpětí je 0,1 ng – 5 µg), 1 µl oligo (dT)₁₈ primer a pakliže je třeba, doplníme sterilní (nuclease-free) vodou do objemu 12 µl.
2. Pokud templátová RNA obsahuje hodně GC párů nebo sekundární struktury, vzorky mírně protřepeme, krátce odstředíme a inkubujeme v programovatelném cykleru (thermal cycler) 5 minut při 65 °C. Poté je zchladíme na ledu, stočíme a umístíme zpátky na led.
3. Přidáme v tomto pořadí a množství: 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix a 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase. Výsledný objem je tak 20 µl. Lehce promísíme a odstředíme.
4. Inkubujeme 60 minut při 42 °C. Reakci ukončíme zahřátím na 70 °C po dobu 5 minut. Takto připravenou cDNA rovnou upotřebíme v návazných aplikacích nebo uchováváme při teplotě –80 °C pro pozdější použití.

Polymerázová řetězová reakce

Po reverzní transkripci jsme přistoupili k amplifikaci cílové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction; PCR), což je metoda, kterou asi netřeba blíže představovat. K vlastní reakci jsme využili produkt „*Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time)“ japonské firmy TaKaRa obsahující polymerázu *TaKaRa Ex Taq™* HS, což je enzym pro „hot

start PCR“, směs nukleotidů dNTP Mixture a ionty hořčíku Mg^{2+} . Dále jsme potřebovali ještě sterilní (DEPC treated) vodu a klíčový článek celé PCR – specifické primery ohraničující sekvenci našeho zájmu, které musely vzhledem ke svému účelu splňovat několik základních podmínek. Vyjma běžných nároků na délku či obsah GC párů, šlo především o místa jejich nasednutí na řetězec DNA, tak aby amplifikovaný segment pokud možno zahrnoval celý námi zkoumaný gen. Poněvadž jsme analyzovali více genů, bylo rovněž žádoucí sjednotit teploty tání všech primerů pro jednotlivé varianty OBP, abychom nemuseli každý gen amplifikovat zvlášť a vše tak mohlo proběhnout během jedné reakce. Požadované dvojice primerů, jejichž sekvence ukazuje tabulka 2, byly na základě veřejně přístupných dat z databází GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) navrženy v programu GeneFischer2 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2>).

Tabulka 2 Sekvence primerů navržených pro sekvenaci jednotlivých variant OBP.

Gen	Forward primer	Reverse primer
Obp1	CTCTGAACTCCTTCGGAAGGA	AAAAGAATCAGTACCATGGTAGGA
Obp4	GAAATTCTTGTGCCATCATGGTA	ATTCAAAAAGGAAGAACAGCTCA
Obp5	CTGTAGAAAAGAAAGTCTTGTACCA	CATTCAAAAAGGAAGATCATGAGA
Obp6	AAGTCTTGTGCCATAATGGCAA	TCAAAAAGGAATAACAGGTCGTA
Obp7	TGAACATCTCCAGAGGAGCAA	GGAAGAAGAGTTTATAGATTAGGCAA

Pro úplnost si ještě alespoň v krátkosti musíme ukázat přípravu samotné PCR a vzorové složení reakční směsi. Ta sestává pro jednu reakci (myšleno vzorek) z 10 μ l *Premix Ex Taq*TM, 1,6 μ l smíchaných primerů (forward primer + reverse primer dohromady; konečná koncentrace primerů v reakci je 0,2 μ M) a 6,9 μ l sterilní vody. Na závěr přidáme 1,5 μ l templátu – cDNA, čímž docílíme výsledného objemu 20 μ l. Všechny uvedené komponenty nejprve rozmrazíme, promícháme v třepačce, krátce odstředíme a umístíme na led, kde provádíme veškerou práci. Poté je postupně – obvykle začínáme vodou a téměř vždy končíme templátem – pipetujeme do sterilní 0,2 ml tenkostěnné mikrozkušavky; směs promícháme, odstředíme a inkubujeme v termocykleru dle instrukcí zadaného programu (tabulka 3). Pokud to přístroj dovoluje, zvolíme možnost „hot start“, čímž omezíme tvorbu nespecifických produktů na minimum a zvýšíme tak přesnost a účinnost amplifikace.

Tabulka 3 Podmínky PCR reakce. Schéma programu zvoleného pro sekvenaci OBP.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
úvodní denaturace	95 °C	30 sekund	1
denaturace	95 °C	15 sekund	30
navázání primerů (annealing)	59 °C	30 sekund	
extenze	72 °C	40 sekund	
závěrečná extenze	72 °C	8 minut	1

Je známo, že polymerázy (*Taq* polymerázu nevyjímaje) pracují s jistou chybou, s přibývajícimi cykly zde tedy nastává určité nebezpečí (stoupá například s velikostí amplifikovaného segmentu; naše fragmenty byly dlouhé přibližně 700 až 800 bp) inkorporace nesprávného nukleotidu a vzniku nežádoucího artefaktu. S ohledem na sekvenační reakci proto nedoporučujeme příliš zvyšovat počet opakování – naprosto postačuje zhruba 30 cyklů. V praxi je však mnohdy nezbytné konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů nejdříve empiricky vyzkoušet, protože jenom tak lze zpravidla PCR optimalizovat a dosáhnout nejlepších možných výsledků.

Gelová elektroforéza

Jak už bylo naznačeno, sekvenování klade vysoké nároky na čistotu templátové DNA a přesnost její předchozí amplifikace. Proto jsme se rozhodli u každého vzorku před samotnou purifikací napřed ověřit jeho kvality elektroforézou v agarózovém gelu, abychom odhalili případnou kontaminaci či nespecifické produkty, a minimalizovali tak riziko selhání sekvenační reakce. Separace molekul DNA probíhala v 1,5% agarózovém gelu, který byl zcela ponořen ve vaně s elektroforetickým TBE (Tris-borát-EDTA) pufrém, při stálém napětí 100 V přibližně 40 až 60 minut, tedy do doby jejich přiměřeného roztržení. Příprava gelu je popsána níže.

Roztok agarózy nutný k výrobě gelu o zmíněné koncentraci přichystáme v mikrovlnné troubě povařením 0,6 g agarózového prášku v 40 ml TBE pufru. Čirý roztok hydratované agarózy poté přemístíme na magnetické míchadlo a za stálého míchání zchladíme asi na 55 °C. Před vylitím do předem nachystané formy s hřebenem vmícháme do roztoku 2 µl fluorescenčního barviva, konkrétně ethidium bromid. Když agaróza ztuhne čili dojde k její gelifikaci, vyjmeeme hřeben a vzniklý gel přendáme do elektroforetické vany, kde ho zalijeme

TBE pufrem. Do jamek po vyjmutém hřebenu pipetou opatrně nanese vzorky – 20 µl PCR produktu – smíchané se 4 µl nanášecího pufru (použit 6X Loading Buffer; TaKaRa). Do jedné z krajních jamek místo vzorku nanese 6 µl standardu neboli „žebříku“ (například GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bp; Fermentas), se kterým pak porovnááme velikost našich fragmentů. Po nanesení vzorků přiklopíme víko a uzavřenou vanu s gelem připojíme ke zdroji elektrického napětí.

Jakmile jsou molekuly DNA dostatečně roztríděny, odpojíme zdroj elektrického napětí a vyjmutý gel přeneseme na UV transiluminátor, kde z něho vyřízneme části obsahující zářící pruhy – viz následující pasáž.

Extrakce a purifikace DNA z agarózového gelu

Protože molekuly nukleové kyseliny s navázaným fluorescenčním barvivem při expozici UV záření jasně svítí, fragmenty DNA o shodné velikosti utvoří na gelu zřetelně ohraničené zářící pruhy. Prvním krokem extrakce DNA z agarózového gelu je tak vyříznutí těchto pruhů. Druhým je výběr některé z pestré škály izolačních metod. Vhodnou volbou je například postup využívající principu adsorpce na silikát, na němž jsou také založeny mnohé komerční kity. K našim experimentům jsme použili soupravu „QIAquick Gel Extraction Kit“ firmy Qiagen. Řídili jsme se pokyny výrobce v protokolu QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, který zde ve zkratce uvádím.

1. Skalpelem vykrojené kusy gelu odebereme do čistých 2 ml mikrozkušavek a zvážíme; na každých 100 mg gelu přidáme 300 µl QG pufru (Buffer QG) a při teplotě 50 °C inkubujeme 10 minut (nebo do doby úplného rozpuštění gelu). Během inkubace je dobré vzorky každé 2 až 3 minuty protřepat.

2. Roztok s rozpuštěným gelem přemístíme do QIAquick kolonky (QIAquick spin column) posazené ve 2 ml sběrné zkumavce (2 ml collection tube) a odstředíme – 13 000 rpm, 1 minuta (stejně podmínky jako v dalších krocích). Po centrifugaci vyjmeme kolonku, vylijeme obsah sběrné zkumavky a vrátíme kolonku zpět na místo.

3. Přidáme 500 µl QG pufru a odstředíme. Vylijeme obsah sběrné zkumavky.

4. K pročištění DNA použijeme 750 μ l PE pufru (Buffer PE). Ten necháme po vpravení do kolonky 2 až 5 minut působit a poté odstředíme. Vylijeme obsah sběrné zkumavky a ještě jednou odstředíme. (Celý tento krok lze v případě potřeby zopakovat).

5. Vyhodíme sběrnou zkumavku a kolonku umístíme do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Doprostřed silikátové membrány v kolonce pipetou nakapeme 30 μ l EB pufru (Buffer EB) nebo sterilní vody, necháme 5 minut stát a pak odstředíme, čímž dojde k eluci DNA. (Je dobré, když eluční činidlo napřed ohřejeme na 70 °C).

Získanou, nečistot zbavenou, DNA přichystáme rovnou na sekvenační reakci, jak si ukážeme vzápětí, nebo uchováваме při -20 °C pro pozdější aplikace.

Příprava vzorků na sekvenační reakci a analýza primárních dat

Sekvenování zajišťovala Laboratoř sekvenace DNA (www.natur.cuni.cz/~seqlab/), což je servisní pracoviště biologické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Laboratoř má v současnosti k dispozici dva automatické sekvenátory firmy Applied Biosystems – čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer a šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer. Oba přístroje využívají analýzu založenou na termálně-cyklické modifikaci známé Sangerovy metody (Sanger et al. 1977). Jelikož lze Sangerovou metodou sekvenovat pouze molekuly jednořetězcové DNA (single-stranded DNA; ssDNA), základem zmíněné modifikace je asymetrická PCR, to jest reakce s jedním primerem. Dalším krokem je kapilární elektroforéza, během níž probíhá pomocí stacionárního laseru detekce fluorescenčně značených produktů. Přečtená sekvence je pak zaznamenána přímo do paměti počítače. (Podrobný popis celé metody přesahuje rámec tohoto textu; blíže například stránky Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com).

Před odesláním na sekvenaci je potřeba vzorky na tuto závěrečnou etapu celého procesu náležitě připravit. Důležité je co nejpřesněji stanovit koncentraci DNA, protože vstupní množství templátu velkou měrou ovlivňuje konečný výsledek sekvenační reakce. Nízká koncentrace poskytuje slabý signál, příliš vysoká vede naopak k překrývajícím se píkům. Problémy může rovněž zapříčinit nevhodně zvolený primer nebo všelijak znečištěná DNA. Přítomnost nečistot v podobě různých inhibitorů (chloroform, fenol, polysacharidy), solí či proteinů nám kupříkladu signalizují nízké hodnoty indexů absorbance 260/280 a 260/230 (dobré jsou 1,8 a vyšší), které zobrazuje spektrofotometr při měření koncentrace. Vzorky na sekvenační reakci a analýzu nachystáme do 0,2 ml tenkostěnných zkumavek, kam postupně

pipetujeme templát, pro PCR fragmenty použijeme koncentraci 50–100 ng na reakci (drželi jsme se horní hranice), 3,2–5 pmol jednoho primeru (použili jsme výše uvedené primery na PCR) a pokud je nezbytné, doplníme sterilní (DEPC treated) vodou do objemu 14 μ l.

Výsledky analýzy jsou laboratoří zasílány e-mailem ve formátu *.ab1 (chromatogram), respektive *.fas. Abychom zvýšili robustnost našich výsledků a dostali kompletní sekvenci celého genu, osekvenovali jsme každý vzorek dvakrát, takříkajíc z obou konců – jednou za pomoci forward primeru a po druhé prostřednictvím reverse primeru. Překrývající se sekvence jsme pak v programu CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) složili dohromady neboli jsme utvořili takzvaný „contig“. Ze získaných sekvencí byl poté v programu MEGA 5 zkonstruován evoluční strom (Tamura et al. 2011). Použili jsme metodu neighbor-joining (Saitou a Nei 1987). Vizualizace a úprava obdržených sekvencí probíhala pomocí následujících programů a aplikací: Sequence Scanner Software v1.0, což je prohlížeč Applied Biosystems, který zobrazuje analyzovaná i „raw data“, BioEdit v7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>), ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) a JustBio (<http://www.justbio.com>).

3.4 Genotypizace

Vhodnou alternativou sekvenování je v určitých případech genotypizace založená na real-time PCR, která dokáže odhalit různé sekvenční varianty zkoumaných genů. Z nabízených metod jsme zvolili analýzu tání s vysokým rozlišením neboli „High resolution melting“ (HRM), což je nová jednoduchá post PCR technika pro identifikaci známých i neznámých mutací. Mezi její výhody patří vysoká specifita, citlivost a v porovnání s ostatními zavedenými metodami, jako je například genotypizace pomocí hydrolyzačních sond (end point detection), rovněž rychlost a finanční nenáročnost (nejsou potřeba žádné fluorescenční sondy).

Z níže popsaných důvodů lze jako templát pro HRM analýzu použít pouze dvouřetězcovou DNA (double-stranded DNA; dsDNA). Prvním krokem, který předchází vlastní analýze, je amplifikace cílové DNA pomocí PCR. Druhým krokem je postupné precizní zahřívání DNA amplikonů v teplotním rozpětí přibližně 60 až 95 °C, přičemž v určité fázi (až teplota dosáhne bodu tání jednotlivých DNA amplikonů) dojde k denaturaci molekul dsDNA. Princip HRM analýzy spočívá v tom, že je celý tento proces monitorován takříkajíc v reálném čase, což je umožněno díky přítomnosti fluorescenčního barviva, které interkaluje mezi báze DNA. Specifikem barviv určených pro HRM analýzu je to, že se váží výlučně na molekuly dsDNA a v komplexu s nimi silně fluoreskují. V případě absence dsDNA logicky

k interkalaci nedojde, takže fluorescence je nulová nebo zanedbatelná. Na začátku HRM analýzy je signál fluorescence nejsilnější, protože reakce obsahuje obrovské množství molekul dsDNA s navázaným fluorescenčním barvivem. S rostoucí teplotou PCR produkty postupně denaturují – molekul dsDNA ubývá –, čímž fluorescence slábne. Výsledkem je graf v podobě křivek tání, který zobrazuje úroveň fluorescence při určité teplotě. Sekvenční varianty jsou posléze detekovány jako změny profilu v křivkách tání.

K našim pokusům jsme využili přístroj LightCycler® 480 a kit „LightCycler® 480 High Resolution Melting Master“, jehož součástí je 2× koncentrovaný master mix (Master Mix, 2× conc.), ionty hořčíku Mg^{2+} ($MgCl_2$, 25 mM) a sterilní (PCR-grade) voda. Samotný master mix pak obsahuje polymerázu (FastStart Taq DNA Polymerase), reakční pufr (reaction buffer), směs nukleotidů (dNTP mix) a speciální fluorescenční barvivo pro HRM analýzu (High Resolution Melting Dye), které umožňuje detekovat sekvenční varianty pomocí rozdílů v křivkách tání. Velkou výhodou tohoto nového barviva, v porovnání s ostatními pro real-time PCR tradičně užívanými barvivy, jako je například SYBR Green I nebo ethidium bromid, je to, že neinhibuje enzymy, které zprostředkovávají amplifikaci. Protože vysoká koncentrace barviva neovlivňuje PCR, může dojít k úplné saturaci molekul dsDNA, které v tomto stavu zůstanou během celé HRM analýzy. Za těchto podmínek i záměna jednoho nukleotidu vyústí v malou, ale detekovatelnou změnu v profilu křivek tání. Specifické primery, jejichž sekvence zobrazuje tabulka 4, byly navrženy v programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Pravidlo pro HRM analýzu zní: čím kratší DNA amplikon, tím lepší rozlišení jednotlivých vzorků nesoucích různé sekvenční varianty. Nejlepší výsledky poskytují DNA amplikony do velikosti 300 bp. Velikost našich PCR produktů byla 68 (gen Obp5), respektive 80 bp (gen Obp6). Pro HRM analýzu je nezbytná vysoce specifická amplifikace, proto by koncentrace primerů neměla být příliš vysoká. Doporučovaná koncentrace se pohybuje v rozmezí 0,1–0,3 μM pro každý primer (konečná koncentrace v reakci), čehož jsme se drželi. Kvůli velkým nárokům na přesnost amplifikace je rovněž nutné pro každou dvojici primerů empiricky stanovit optimální koncentraci $MgCl_2$ (v našem případě byla optimální konečná koncentrace Mg^{2+} 2,5 mM). Jako templát lze aplikovat jakoukoli z hlediska čistoty a koncentrace pro PCR vhodnou DNA (genomová DNA nebo cDNA), a to v množství 5–30 ng na jednu 20 μl reakci (použili jsme 15 ng na 10 μl reakci). Pro správný průběh analýzy je důležité použít v každé reakci stejné množství templátu, jinými slovy je potřeba srovnat vstupní koncentrace jednotlivých vzorků. Následující odstavec popisuje složení reakční směsi a přípravu reakce.

Tabulka 4 Sekvence primerů navržených pro real-time PCR genotypizaci metodou High Resolution Melting.

Gen	Forward primer	Reverse primer
Obp5	TTGTGGATGAGTCACCTGAGA	TGTTTTCCGGTCAGCTCTGT
Obp6	TTGCTATTGCTGCTGATAGAGT	TTCACAGGTAAGGCTACGACAA

Všechny výše uvedené komponenty nejprve rozmrazíme, odstředíme, opatrně promísíme pipetou (nikoli třepačkou) a umístíme na led, kde provádíme veškeré práce. V dalším kroku přichystáme do 1,5 ml mikrozkuhavky PCR mix, který pro jednu 10 µl reakci sestává z 5 µl master mix, 1 µl smíchaných primerů (konečná koncentrace v reakci 4 µM), 1 µl MgCl₂ a 1 µl sterilní vody. (Pro přípravu více než jedné reakce vynásobíme uvedené objemy odpovídajícím počtem reakcí – vzorků). PCR mix opatrně promícháme špičkou pipety a vpravíme 8 µl do každé jamky 384 jamkové mikrodestičky. Na závěr přidáme 2 µl templátu a jamkový blok přetáhneme speciální krycí folií, která umožňuje odečet fluorescence a zároveň zabraňuje vypaření vzorků. Po centrifugaci (2 minuty, 1 500 × g) vložíme destičku se vzorky do přístroje LightCycler® 480 a inkubujeme dle instrukcí zvoleného programu (tabulka 5). Po jeho skončení zvolíme analýzu „gene scanning“ a software automaticky provede všechny potřebné výpočty.

Tabulka 5 Schéma zobrazuje jednotlivé parametry programu zvoleného pro real-time PCR genotypizaci metodou High Resolution Melting. (Pro lepší přehlednost uváděno v angličtině).

Setup				
Detection Format	Block Type	Reaction Volume		
SYBR Green I / HRM Dye	384	10 µl		
Programs				
Program Name	Cycles	Analysis Mode		
Pre-Incubation	1	None		
Amplification	40	Quantification		
HRM	1	Melting Curve		
Cooling	1	None		
Temperature Targets				
Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisition [per °C]
Pre-Incubation				
95	None	00:10:00	4.8	-
Amplification				
95	None	00:00:10	4.8	-
58	None	00:00:15	2.5	-
72	Single	00:00:10	4.8	-
High Resolution Melting				
95	None	00:01:00	4.8	-
40	None	00:01:00	2.5	-
65	None	00:00:01	1 / 1	-
90	Continuous	-	-	25
Cooling				
40	None	00:00:10	2.5	-

3.5 Genová exprese

Real-time PCR, při které použijeme jako templát RNA, respektive cDNA, říkáme „real-time reverse-transcription PCR“ neboli qRT-PCR. Ta představuje ideální nástroj pro detekci a kvantifikaci mRNA. Na rozdíl od konvenční PCR je fluorescence měřena během každého cyklu, přičemž její intenzita odpovídá množství PCR produktu přítomného v reakční směsi. Výsledkem je graf v podobě amplifikačních křivek, kde osa x udává počty cyklů a osa y hodnoty fluorescence. Typická amplifikační křivka má tři fáze: V první fázi, na počátku reakce, je fluorescence neměřitelná – neodlišitelná od pozadí. Druhé fázi říkáme exponenciální, protože zde množství PCR produktu exponenciálně roste. Ve třetí fázi dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál tudíž zůstává konstantní. To, v jakém cyklu amplifikační křivka vstoupí do exponenciální fáze, závisí na vstupním množství templátu daného vzorku (čím více templátu, tím dříve je dosaženo exponenciální fáze). Cyklus, kdy se tak stane, označujeme zkratkou C_T (threshold cycle). Známe dvě metody kvantifikace templátu – absolutní a relativní.

Absolutní kvantifikace umožňuje stanovit výchozí počet kopií molekul cílové DNA, přičemž konečným výsledkem je v tomto případě absolutní hodnota (například počet kopií/ml). Takové analýzy mají širokou škálu využití v mikrobiologii a virologii při detekci rozličných mikroorganismů. Naproti tomu relativní kvantifikace porovnává úroveň exprese dvou genů stejného vzorku – prvním je gen našeho zájmu a druhým nějaký referenční gen (provozní gen), jehož míra exprese je konstantní v různých buňkách i podmínkách, byť to vždy neplatí. Tento referenční gen, též známý jako endogenní kontrola, poskytuje základ pro normalizaci rozdílů v genové expresi mezi různými vzorky. Relativní kvantifikace je optimální technika pro určení genové exprese.

Pro naši studii jsme využili systém navržený firmou Roche, postavený na 165 krátkých hydrolyzačních sondách označených na 5' konci fluorescenčním barvivem (FAM) a na 3' konci takzvaným zhášečem (dark quencher dye), které hybridizují s určitou sekvencí amplifikovaného segmentu. Kombinace specifických primerů a vybrané sondy zaručuje vysoce přesnou a účinnou amplifikaci. K návrhu primerů byl použit speciální software firmy Roche (Universal Probe Library – UPL, <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>), který zároveň automaticky zvolí nejvhodnější sondu – sekvence jednotlivých primerů a čísla sond jsou uvedeny v tabulce 6. Všechny primery byly navrženy tak, aby amplifikovaný segment překlenul intron (intron spanning assay), což znemožní amplifikaci nežádoucí DNA. Abychom získali co nejpřesnější hodnoty relativní

exprese, použili jsme soustavu dvou sond (dual hydrolysis probe system) – jedna, specifická pro gen našeho zájmu, byla značena barvivem FAM a druhá, specifická pro referenční gen, byla značena barvivem HEX. Jako referenční jsme použili gen GAPDH, jenž kóduje enzym glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu. Tento enzym katalyzuje šestý krok glykolýzy, tedy metabolické dráhy životně důležité pro téměř všechny známé organismy. Paralelně s analyzovanými geny pro OBP jsme amplifikovali ještě provozní gen ATP5b, který byl procesován stejným způsobem a sloužil tak jako kontrola. Hodnoty C_T pro jednotlivé vzorky byly spočteny doporučenou metodou maxima druhé derivace (2nd Derivate Maximum). Jelikož byly všechny vzorky provedeny v triplikátech, bylo nutné nejprve vypočítat průměrnou hodnotu jejich C_T , přičemž bylo ověřeno, že standardní odchylka v rámci jednotlivých triplikátů nepřesahuje 0,5 C_T . Pokud se takové vzorky vyskytly, byly z dalšího výpočtu vyřazeny. Účinnost PCR amplifikace byla stanovena pro každou dvojici primerů pomocí standardních kalibračních křivek, které byly připraveny reakcí s ředící řadou cDNA. Množství mRNA analyzovaných genů (target) bylo normalizováno prostřednictvím referenčního genu GAPDH, a s ohledem na PCR efektivitu (E), podle vzorce: normalizovaná exprese genu = $(1+E_{\text{reference}})^{C_p \text{ reference}} / (1+E_{\text{target}})^{C_p \text{ target}}$.

Tabulka 6 Sekvence primerů navržených pro qRT-PCR a číslo použité UPL sondy.

Gen	Forward primer	Reverse primer	# UPL sondy
ATP5b	GGCACAATGCAGGAAAGG	TCAGCAGGCACATAGATAGCC	77
Obp1	GCGCACCCCTTTACATAGCTG	ACGCTCTCAGGTCTCCATTC	39
Obp5	GGACCATGGAAAACCTGTTGC	CAGTTCTCCACCTCTCTCTATCTTG	146
Obp6	CCTGTCCTGAGTAATGATCTTCT	CTGATTCCACAGTCATGAGGTT	18
Obp7	TCAAGCAAATGGACAATGC	TGCCATCTTCTTGCTTATACCC	114

Příprava vlastní reakce je obdobná jako u výše popsané real-time PCR genotypizace s tím rozdílem, že v tomto případě byl použit kit „LightCycler® 480 Probes Master“, který obsahuje 2× koncentrovaný „hot start master mix“, jehož součástí je také polymeráza (FastStart Taq DNA Polymerase), a sterilní (PCR-grade) vodu. Aby se předešlo jakékoli kontaminaci DNA, která by mohla negativně ovlivnit amplifikaci a průběh celé analýzy, byly všechny vzorky ošetřeny DNázou. Postupovali jsme přesně dle pokynů výrobce (Fermentas) v protokolu „DNase I, RNase-free, #EN0521“. Takto připravenou RNA jsme použili jako

templát pro reverzní transkripci, která je probrána v příslušném oddíle věnujícím se sekvenaci.

Tabulka 7 Schéma zobrazuje jednotlivé parametry programu zvoleného pro qRT-PCR (Pro lepší přehlednost uváděno v angličtině).

Setup				
Detection Format	Block Type	Reaction Volume		
Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe	384	10µl		
Programs				
Program Name	Cycles	Analysis Mode		
Pre-Incubation	1	None		
Amplification	55	Quantification		
Cooling	1	None		
Temperature Targets				
Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisition [per °C]
Pre-Incubation				
95	None	00:10:00	4.8	-
Amplification				
95	None	00:00:10	4.8	-
60	Single	00:00:30	2.5	-
72	None	00:00:01	4.8	-
Cooling				
40	None	00:00:30	2.5	-

4. Výsledky

4.1 Sekvenace

Úvodní částí našeho projektu byla sekvenace genového shluku OBP u divokých myší poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Jelikož jsme sekvenovali transkript, nebylo možné osekvenovat geny Obp2P a Obp4P, protože jsou to nefunkční pseudogeny, jejichž mRNA se nepodařilo detekovat a tudíž ani amplifikovat. To může být zapříčiněno například tím, že k přepisu těchto pseudogenů vůbec nedochází, nebo RNA sice vzniká, ale je následně degradována. Bylo už řečeno, že geny Obp1 a Obp3, stejně tak Obp7 a Obp8, nelze prakticky rozlišit, proto jsme sekvenovali vždy pouze jeden z každé dvojice, konkrétně Obp1 a Obp7. Pomocí sady specifických primerů jsme získali od 10 jedinců obou studovaných poddruhů kompletní sekvence genů Obp1, Obp5, Obp6 a Obp7, čímž jsme mimo jiné potvrdili existenci dosud jen předpokládaných genů Obp1 (Gm14744; ENSMUSG00000079522) a Obp6 (Gm5938; ENSMUSG00000079521). V rámci jednoho poddruhu a genu byly výsledky vysoce konzistentní, to znamená, že sekvenace neodhalila téměř žádné jednonukleotidové polymorfismy (Single-nucleotide polymorphisms; SNP), natož mutace většího rozsahu, nicméně vzorek 10 jedinců je samozřejmě příliš malý na to, aby šlo spolehlivě odhadnout míru vnitrodruhového polymorfismu těchto genů. Naproti tomu mezidruhové srovnání ukázalo v každém genu nejméně jednu substituci specifickou pro daný poddruh, třebaže jinak byly sekvence skoro identické. Ve většině případů se jednalo o mutaci se změnou smyslu, tedy takovou mutaci, v jejímž důsledku je jedna aminokyselina nahrazena jinou.

Abychom se dozvěděli něco o evoluční historii OBP, osekvenovali jsme čtyři jedince myši africké (*Mus minutoides*), u nichž jsme objevili totožný shluk genů jako má myš domácí. Kromě genů Obp1, Obp5, Obp6 a Obp7 se podařilo osekvenovat i předpokládaný pseudogen Obp4P, z čehož lze usuzovat, že tento gen je u myši africké plně funkční. Všechny obdržené sekvence jsme přeložili do proteinu a porovnali s homologickými protějšky obou zástupců komplexu *Mus musculus* (v případě Obp4P pouze se sekvencí, která je uvedena v databázích), jak ukazují obrázky 6–10. Identita sekvencí se pohybovala kolem 70–80 %, přičemž největší rozdíly vykazoval gen Obp4P. Naopak gen Obp5 (99–100% identita) se od divergence podrodů *Mus* a *Nannomys*, tedy doby před přibližně 5 miliony let, v podstatě nezměnil.

Genealogické vztahy dosud známých savčích OBP byly odvozeny metodou neighbour-joining (Saitou a Nei 1987). Optimální strom vzešlý z fylogenetické analýzy, jež zahrnovala

celkem 35 aminokyselinových sekvencí, včetně nově získaných, je znázorněn na obrázku 11. Jako outgroup k zakořenění stromu byl zvolen OBP57d octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) a nedávno objevený OBP drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Kompletní soubor v analýze použitých sekvencí je uveden v příloze 2. Evoluční vzdálenosti byly vypočítány pomocí metody, která vychází z předpokladu, že míra substitucí aminokyselin v každé pozici odpovídá Poissonovu rozdělení (the Poisson-correction method) (Zuckerkanndl a Pauling 1965). Všechny pozice obsahující mezery a chybějící data byly odstraněny, přičemž závěrečný dataset zahrnoval celkem 123 pozic. K ověření spolehlivosti jednotlivých částí stromu byla použita resamplingová technika, konkrétně bootstrapping (2000 opakování) (Felsenstein 1985). Analýza byla zpracována prostřednictvím programu MEGA 5 (Tamura et al. 2011).

Obp1 (ENSMUSG00000079522)

```

                *           20           *           40           *           60
musculus      : MVKFLLIALALGVSCAHHESLDISPSEIDGNWRTFYIAADKEEKVKMNGALRAYFEHMEC : 60
domesticus   : MVKFLLIAIALGVSCAHHESLDISPSEVNGDWRTLYIAADKVEKVKMNGDLRAYFQHMEC : 60
minutoides   : ---FLLIALALGVSCAHHESLDISPSEVNGAWRTLYIASDNVDKVKEGGELRAYFEHMEC : 57
              mvkFLLIA6ALGVSCAHHESLDISPSE61G WRTLYIAaDkveKVKmnG LRAYF2HMEC

                *           80           *           100          *           120
musculus      : NDDCGTLKVKFHVQMNGKQCQHTTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVRKKDGALFFHNVN : 120
domesticus   : NDDCGTLKVKFHVQMNGKQCQHTTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVMKEDGALFFHNVN : 120
minutoides   : SEDCQTLKVKFHVQVNSECQHTTVVGEKKEDGRYTTDYSGRNYFHVVMKKDGALYFHNVN : 117
              ndDCgTLKVKFHVQ6NgkCQHTTVVGEKqEDGRYTTDYSGRNYFeVVmKkDGAL5FHNVN

                *           140          *           160           *
musculus      : VDESGQETNVILVAGKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDCNQ : 173
domesticus   : VDESGQETNVILVAGKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDCNQ : 173
minutoides   : VDENEQKTNVILVAGKEETLSKAQKQELKLLKEYNIPKENIQHLAPTDCNQ : 170
              VDEsgQeTNVILVAGKgETLSKAQKQELgKL6KEYNIPKENIQHLAPTDCNQ

```

Obrázek 6 Alignment proteinových sekvencí Obp1 druhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus (Nannomys) minutoides*. Červeně je vyznačen pro lipokaliny charakteristický sekvencní motiv GxW strukturně konzervativní oblasti SCR1, zeleně je naznačen motiv CxxxC, jenž je typický pro rodinu OBP. Identita sekvencí Obp1 mezi oběma zástupci komplexu *Mus musculus* a druhem *Mus (Nannomys) minutoides* dosahuje 83–84 %.

Obp4P (ENSMUSG00000080890)

```

                *           20           *           40           *           60
databáze      : MVKFLLLALT FGLAHAQT DGPWKTIAIAADNVDKIEISGEDKIEISGELRLYFHQITCEK : 60
minutoides    : MVKFLLLALAFGLAHAEME GPWKTVAIAADR V GKIEPNGE-----LRLYLRSLECED : 52
                MVKFLLLAL FGLAHA2 GPWKT6AIAAD V KIE GE LRLY 6 CE

                *           80           *           100          *           120
databáze      : ECKKMN VTFYV NENGQC3LTTITGYLQDDGNTYRSQFQGDNHYATVRTTPENIVFYSENV : 120
minutoides    : ECQKLI VTFYV LENEQCTLT KVTGYLQ EDEKTYRSQFQGDNHYKL LKQTRKHLV FYSENE : 112
                EC K6 VTFYV EN QC3LT 6TGYLQ D TYRSQFQGDNHY 64 T 6VFYSEN

                *           140          *           160          *
databáze      : DRAGRKTKLVYVVGSGHPLTLEQKEKIVEYAKENNIPPGNIREVLTDDYCPR- : 172
minutoides    : DRADRKTKLIFVLG-HEPLTTEENEQFESYAESKGIPPENIRHVLETDTCPEV : 164
                DRA RKTKL65V6G PLT E2 E YA IPP NIR VL TD CP

```

Obrázek 7 Alignment proteinových sekvencí Obp4P mezi databází (*Mus musculus*) a druhem *Mus (Nannomys) minutoides*. Červeně je vyznačen pro lipokaliny charakteristický sekvencní motiv GxW strukturně konzervativní oblasti SCR1, zeleně je naznačen motiv CxxxC, jenž je typický pro rodinu OBP. V sekvenci získané z databáze jsou dobře patrné inserce, které vedly mimo jiné k posunu čtecího rámce (posunové mutace), což pravděpodobně zapříčinilo ztrátu funkce Obp4P u myši domácí. Identita sekvencí mezi databází a druhem *Mus (Nannomys) minutoides* dosahuje 64 %.

Obp5 (ENSMUSG00000067684)

```

                *          20          *          40          *          60
musculus      : MAKFLLLALTFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
domesticus   : MAKFLLLALTFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
minutoides   : MAKFLLLALTFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
              MAKFLLLALTFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT

                *          80          *          100         *          120
musculus      : FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRTK : 120
domesticus   : FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRTK : 120
minutoides   : FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRTK : 120
              FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRTK

                *          140         *          160
musculus      : LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAEEKGIPAKNIREVLITDYCPE : 163
domesticus   : LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAEEKGIPARNIREVLITDYCPE : 163
minutoides   : LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAEEKGIPARNIREVLITDYCPE : 163
              LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAEEKGIPA4NIREVLITDYCPE

```

Obrázek 8 Alignment proteinových sekvencí Obp5 druhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus (Nannomys) minutoides*. Červeně je vyznačen pro lipokaliny charakteristický sekvenční motiv GxW strukturně konzervativní oblasti SCR1, zeleně je naznačen motiv CxxxC, jenž je typický pro rodinu OBP. Identita sekvencí Obp5 mezi oběma zástupci komplexu *Mus musculus* a druhem *Mus (Nannomys) minutoides* dosahuje 99–100 %, což znamená, že je tento gen extrémně konzervativní.

Obp6 (ENSMUSG00000079521)

```

          *           20           *           40           *           60
musculus   : MAKFLLLAFAFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
domesticus : MAKFLLLAFAFGLAHAAMEGGPWKTVAIAADRVDKIERGGKLRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
minutoides : MAKFLLLAFAFGLAHAEMEGPWKTVAIAADRVGKIEPNGELRLYLRSLECEDECQKLIVT : 60
           MAKFLLLAFAFGLAHAaMEGPWKTVAIAADRVdKIErgGeLR6YcRSLtCEkEcke6kVT

          *           80           *           100          *           120
musculus   : FYVLENGQCSLTTITGYLQEDGKTKTKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDRADRRKTK : 120
domesticus : FYVLENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDRADRRKTK : 120
minutoides : FYVLENEQCTLTKVTGYLQEDEKTYRSQFQGDNHYKLLKQTRKHLVFYSENEDRADRRKTK : 120
           FYVLENGqQC3LTt6TGYLQEDgKTy43Q5QGDNHYeL6K2TpenLVFYSEnvDRADRRKTK

          *           140          *           160
musculus   : LIFVLGNKPLTSEENERLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE- : 163
domesticus : LIFVLGNKPLTSEENERLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE- : 163
minutoides : LIFVLGHEPLTTEENEQFESYAESKGIPPENIRHVLETDTCPEV : 164
           LIFVLGnkPLT3EENERlvkYAvSshIPPENIRHVLgTDTCPE

```

Obrázek 9 Alignment proteinových sekvencí Obp6 druhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus (Nannomys) minutoides*. Červeně je vyznačen pro lipokaliny charakteristický sekvenční motiv GxW strukturně konzervativní oblasti SCR1, zeleně je naznačen motiv CxxxC, jenž je typický pro rodinu OBP. Identita sekvencí Obp6 mezi oběma zástupci komplexu *Mus musculus* a druhem *Mus (Nannomys) minutoides* dosahuje 76 %.

Obp7 (ENSMUSG00000067679)

```

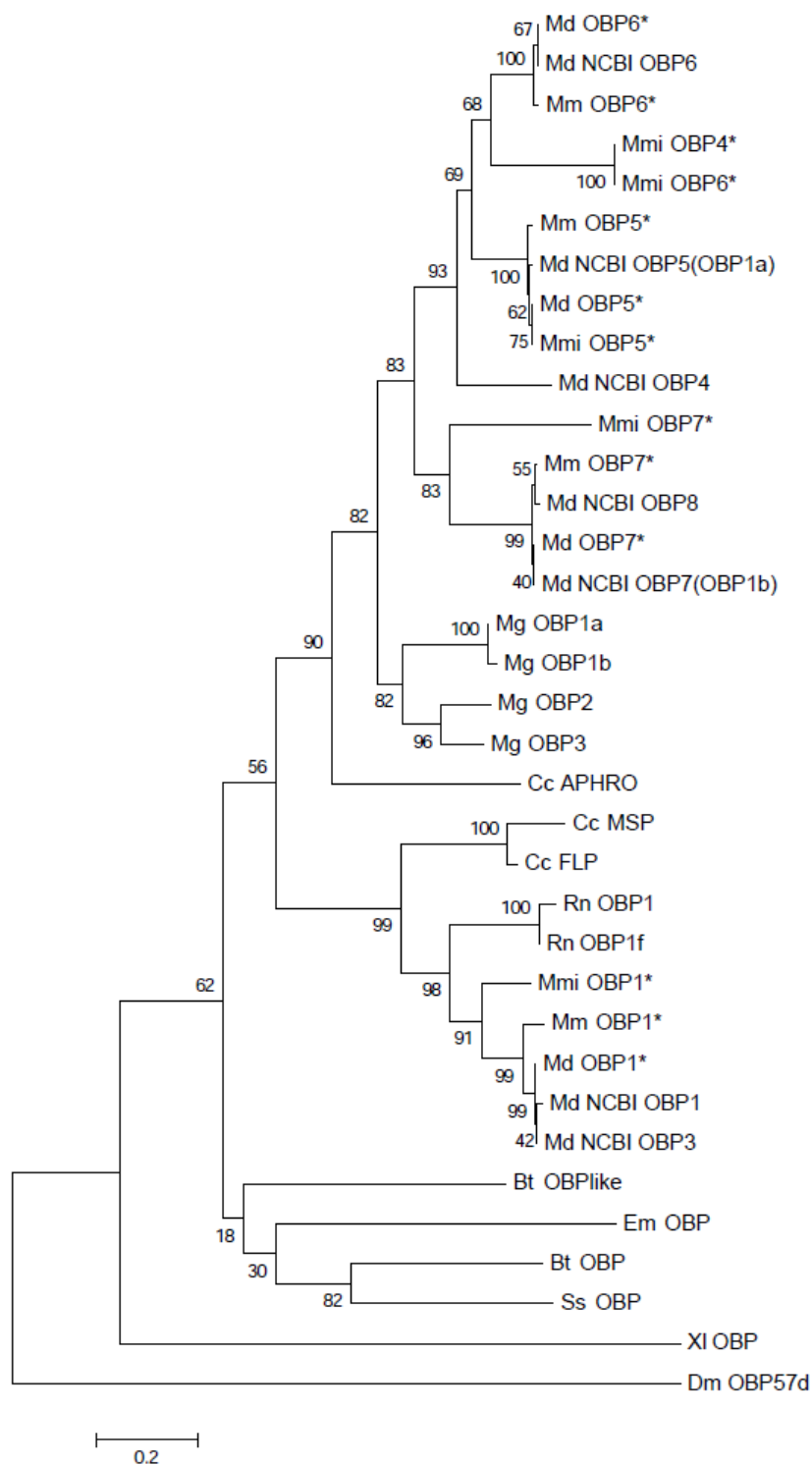
                *           20           *           40           *           60
musculus      : MMVKFLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGQWKTAIMADNIDKIETSGPLELQVREITCDEG : 60
domesticus    : MMVKFLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGQWKTAIMADNIDKIETSGPLELQVREITCDEG : 60
minutoides    : MMVKFLLLALAFGLT--HAHEHAQLEGQWRTLAIMADNMDLIEHGGRMELFIREITCDDN : 58
              MMVKFLLLALvFGLahvHAHdHp2L2GQW4TtAIMADN6DkIetsGp6ELF6REITCDeg

                *           80           *           100          *           120
musculus      : ---CQKMKVTFYVnQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFYDE : 117
domesticus    : ---CQKMKVTFYVnQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFYDE : 117
minutoides    : DEECkEMRVSFYVnQNGQCSKTIIVIGYMEEDQQTYYTNQYEGENHYRLLEGTSeyLIFYDE : 118
              CqkM4V3FYVnQNGQCSLttvtGYk2EDgkT5kNqYEGENnY4LLkaTSEnL6FYDE

                *           140          *           160           *
musculus      : NVDRASRRTKLLYiLGKGEALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLKELAHEDTCPE : 171
domesticus    : NVDRASRRTKLLYiLGKGEALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLRELAHEDTCPE : 171
minutoides    : NVDRASRKSKLLYALGKGDPLEEEQKEKLLAFakeKGIpaENIKLLTHEdICPE : 172
              NVDRASRK3KLLYiLGKGeaLThEQKE4ltelAt2KGIPAgN64eLaHEDtCPE

```

Obrázek 10 Alignment proteinových sekvencí Obp7 druhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus (Nannomys) minutoides*. Červeně je vyznačen pro lipokaliny charakteristický sekvenční motiv GxW strukturně konzervativní oblasti SCR1, zeleně je naznačen motiv CxxxC, jenž je typický pro rodinu OBP. U druhu *Mus (Nannomys) minutoides* je zajímavá inserce tří aminokyselin právě v místě tohoto motivu. Identita sekvencí Obp7 mezi oběma zástupci komplexu *Mus musculus* a druhem *Mus (Nannomys) minutoides* dosahuje 67–68 %.



Obrázek 11 Evoluční strom OBP zkonstruovaný metodou neighbour-joining. Vedle větví jsou uvedeny hodnoty bootstrappingového testu, který byl spočten pro 2000 opakování. Délka jednotlivých větví odráží předpokládanou míru evolučních změn v sekvencích porovnávaných taxonů. Bt – *Bos taurus*; Dm – *Drosophila melanogaster*; Cc – *Cricetus cricetus*; Em – *Elephas maximus*; Md – *Mus musculus domesticus*; Mg – *Myodes glareolus*; Mm – *Mus musculus musculus*; Mmi – *Mus minutoides*; Rn – *Rattus norvegicus*; Ss – *Sus scrofa*; XI – *Xenopus laevis*. APHRO – aphrodisin; FLP – female lacrimal protein; MSP – male-specific protein. NCBI – sekvence z GenBank. Nové sekvence jsou označeny *.

4.2 Genotypizace

Poněvadž nás zajímalo, zda sekvenací odhalené rozdíly mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* jsou zakonzervované uvnitř populací těchto forem myši domácí, rozhodli jsme se provést real-time PCR genotypizaci několika desítek jedinců obou linií. Spíše než o počet se nám v této fázi genotypizace jednalo o různorodost vzorků a odzkoušení celé metody. Kromě výše zmíněných poddruhů jsme použili i několik jejich hybridů a rovněž pár individuí příbuzného druhu *M. spicilegus*. Analýza zahrnovala celkem 107 zvířat pocházejících z různých lokalit v Evropě, Africe a Asii. Ke genotypizaci jsme si vybrali dva geny, *Obp5* a *Obp6*, a v každém z nich jednu substituci, která má vyjádření na úrovni proteinu. Záměrně jsme zvolili záměny, kdy je aminokyselina nahrazena aminokyselinou rozdílných fyzikálně-chemických vlastností, protože takové záměny mohou mít podstatný vliv na terciární strukturu a biologické funkce proteinu. V případě *Obp5* je isoleucin (nepolární aminokyselina) u poddruhu *M. m. musculus* nahrazen threoninem (nenabitá polární aminokyselina) u poddruhu *M. m. domesticus* a v případě *Obp6* je lysin (kladně nabitá polární aminokyselina) u poddruhu *M. m. musculus* nahrazen glutamovou kyselinou (záporně nabitá polární aminokyselina) u poddruhu *M. m. domesticus*, jak ukazují obrázky 12 a 13.

```

*           20           *           40           *           60
musculus   : MAKFLLLALTFGLAHAAMEGPPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
domesticus : MAKFLLLALTFGLAHAAMEGPPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
           MAKFLLLALTFGLAHAAMEGPPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT

*           80           *           100          *           120
musculus   : FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLIFYSENVDADRDKTK : 120
domesticus : FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLIFYSENVDADRDKTK : 120
           FYVNENGQCSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNNRYKLVDESPENLIFYSENVDADRDKTK

*           140          *           160
musculus   : LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAAEKGIPAKNIREVLITDYCPE : 163
domesticus : LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAAEKGIPARNIREVLITDYCPE : 163
           LLFILGHGPLTSEQKEKFAELAAEKGIPA4NIREVLITDYCPE
```

Obrázek 12 Aligned protein sequences of *Obp6* from *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus* with the substitution Ile/Thr highlighted, which was the subject of genotyping.

```

          *           20           *           40           *           60
musculus   : MAKFLLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
domesticus : MAKFLLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGKLR IYCRSLTCEKECKEMKVT : 60
           MAKFLLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGG LRIYCRSLTCEKECKEMKVT

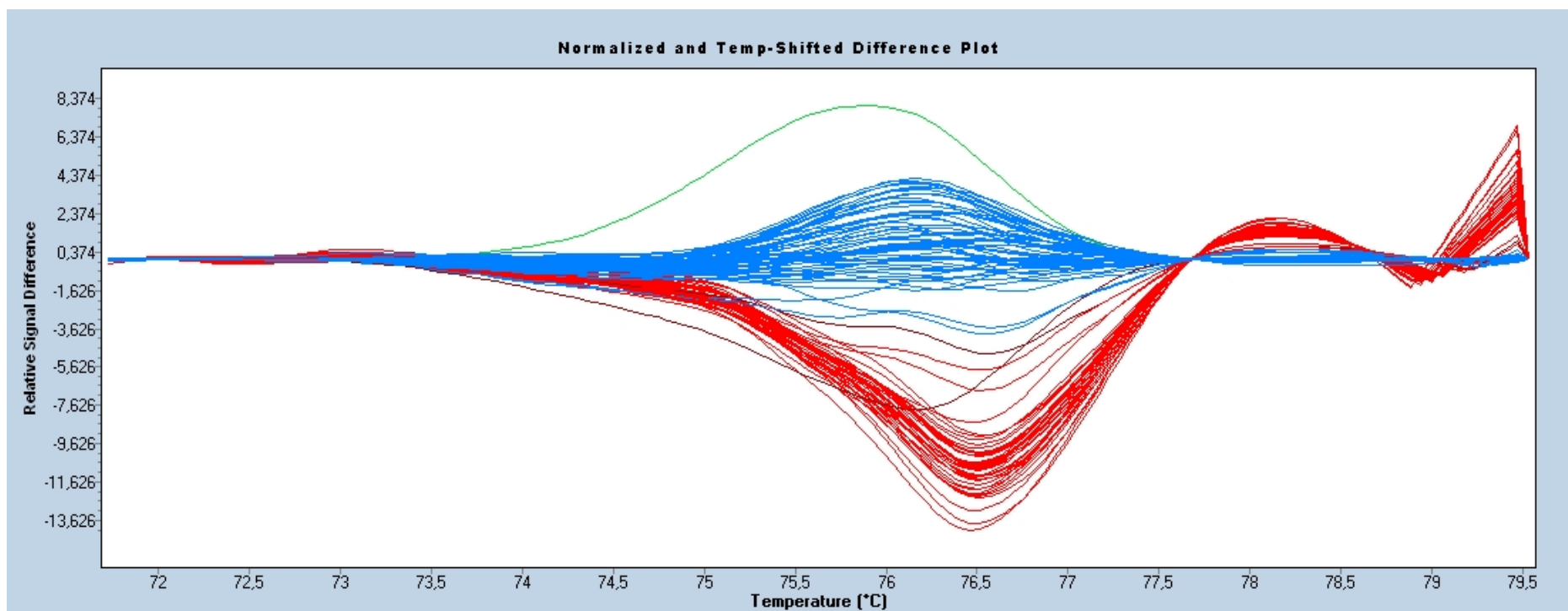
          *           80           *           100          *           120
musculus   : FYVLENGQCSSLTTITGYLQEDGKTKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDADRKTK : 120
domesticus : FYVLENGQCSSLTTITGYLQEDGKTKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDADRKTK : 120
           FYVLENGQCSSLTTITGYLQEDGKT KTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDADRKTK

          *           140          *           160
musculus   : LIFVLGNKPLTSEENERLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE- : 163
domesticus : LIFVLGNKPLTSEENERLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE- : 163
           LIFVLGNKPLTSEENERLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE

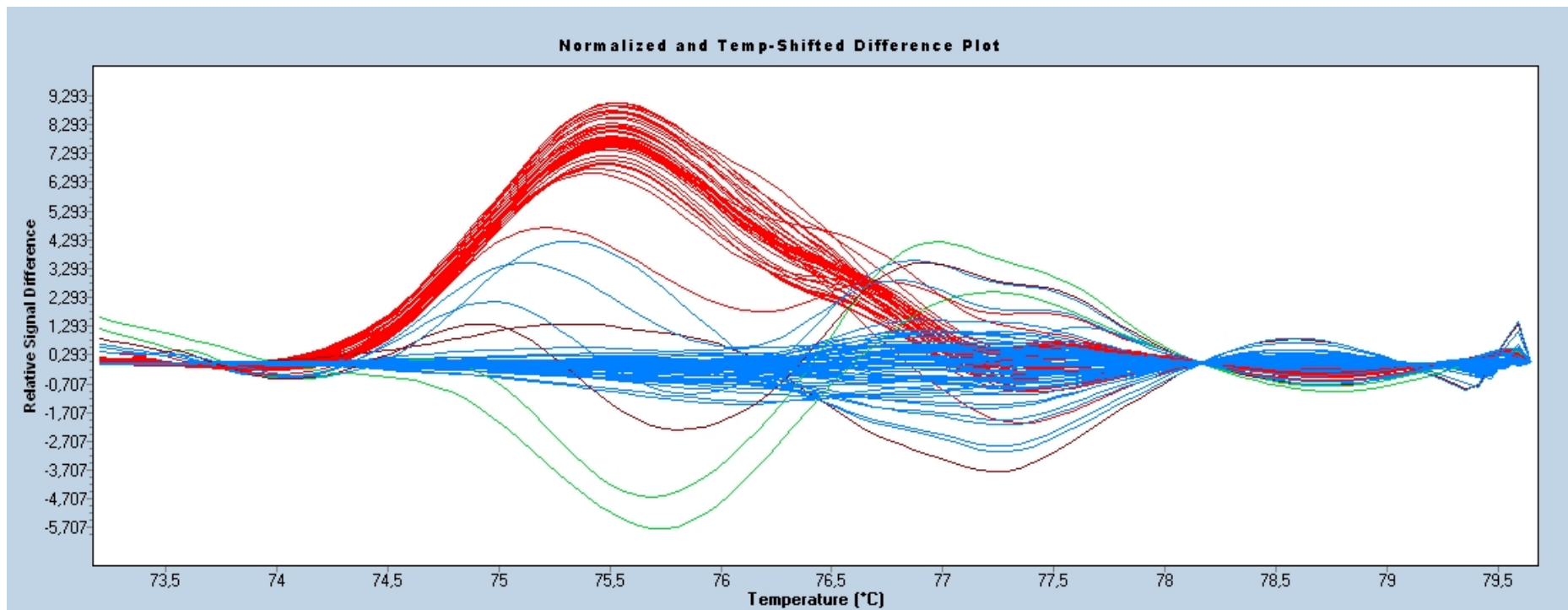
```

Obrázek 13 Alignment proteinových sekvencí Obp6 druhů *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* s vyznačenou záměnou Glu/Lys, která byla předmětem genotypizace.

Výsledky genotypizace prezentují obrázky 14 a 15. Po amplifikaci pomocí real-time PCR a HRM analýze se jednotlivé vzorky seskupily na základě profilů křivek tání, které odpovídají jejich sekvenci. Analýza potvrdila v drtivé většině případů u všech vzorků *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* variantu, která byla u daných taxonů zjištěna sekvenací. Největší variabilita byla podle očekávání objevena u hybridů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, u kterých byly nalezeny obě varianty typické pro rodičovské druhy. Z tohoto hlediska byly rovněž zajímavé ostrovní populace *M. m. domesticus* z Velké Británie, u kterých se také vyskytovalo největší procento neznámých vzorků, byť celkově bylo téměř nulové. V některých případech analýza odhalila třetí, sekvenací nezjištěnou variantu. Pozoruhodné je to, že profily křivek tání každého analyzovaného vzorku *M. spicilegus* byly shodné s těmi odvozenými pro vzorky *M. m. musculus*, což znamená, že oba druhy nesou stejnou sekvenční variantu. Mimo jiné se tak nepřímo potvrdila existence genů Obp5 a Obp6 u druhu *M. spicilegus*. Kompletní přehled vzorků s lokalitou původu a zjištěnou sekvenční variantou je uveden v tabulce 8.



Obrázek 14 Graf zobrazuje výsledky HRM analýzy Obp5 ampliconů nesoucích různé sekvenční varianty. Jednotlivé vzorky jsou seskupeny na základě profilů křivek tání, které odpovídají jejich sekvenci. Červeně jsou vyznačeny křivky tání vzorků nesoucích variantu sekvenací zjištěnou u poddruhu *Mus musculus domesticus*, modře jsou označeny křivky tání vzorků nesoucích variantu, kterou sekvenace odhalila u poddruhu *Mus musculus musculus*, zelená křivka představuje třetí, sekvenací nezjištěnou variantu, a hnědé křivky reprezentují vzorky, u nichž se sekvenční varianta nepodařila přesně určit. Jednotlivé vzorky, lokalita původu a konkrétní detekovaná varianta jsou uvedeny v tabulce 8.



Obrázek 15 Graf zobrazuje výsledky HRM analýzy Obp6 ampliconů nesoucích různé sekvenční varianty. Jednotlivé vzorky jsou seskupeny na základě profilů křivek tání, které odpovídají jejich sekvenci. Červeně jsou vyznačeny křivky tání vzorků nesoucích variantu sekvenací zjištěnou u poddruhu *Mus musculus domesticus*, modře jsou označeny křivky tání vzorků nesoucích variantu, kterou sekvenace odhalila u poddruhu *Mus musculus musculus*, zelené křivky představují třetí, sekvenací nezjištěnou variantu, a hnědé křivky reprezentují vzorky, u nichž se sekvenční varianta nepodařila přesně určit. Jednotlivé vzorky, lokalita původu a konkrétní detekovaná varianta jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Přehled vzorků DNA použitých pro genotypizaci. V tabulce je uveden druh, lokalita původu a detekovaná sekvenční varianta pro geny Obp5 a Obp6. Alela MD – varianta odhalená sekvenací u poddruhu *Mus musculus domesticus* (Obp5 – triplet ACA, threonin; Obp6 – triplet AAA, lysin); alela MM – varianta odhalená sekvenací u poddruhu *Mus musculus musculus* (Obp5 – triplet ATA, isoleucin; Obp6 – triplet GAA, glutamová kyselina).

Druh	Lokalita původu	Detekovaná sekvenční varianta	
		Obp5	Obp6
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Hattingen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Hattingen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Hattingen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Alžírsko, Oran	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Španělsko, Barcelona	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Jordánsko, Akaba	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Řecko, Kilkis	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Sýrie, Tell Sheikh Hamad	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Sýrie, Tell Sheikh Hamad	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Benk	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Egypt, oáza Bahariya	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Egypt, oáza Dakhla	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Egypt, oáza Dakhla	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Belgie, Montreux	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Libye, Ghadames	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Libye, Sabhá	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Libye, jezero Gabron	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Libye, jezero Gabron	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Turecko, Narlidere	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Turecko, Urfa	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Turecko, Urfa	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Essen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Essen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Wuppertal	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Wuppertal	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD

Druh	Lokalita původu	Detekovaná sekvenční varianta	
		Obp5	Obp6
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Essen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Thiesen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo, Essen	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Německo	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Francie, Montpellier	alela MD	alela MD
<i>M. m. domesticus</i>	Francie, Montpellier	alela MD	alela MD
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Dolní Břežany	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Dolní Břežany	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Dolní Břežany	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	Kyrgyzstán, Chil Ustun	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	Bulharsko, General-Toshevo	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Libořezy	třetí varianta	neznámá
<i>M. m. musculus</i>	Kyrgyzstán, Tassor	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Smilkov	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha Ruzyně	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM

Druh	Lokalita původu	Detekovaná sekvenční varianta	
		Obp5	Obp6
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Sedlečko	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Praha	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	ČR, Hodonín	alela MM	alela MM
<i>M. m. musculus</i>	Kosovo	alela MM	alela MM
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	neznámá	alela MM
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	alela MM	třetí varianta
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	alela MD	alela MD
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	alela MM	neznámá

Druh	Lokalita původu	Detekovaná sekvenční varianta	
		Obp5	Obp6
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	neznámá	třetí varianta
ostrovní populace <i>M. m. domesticus</i>	Velká Británie	alela MD	alela MM
<i>M. musculus</i> sp.	ostrov Sokotra	alela MD	alela MD
hybrid <i>M. m. domesticus</i> a <i>M. m. musculus</i>	ČR, Nebanice	alela MM	alela MM
hybrid <i>M. m. domesticus</i> a <i>M. m. musculus</i>	ČR, Milhostov	alela MM	alela MM
hybrid <i>M. m. domesticus</i> a <i>M. m. musculus</i>	ČR, Milhostov	alela MM	alela MM
hybrid <i>M. m. domesticus</i> a <i>M. m. musculus</i>	Německo, Thierstein	alela MD	alela MD
hybrid <i>M. m. domesticus</i> a <i>M. m. musculus</i>	ČR, Kopanina	alela MD	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM
<i>M. spicilegus</i>	Slovensko, Košice	alela MM	alela MM

4.3 Genová exprese

Je známo, že různé buňky mnohobuněčného organismu exprimují odlišné sady genů, nicméně mnoho proteinů je společných všem buněčným typům. Dobrým příkladem takových univerzálních proteinů jsou enzymy základních metabolických drah; tyto a podobné proteiny nazýváme často provozními proteiny (housekeeping proteins) a geny, které je řídí, pak označujeme jako provozní geny (housekeeping genes). ATP5b kóduje podjednotku ATP syntázy, což je velký enzym vázaný na membránu mitochondrií, který katalyzuje syntézu ATP (adenosin-5-trifosfát) při oxidační fosforylaci. ATP je nejdůležitějším a nejvšestrannějším aktivovaným přenašečem v buňce, který slouží k pohonu mnoha chemických reakcí, a bez něhož se neobejdou žádné známé buňky. Jestliže míra exprese některého genu v určité buňce výrazně přesáhne hladinu exprese provozních genů, jako je například ATP5b, znamená to, že produkt tohoto genu hraje v dané tkáni významnou roli. Z této premisy jsme vycházeli při hodnocení exprese OBP.

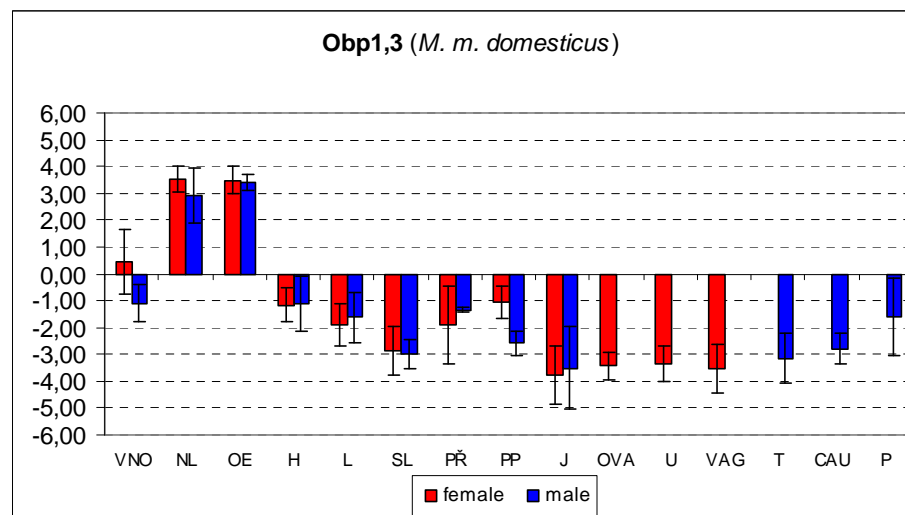
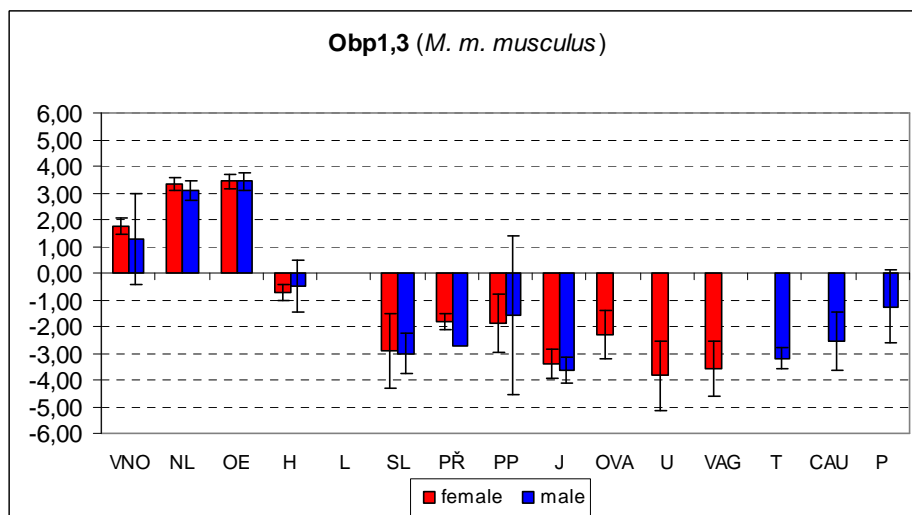
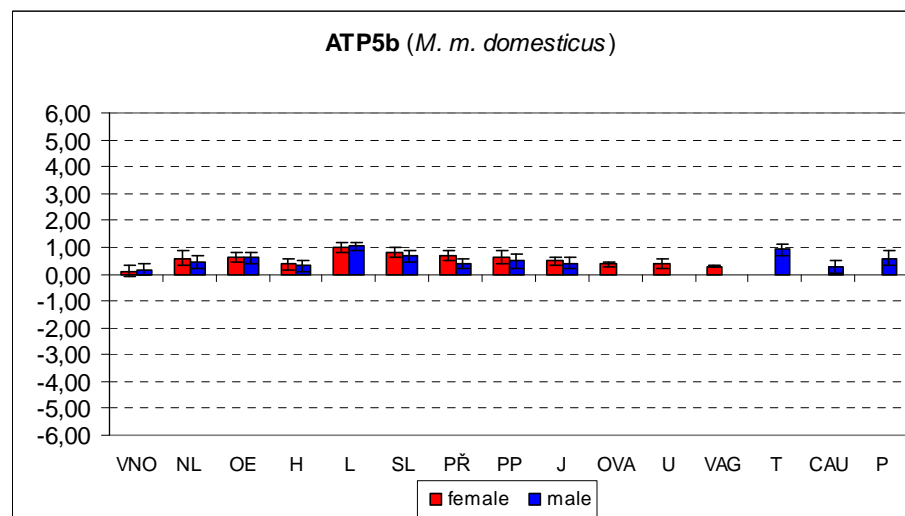
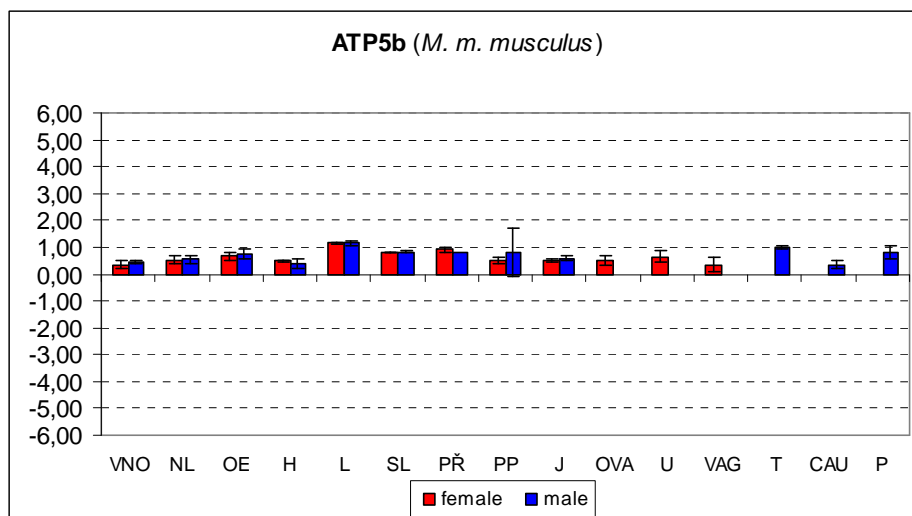
Z dosavadních studií zabývajících se touto problematikou vyplývá, že OBP jsou exprimovány pouze v oblasti nosu, přesto (nebo právě proto) jsme expresní analýze podrobili i tkáně, kde výskyt těchto proteinů zatím nikdo nepředpokládal. Zkoumané tkáně byly tyto: vomeronasální orgán, nosní lymfatická tkáň, čichová sliznice, Harderianova žláza, extraorbitální slzné žlázy, podčelistní slinné žlázy, příušní slinné žlázy, prepuciální žlázy, játra, ovaria, vagina, testes, cauda epididymis a prostata. Každý poddruh (*M. m. musculus* a *M. m. domesticus*) byl zastoupen třemi jedinci obou pohlaví – celkem tedy 12 zvířat.

Výsledky expresní analýzy shrnují obrázky 10–13, kde osa y udává zlogaritmované hodnoty relativní exprese určitého genu OBP normalizované vzhledem k expresi referenčního genu GAPDH. Číselné údaje na ose y představují řádové rozdíly v genové expresi, přičemž nula znázorňuje hladinu exprese genu GAPDH, to znamená, že kupříkladu číselná hodnota 2 vyjadřuje expresi o dva řády větší, to jest asi 100×, než je exprese tohoto referenčního genu. Pro názornost je součástí každého obrázku ještě graf, jenž zobrazuje totéž pro provozní gen ATP5b. Z něho je mimo jiné dobře patrné, že normalizace pomocí referenčního genu GAPDH poskytuje věrohodné výsledky, neboť u genu ATP5b se podle očekávání neprokázala žádná tkáňová specificita a míra jeho exprese vykazuje téměř nulovou variabilitu.

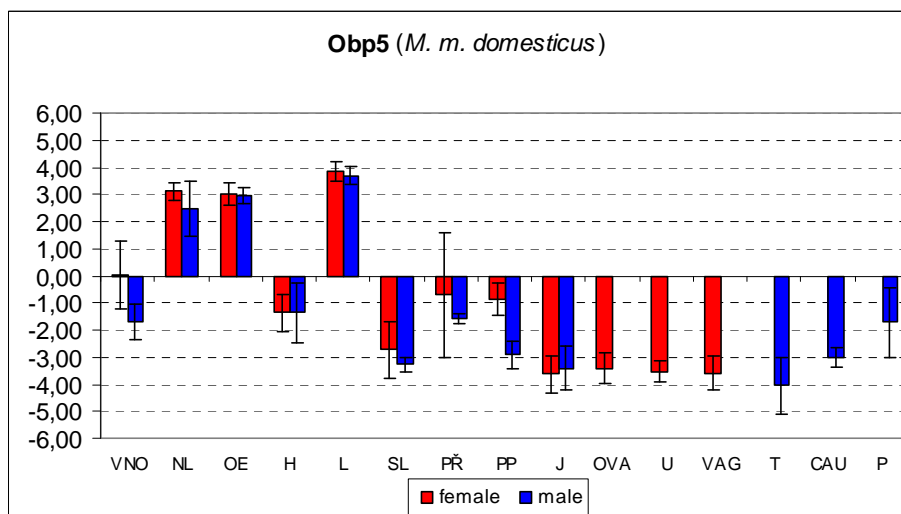
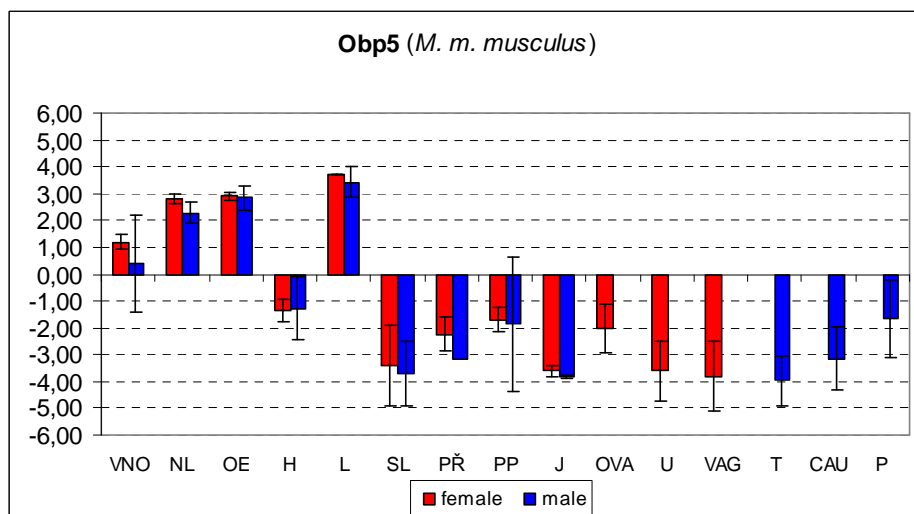
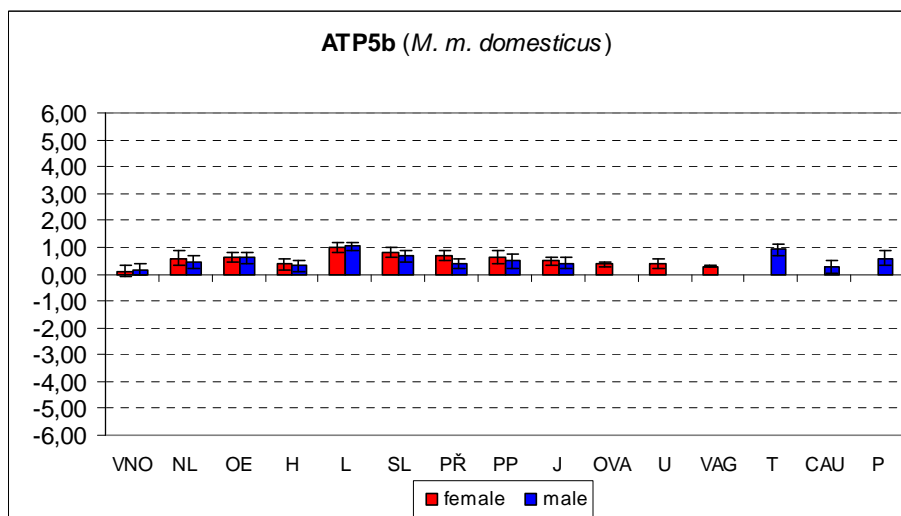
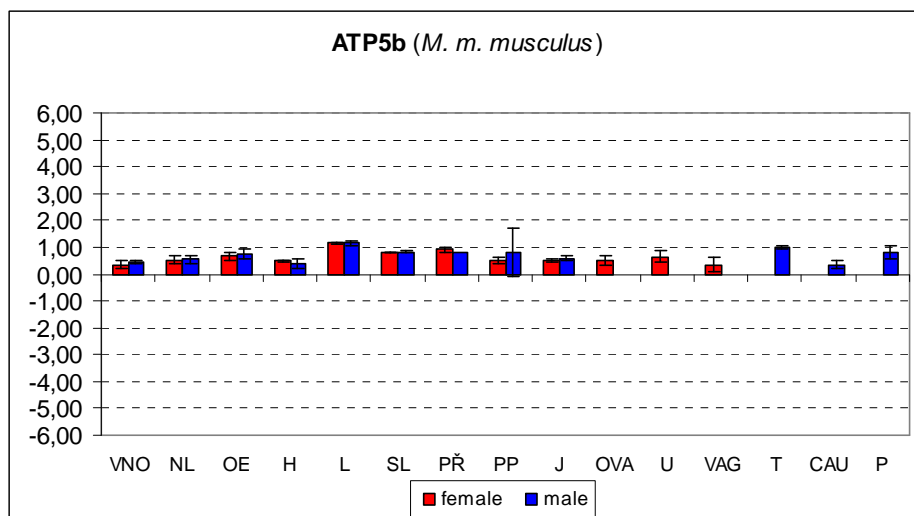
Přestože se přítomnost OBP do určité míry potvrdila i ve tkáních jako Harderianova žláza, příušní slinné žlázy či prepuciální žlázy, nás zajímali především ty tkáně, kde exprese OBP výrazně přesáhla hladinu exprese referenčního genu GAPDH. Takové tkáně byly čtyři: vomeronasální orgán, nosní lymfatická tkáň, čichová sliznice a extraorbitální slzné žlázy.

Podíváme-li se na jednotlivé geny a konkrétní tkáně blíže, zjistíme, že všechny geny kromě *Obp6* jsou exprimovány v nosní lymfatické tkáni a čichové sliznici. Novou tkání, o které se dosud v souvislosti s OBP nehovořilo, jsou slzné žlázy, kde je podle našich zjištění míra exprese OBP vůbec nejvyšší. Výjimku tvoří geny *Obp1,3*, které zde detekovány nebyly, naopak gen *Obp6* je exprimován pouze v této tkáni. Rovněž přímo v nosní lymfatické tkáni nebyla exprese OBP dosud prokázána.

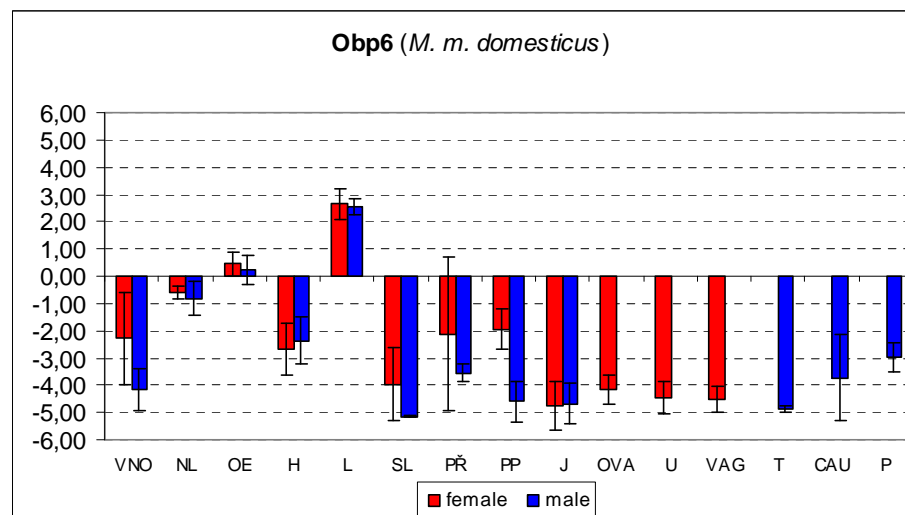
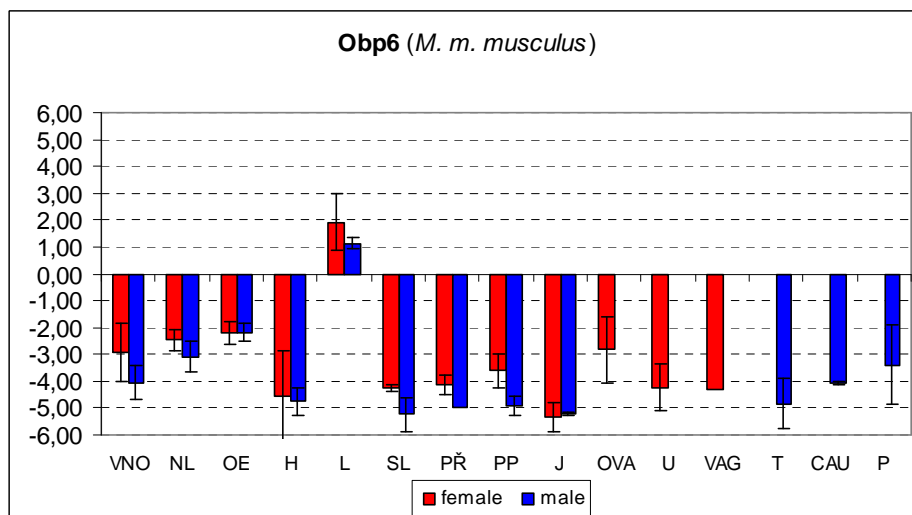
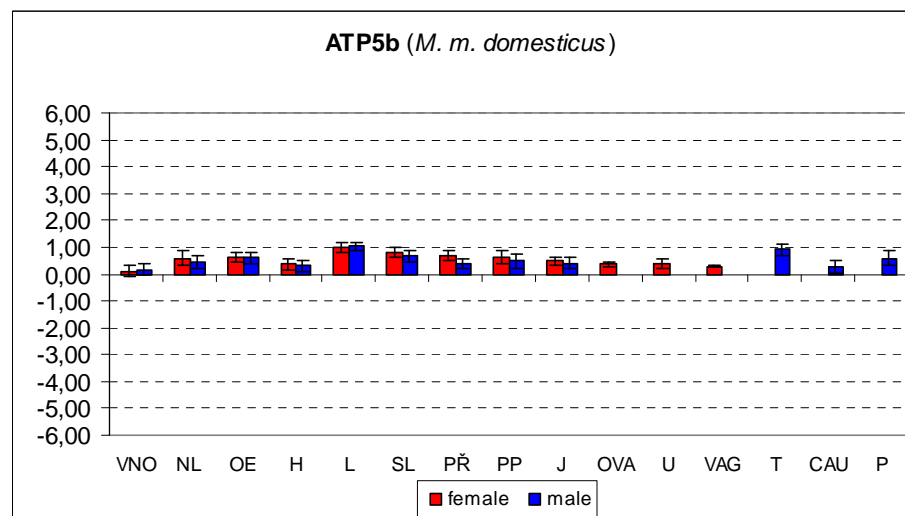
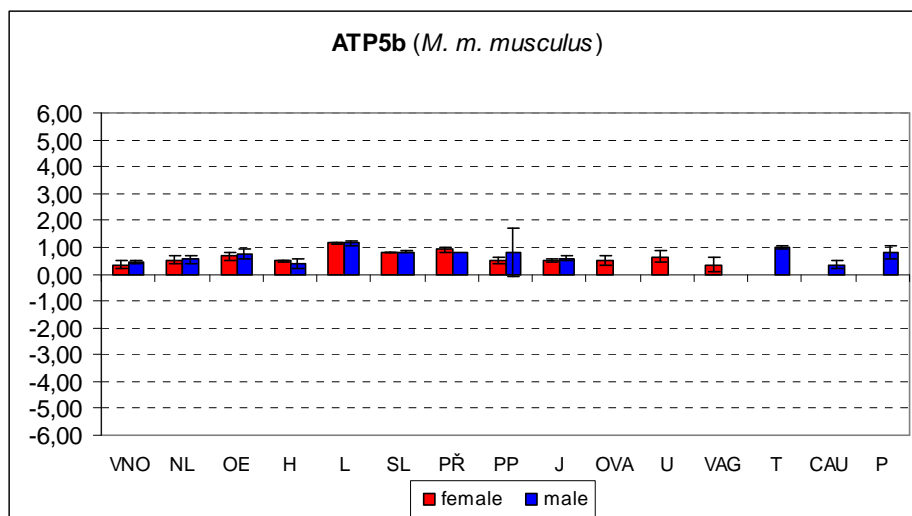
Obrázek 16 ukazuje výsledky statistického zhodnocení exprese OBP v orofaciální oblasti analýzou rozptylu s více faktory (vícefaktorová ANOVA). Číselné údaje na ose y představují řádové rozdíly v genové expresi, nula je hladina exprese genu GAPDH. Jediný výrazný mezidruhový rozdíl v expresi OBP byl zaznamenán ve vomeronasálním orgánu. Zatímco u poddruhu *M. m. musculus* je exprese OBP v tomto orgánu statisticky významná, u poddruhu *M. m. domesticus* ani jeden gen významně nepřekračuje hladinu exprese referenčního genu GAPDH.



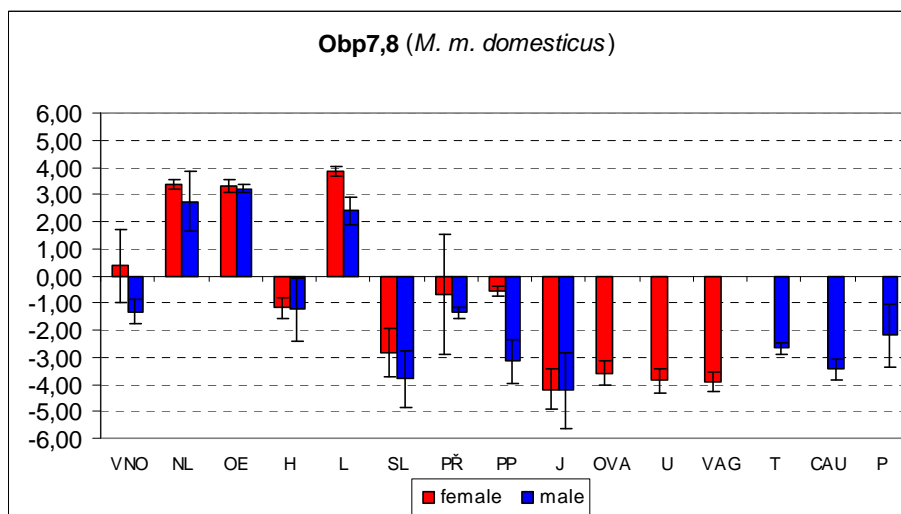
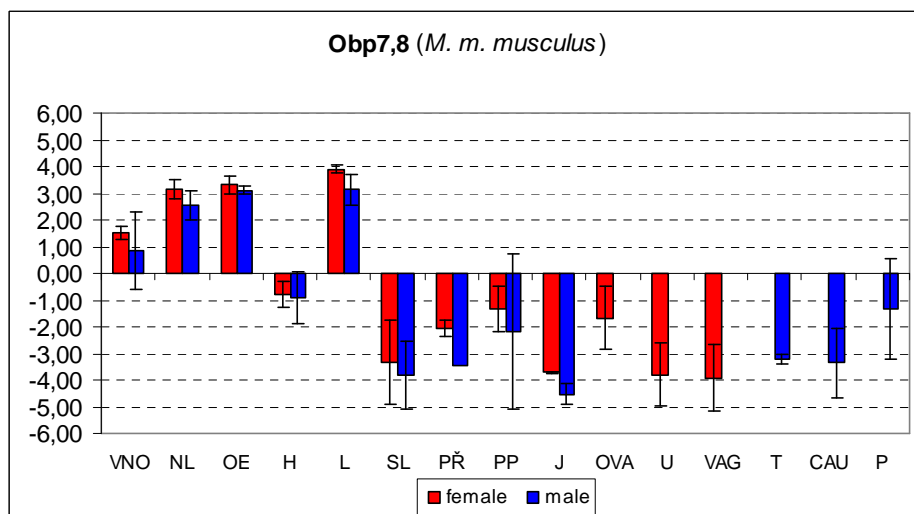
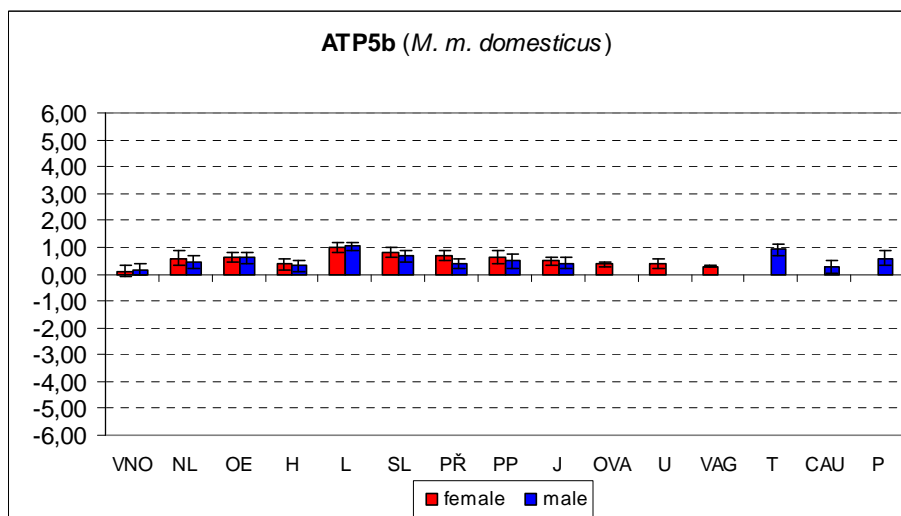
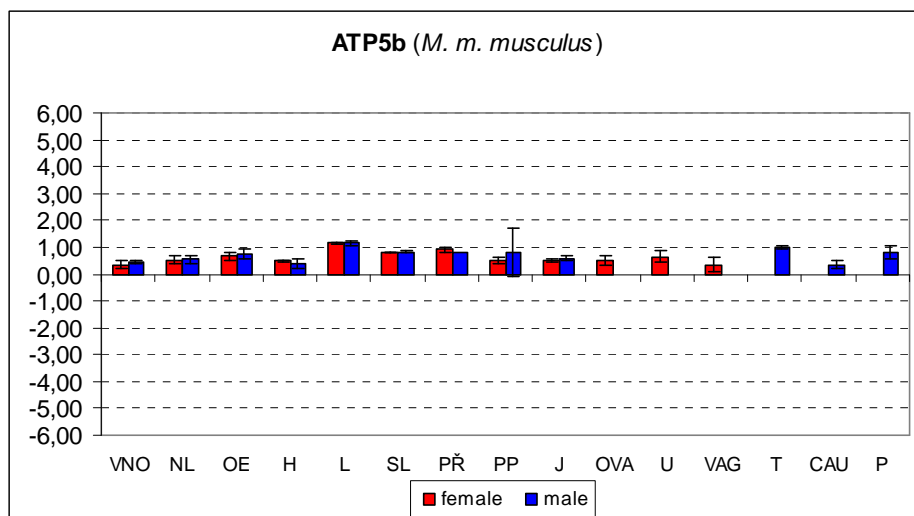
Obrázek 16 Expresse genů Obp1,3 poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v porovnání s provozními geny ATP5b. VNO – vomeronasální orgán; NL – nosní lymfatická tkáň; OE – čichová sliznice; H – Harderianova žláza; L – slzné (lakrimální) žlázy; SL – podčelistní slinné žlázy; PŘ – příušní slinné žlázy; PP – prepuciální žlázy; J – játra; OVA – ovaria; VAG – vagina; T – testes; CAU – cauda epididymis; P – prostata. Svislé úsečky značí konfidenční intervaly.



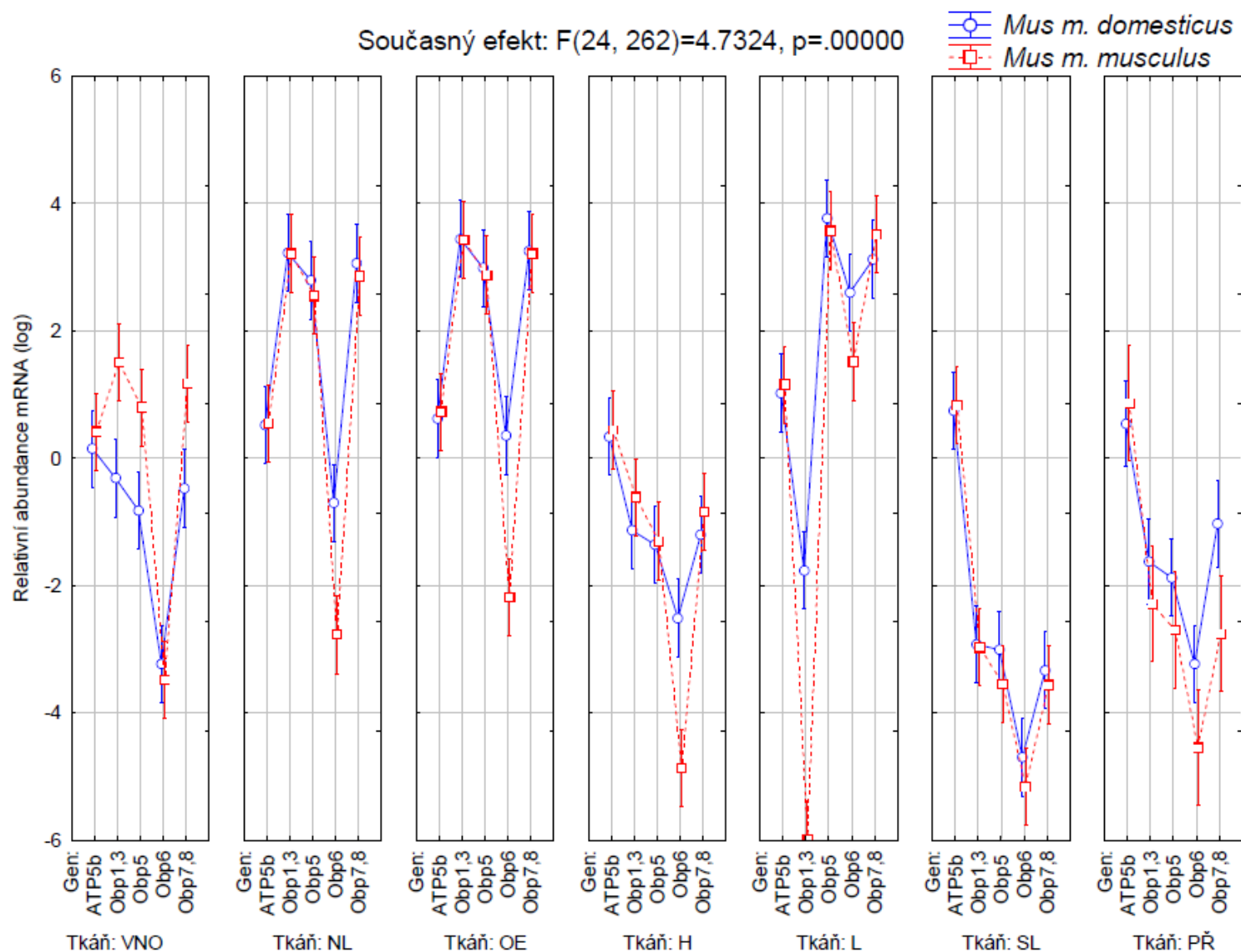
Obrázek 17 Expres genů Obp5 poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v porovnání s provozními geny ATP5b. VNO – vomeronasální orgán; NL – nosní lymfatická tkáň; OE – nosní sliznice; H – Harderianova žláza; L – slzné (lakrimální) žlázy; SL – podčelistní slinné žlázy; PŘ – příušní slinné žlázy; PP – prepuciální žlázy; J – játra; OVA – ovaria; VAG – vagina; T – testes; CAU – cauda epididymis; P – prostata. Svislé úsečky značí konfidenční intervaly.



Obrázek 18 Expres genů Obp6 poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v porovnání s provozními geny ATP5b. VNO – vomeronasální orgán; NL – nosní lymfatická tkáň; OE – nosní sliznice; H – Harderianova žláza; L – slzné (lakrimální) žlázy; SL – podčelistní slinné žlázy; PŘ – příušní slinné žlázy; PP – prepuciální žlázy; J – játra; OVA – ovaria; VAG – vagina; T – testes; CAU – cauda epididymis; P – prostata. Svislé úsečky značí konfidenční intervaly.



Obrázek 19 Expres genů Obp7,8 poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v porovnání s provozními geny ATP5b. VNO – vomeronasální orgán; NL – nosní lymfatická tkáň; OE – nosní sliznice; H – Harderianova žláza; L – slzné (lakrimální) žlázy; SL – podčelistní slinné žlázy; PŘ – příušní slinné žlázy; PP – prepuciální žlázy; J – játra; OVA – ovaria; VAG – vagina; T – testes; CAU – cauda epididymis; P – prostata. Svislé úsečky značí konfidenční intervaly.



Obrázek 20 Statistické vyhodnocení exprese OBP v orofaciální oblasti analýzou rozptylu s více faktory (vícefaktorová ANOVA). VNO – vomeronasální orgán; NL – nosní lymfatická tkáň; OE – čichová sliznice; H – Harderianova žláza; L – slzné (lakrimální) žlázy; SL – podčelistní slinné žlázy; PŘ – příušní slinné žlázy. Data jsou atributivní (spojnice jednotlivých bodů jsou uvedeny pouze pro lepší názornost). Vertikály značí konfidenční intervaly.

5. Diskuse

Sekvenace potvrdila přítomnost genového shluku řídicího OBP u divokých myší poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Jelikož jsme obdobný klastr genů objevili i u bazálního zástupce rodu *Mus*, myši africké (*Mus minutoides*), dá se důvodně předpokládat, že se OBP budou vyskytovat také u dalších zástupců tohoto rodu, ne-li u všech. Toto tvrzení mimo jiné podporuje skutečnost, že genotypizace v zásadě odhalila geny *Obp5* a *Obp6* u druhu *M. spicilegus*. Jak už bylo dříve řečeno, rozdíly mezi OBP jednoho druhu jsou, měřeno procentem identických aminokyselin, obecně vyšší než mezi OBP různých druhů (Pelosi 1998). To je rovněž dobře patrné z výše uvedeného dendrogramu, kde je vidět, jak určité typy OBP různých druhů utvářejí společné shluky. Z tohoto pohledu je nesmírně zajímavý gen *Obp5*, jenž se během 5 milionů let, tedy doby uplynulší od divergence podrodů *Mus* a *Nannomys*, v podstatě nezměnil. To poukazuje na nějakou důležitou roli, kterou tento vysoce konzervativní gen v organismu vykonává. Bylo prokázáno, že silná negativní (= purifikující) selekce dokáže zachovat identitu aminokyselinových sekvencí na vysoké úrovni i mezi vzdáleně příbuznými organismy jako jsou rostliny a živočichové (Nei et al. 2000, Piontkivska et al. 2002). Lze se tedy domnívat, že *Obp5* může být pod vlivem selekce, která odstraňuje mutace měnící základní charakter genu.

Poněvadž je jedna kopie genu po duplikaci nadbytečná, negativní mutace v jednom z duplikátů nebude mít ve většině případů vliv na biologickou zdatnost organismu a tudíž nebude odstraněna selekcí. A protože většina mutací postihujících organismus je škodlivých, obvyklý osud duplikovaného páru je inaktivace jedné kopie (Walsh 1995, Lynch a Conery 2000, Lynch et al. 2001). Z té se stává pseudogen, nefunkční sekvence DNA, která neřídí žádný genový produkt a nepodléhá evolučním omezením jako běžný funkční gen. Takový pseudogen poté setrvává v genomu až do té doby, než z něho bude zcela vymazán anebo zpětnou mutací nedojde k jeho aktivaci. Tomuto scénáři dobře odpovídá evoluční osud genu *Obp4P*. Tento gen je v databázích zanesen jako předpokládaný pseudogen, který se nám z výše popsaných důvodů nepodařilo u myši domácí osekvenovat. Na druhou stranu se ukázalo, že je *Obp4P* přepisován a podle všeho i překládán do proteinu u příbuzného druhu *M. minutoides*. Je tedy vysoce pravděpodobné, že k pseudogenizaci *Obp4P* došlo v nějaké linii vedoucí k myši domácí. Předpokládaná doba přeměny jedné kopie v nefunkční

pseudogen je, vyjma populací s obrovskou efektivní velikostí, relativně krátká – dochází k ní během pár milionů let (Lynch a Force 2000).

Ne vždy se z jedné kopie duplikovaného genu stává pseudogen. Druhou možností je zachování obou duplikovaných kopií v genomu. K tomu může dojít několika způsoby. Přítomnost mnohočetných kopií jednoho genu někdy poskytuje organismu výhodu vyšší úrovně jeho exprese. Jinými slovy, obě duplikované kopie dále vykonávají stejnou funkci (Kondrashov a Kondrashov 2006). Nebo dojde v jedné kopii k fixaci prospěšné mutace a vzniku nové dříve neexistující funkce, zatímco druhá kopie vykonává dál funkci původní (Ohno 1970, Walsh 1995, Bergthorsson et al. 2007). Alternativní možností udržení obou kopií v populaci je rozdělení dvou (nebo více) odlišných funkcí původního genu mezi duplikované kopie. Každá kopie poté vykonává jednu funkci a vzájemně se tak doplňují (Force et al. 1999, Lynch a Force 2000, Lynch et al. 2001).

Jak už bylo několikrát řečeno, geny Obp1 a Obp3, stejně tak Obp7 a Obp8, jsou takřka identické. V zásadě existují dvě možná vysvětlení tohoto jevu: obě kopie vznikly duplikací rodičovského genu teprve nedávno a nacházejí se tudíž v rané fázi divergence nebo si udržují podobné sekvence z funkčního hlediska. Potřebuje-li organismus větší množství určitého genového produktu, proteinu nebo RNA, zmnožení příslušného genu může tyto zvýšené nároky pokrýt. Ohno (1970) v takovém případě hovoří o genové duplikaci s cílem vytváření většího množství téhož produktu. Inkorporace mnohočetných kopií jednoho genu do genomu s sebou nese otázku, jak si takové geny udrží stejnou funkci. Jedna možnost zachování vysoké identity sekvencí je prostřednictvím synchronizované evoluce (concerted evolution), kdy se členové genové rodiny v evoluci vyvíjejí jako jedna jednotka, která si vyměňuje genetickou informaci (Dover 1982). Mechanismem synchronizované evoluce je genová konverze, tedy nereciproká výměna genetické informace, při které sekvence jednoho úseku DNA slouží jako templát, podle kterého se přepíší sekvence jiných úseků. Druhou možností je již zmíněná silná negativní selekce proti mutacím měnícím základní charakter genu (Piontkivska et al. 2002).

Jednou z evolučně nejdůležitějších rolí genové duplikace je tvorba nových genů s dosud neznámou biologickou funkcí (Ohno 1970). Znamky takové neofunkcionalizace vykazují právě některé geny kódující OBP, které vznikly podle všeho v důsledku duplikace rodičovského genu a následného rozrůznění jednotlivých kopií.

První fáze genotypizace ukázala, že některé rozdíly v sekvencích OBP poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* budou patrně uvnitř těchto taxonů zakonzervované.

Otázkou je však to, zda jsou tyto záměny důsledkem selekce, nebo pouhé skutečnosti, že se genofondy obou linií vyvíjí již nějakou dobu odděleně.

Analýza genové exprese potvrdila přítomnost OBP v čichové sliznici, tedy tkáni, kde byly tyto proteiny poprvé objeveny a odkud byly mnohokrát izolovány (Pevsner et al. 1986, Avanzini et al. 1987, Pevsner et al. 1988b, Krishna et al. 1995, Ohno et al. 1996, Pes et al. 1998, Utsumi et al. 1999). Navíc odhalila dvě nové tkáně, kde jsou OBP výrazně exprimovány. První jsou extraorbitální slzné žlázy a druhou nosní lymfatická tkáň. V této souvislosti okamžitě vyvstává otázka, jakou roli zde OBP hrají. Jelikož mají slzy především ochrannou funkci, přichází v úvahu zejména role jakéhosi „čističe“, který odstraňuje splodiny metabolismu a jiné nežádoucí či toxické látky (Pevsner et al. 1990, Steinbrecht 1998, Grolli et al. 2006). Nicméně prostřednictvím slzných kanálků, které spojují vnitřní koutky oka s nosní dutinou, se OBP mohou snadno dostat do oblasti nosu, kde mohou vykonávat funkce spojené s vnímáním čichových podnětů.

Je známo, že nosní hlen patří mezi první obranné linie organismu, neboť představuje jakousi fyzickou bariéru, která odpuzuje nebo zachytává cizorodé částice jako jsou bakterie, viry, toxiny a jiné vdechované partikule. Nosní lymfatická tkáň, správněji asi řečeno s nosní sliznicí asociovaná lymfoidní tkáň (nasal-associated lymphoid tissue; NALT), je součástí slizniční imunity (mucosa-associated lymphoid tissue; MALT). Tato tkáň byla popsána u celé řady hlodavců včetně myši, potkana, křečka nebo morčete (Hameleers et al. 1989, Okada et al. 1995, Giannasca et al. 1997, Heritage et al. 1997), přičemž se zdá, že právě u zástupců tohoto řádu hraje významnou roli, poněvadž postrádají tonsily. Naše analýza ukázala, že exprese OBP je v NALT srovnatelná s tou v čichové sliznici. Byly zde výrazně exprimovány všechny geny vyjma *Obp6*. V tomto kontextu se tak opět nabízí myšlenka, že OBP vykonávají nějakou funkci související s imunitou.

Poslední tkání, kde exprese OBP výrazněji přesáhla hladinu exprese referenčního genu GAPDH, byl vomeronasální orgán, který je u savců spojován hlavně s percepcí feromonů, ale nejen s ní (Halpern a Martínez-Marcos 2003, Brennan a Zufall 2006, Tirindelli et al. 2009). Přítomnost OBP v tomto chemosenzorickém systému může dát za pravdu hypotézám, že tyto proteiny slouží spíše jako přenašeče specifických ligandů než obecných odorantů (Tegoni et al. 2000, Pelosi 2001). Naše analýza je jednou z prvních, která expresi OBP ve vomeronasálním orgánu jasně prokázala.

Problém je však obecně v tom, že cílová tkáň se může od místa exprese, zvláště u proteinů jako jsou OBP, vcelku zásadně lišit. Například hlen nosní sliznice může poměrně snadno dosáhnout dutiny vomeronasálního orgánu, což některé biologie utvrzuje v přesvědčení, že

OBP působí hlavně zde (Pelosi 2001). Proto nelze, pouze na základě genové exprese, s určitostí říct, ve které tkáni OBP doopravdy účinkují a jaké role tam hrají. Nicméně poznání tkáňové specifity OBP představuje dozajista užitečné, a mnohdy také jediné, vodítko při pátrání po funkcích těchto proteinů.

Jediný významný mezidruhový rozdíl v expresi OBP byl zaznamenán právě u vomeronasálního orgánu. Zatímco hladinu exprese referenčního genu GAPDH u poddruhu *M. m. musculus* překročily, kromě *Obp6*, všechny geny pro OBP, jejich protějšky u poddruhu *M. m. domesticus* byly exprimovány na stejné úrovni nebo pod ní. Předchozí studie naší skupiny zabývající se Mupy ukázaly, že samci poddruhu *M. m. musculus* exprimovaly všechny v analýze zahrnuté Mupy výrazně více než samice téhož poddruhu a rovněž více než obě pohlaví poddruhu *M. m. domesticus* (Stopková et al. 2007). Na základě těchto zjištění a vzhledem k tomu, že Mupy jsou dominantní močové proteiny, které brání rychlé degradaci feromonů v hydrofilním prostředí, byla vyslovena hypotéza, že variabilita v expresi těchto proteinů může být důležitou součástí mezidruhového rozpoznávání (Stopková et al. 2007). Není vyloučeno, že podobnou úlohu mohou hrát také OBP, byť je to v této fázi výzkumu zatím pouhá spekulace.

Z dosud nepublikovaných dat víme, že proteom analyzovaný ze slin myši obsahuje značné množství OBP. Otázkou však zůstává, které tkáně do slin tyto proteiny secernují, poněvadž největší slinná žláza, podčelistní, vykazovala v našem experimentu téměř nulovou expresi. Do úvahy přichází ještě podjazyková slinná žláza, kterou se však nepodařilo spolehlivě odebrat u všech jedinců, proto nebyla hodnocena, a příušní slinná žláza. Zde sice k expresi OBP dochází, nicméně ne v takové míře, jakou bychom očekávali.

Bylo prokázáno, že vaginální sekret samic křečka obsahuje protein aphrodisin, jenž stimuluje kopulační chování samců tohoto druhu (Singer et al. 1986, Singer a Macrides 1993). Jelikož tento protein, nehledě na název, patří do rodiny OBP, tak nás zajímalo, zda nebudou alespoň některé varianty OBP exprimovány rovněž v reprodukčním traktu samic myši. Tato premisa se však ukázala být mylnou, neboť menší míra exprese OBP byla zaznamenána pouze v prepuciálních žlázách. Zdá se tedy, že i přes velkou sekvenční a strukturální podobnost nemusí nutně OBP různých druhů vykonávat stejné funkce.

6. Závěr

Tato práce se zabývala evolucí a expresí OBP, které jsou známy tím, že vážou a transportují hydrofóbní ligandy ve vodném prostředí nosní sliznice savců a jiných obratlovců. Pomocí sady specifických primerů jsme osekvenovali shluk genů kódujících OBP u divokých myší poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, čímž jsme mimo jiné získali sekvence dvou dosud pouze předpokládaných genů pro OBP. Obdobný klastr genů jsme na úrovni mRNA identifikovali a osekvenovali u bazálního zástupce rodu *Mus*, myši africké (*Mus minutoides*), což přineslo, kromě pěti nových sekvencí genů pro OBP, zajímavé poznatky o evoluci této rodiny. Na základě získaných sekvencí jsme zkonstruovali evoluční strom všech známých savčích OBP. Pomocí genotypizace na různorodém vzorku jedinců *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* jsme prokázali, že vytipované, sekvenací odhalené, rozdíly jsou zakonzervované uvnitř populací těchto forem myši domácí. Analyzovali jsme expresi OBP a určili tkáňovou specifitu těchto proteinů u dvou poddruhů myši domácí (*M. m. musculus* a *M. m. domesticus*). Objevili jsme dvě nové, v literatuře dosud nepublikované, tkáně s výraznou expresí OBP.

7. Seznam použité literatury

- Alcock J.** (1984): *Animal Behavior: An Evolutionary Perspective*. Third Edition. Sunderland (MA): Sinauer.
- Auffray J.-C., Vanlerberghe F. a Britton-Davidian J.** (1990): The house mouse progression in Eurasia: A palaeontological and archaeozoological approach. *Biol. J. Linn. Soc.* 41: 13–25.
- Avanzini F., Bignetti E., Bordi C., Carfagna G., Cavaggioni A., Ferrari G., Sorbi R. T. a Tirindelli R.** (1987): Immunocytochemical localization of pyrazine-binding protein in the cow nasal mucosa. *Cell Tissue Res.* 247: 461–464.
- Barber P. C. a Raisman G.** (1978): Replacement of receptor neurones after section of the vomeronasal nerves in the adult mouse. *Brain Res* 147: 297–313.
- Bennet J. M., Schlunegger M. P. a Eisenberg D.** (1995): 3D Domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Prot. Sci.* 4: 2455–2468.
- Bergthorsson U., Andersson D. I. a Roth J. R.** (2007): Ohno's dilemma: Evolution of new genes under continuous selection. *PNAS* 104(43): 17004–17009.
- Bianchet M. A., Bains G., Pelosi P., Pevsner J., Snyder S. H., Monaco H. L. a Amzel L. M.** (1996): The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat. Struct. Biol.* 3: 934–939.
- Bignetti E., Cavaggioni A., Pelosi P., Persaud K. C., Sorbi R. T. a Tirindelli R.** (1985) Purification and characterisation of an odorantbinding protein from cow nasal tissue. *Eur. J. Biochem.* 149: 227–231.
- Bishop R. E., Cambillau C., Prive G. G., Hsi D., Tillo D. a Tillier E. R. M.** (2006): Bacterial Lipocalins: Origin, Structure, and Function. In *Lipocalins*. Akestrom B., Borregard N., Flower D. R. a Salier J. P., Eds.: 28–40. Georgetown, Texas. Landes Bioscience.
- Boch R., Shearer D. A. a Stone B. C.** (1962): Identification of iso-amyl acetate as an active compound in the sting pheromone of the honeybee. *Nature* 195: 1018–1020.
- Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., Chapman V. M., Moriwaki K., Nevo E. a Thaler L.** (1984): Biochemical diversity and evolution in the Genus *Mus*. *Bioch. Genet.* 22: 275–303.
- Boudjelal M., Sivaprasadarao A. a Findlay J. B. C.** (1996): Membrane receptor for odour-binding proteins. *Biochem. J.* 317: 23–27.
- Boursot P., Auffray J.-C., Britton-Davidian J. a Bonhomme F.** (1993): The evolution of house mice. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 119–152.
- Breer H., Krieger J. a Raming K.** (1990): A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochem.* 20: 735–740.
- Brennan P. a Zufall F.** (2006): Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 44416: 308–315.

- Breustedt D. A., Schönfeld D. L. a Skerra A.** (2006): Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys* 1764 (2): 161–173.
- Briand L., Nespoulous C., Perez V., Rémy J. J., Huet J. C. a Pernellet J. C.** (2000): Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur. J. Biochem.* 267: 3079–3089.
- Buck L. a Axel R.** (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175–187.
- Burchell B.** (1991): Turning on and turning off the sense of smell. *Nature* 350: 16–17.
- Butenandt A., Beckmann R., Stamm D. a Hecker E.** (1959): Concerning the sexual attractant of the silkmoth *Bombyx mori*. Purification and composition. *Z Naturforschg* 14b: 283–284.
- Butler C.** (1609): *The Feminine Monarchie or treatise concerning bees*. Oxford: Joseph Barnes.
- Dal Monte M., Andreini I., Revoltella R. a Pelosi P.** (1991): Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 445–451.
- Dal Monte M., Centini M., Anselmi C. a Pelosi P.** (1993): Binding of selected odorants to bovine and porcine odorant-binding proteins, *Chem. Senses* 18: 713–721.
- Dear T. N., Boehm T., Keverne E. B. a Rabbitts T. H.** (1991a): Novel genes for potential ligand-binding proteins in subregions of the olfactory mucosa. *EMBO J.* 10: 2813–2819.
- Dear T. N., Campbell K. a Rabbitts T. H.** (1991b): Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry* 30: 10376–10382.
- Dover G.** (1982): Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299(5879): 111–117.
- Dicke M. a Sabelis M. W.** (1988): Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct Ecol* 2: 131–139.
- Din W., Anand R., Boursot P., Darviche D., Dod B., Jouvin-Marche E., Orth A., Talwar G. P., Cazenave P.-A. a Bonhomme F.** (1996): Origin and radiation of the house mouse: Clues from nuclear genes. *J. Evol. Biol.* 9: 519–539.
- Du G. a Prestwich G. D.** (1995): Protein structure encodes the ligand binding specificity in pheromone binding proteins. *Biochemistry* 34: 8726–8732.
- Duplantier J.-M., Orth A., Catalan J. a Bonhomme F.** (2002) Evidence for a mitochondrial lineage originating from the Arabian peninsula in Madagascar house mouse (*Mus musculus*). *Heredity* 89: 154–158.
- Eisthen H. L.** (1997): Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol.* 50(4): 222–33.
- Fabre J. H.** (1879): *Souvenirs Entomologiques* Delagrave, Paris.
- Felicioli A., Ganni M., Garibotti M. a Pelosi P.** (1993): Multiple types and forms of odorant-binding proteins in the Old-World porcupine *Hystrix cristata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105: 775–784.

- Felsenstein J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Flegr J.** (2005): *Evoluční biologie*. Praha: Academia.
- Flower D. R.** (1995): Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J. Mol. Recogn.* 8: 185–195.
- Flower D. R.** (1996): The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1–14.
- Flower D. R., North A. C. T. a Sansom C. E.** (2000): The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 9–24.
- Force A., Lynch M., Pickett F. B., Amores A., Yan Y. L. a Postlethwait J.** (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531–1545.
- Franck D.** (1996): *Etologie*. Praha: Karolinum.
- Gaisler a Zima** (2007): *Zoologie obratlovců*. Praha: Academia.
- Ganni M., Garibotti M., Scaloni A., Pucci P. a Pelosi P.** (1997): Microheterogeneity of odorant-binding proteins in the porcupine revealed by N-terminal sequencing and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B: 287–291.
- Garibotti M., Navarrini A., Pisanelli A. M. a Pelosi P.** (1997): Three odorant-binding proteins from rabbit nasal mucosa. *Chem. Senses* 22: 383–390.
- Giannasca P. J., Boden J. A. a Monath T. P.** (1997): Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. *Infect. Immun.* 65: 4288–4298.
- Glusman G., Yanai I., Rubin I. a Lancet D.** (2001): The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* 11: 685–702.
- Graziadei P. P. a Graziadei G. A.** (1979): Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8: 1–18.
- Graziadei P. P., Monti A. a Graziadei G.** (1980): Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J Neurocytol* 9: 145–162.
- Greene-Till R., Zhao Y. a Hardies S. C.** (2000): Gene flow of unique sequences between *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus*. *Mamm Genome* 11(3): 225–230.
- Grimsby J., Toth M., Chen K., Kumazawa T., Klaidman L., Adams J. D., Karoum F., Gal J. a Shih J. C.** (1997): Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat Genet* 17: 206–210.
- Grolli S., Merli E., Conti V., Scaltriti E. a Ramoni R.** (2006): Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS J.* 273: 5131.
- Guenet J. L. a Bonhomme F.** (2003): Wild mice: An ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* 19: 24–31.
- Hérent M. F., Collin S., Pelosi P.** (1995): Affinities of nutty and green-smelling compounds to odorant-binding proteins. *Chem. Senses* 20: 601–610.

- Hall S. E., Floriano W. B., Vaidehi N. a Goddard W. A. III.** (2004): Predicted 3-D structures for mouse I7 and rat I7 olfactory receptors and comparison of predicted odor recognition profiles with experiment. *Chem Senses* 29: 595–616.
- Halpern M.** (1987): The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 10: 325–362.
- Halpern M. a Martinez-Marcos A.** (2003): Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology* 70: 245–318.
- Hameleers D. M. H., van der Ende M., Biewenga J. a Sminia T.** (1989): An immunohistochemical study on the postnatal development of rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell Tissue Res.* 256: 431– 438.
- Hekmat-Safe D. S., Dorit R. L. a Carlson J. R.** (2000): Molecular evolution of Odorant-Binding Protein Genes OS-E and OS-F in *Drosophila*. *Genetics* 155: 117–127.
- Heritage P. L., Underdown B. J., Arsenault A. L., Snider D. P. a McDermott M. R.** (1997): Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 1256–1262.
- Holland P. W. H. a Takahashi T.** (2005): The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development. *Brain Research Bulletin* 66 (4-6): 484–490.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H. a Axel, R.** (1994): Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78: 3–834.
- Chevret P., Jenkins P. a Catzeflis F.** (2002): Evolutionary systematics of the Indian mouse *Mus famulus* Bonhote, 198: Molecular (DNA/DNA hybridization and 12S rRNA sequences) and morphological evidences. *Zool. J. Linn. Soc.* 137: 385.
- Chomczynski P. a Sacchi N.** (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156–9.
- Jouvin-Marche E., Cuddihy A., Butler S., Hansen J. N., Fitch, W. M. a Rudikoff S.** (1988): Modern evolution of a single copy gene: the immunoglobulin Ck locus in wild mice. *Mol. Biol. Evol.* 5, 500–511.
- Kaissling K.-E.** (1972): Kinetic studies of transduction in olfactory receptors of *Bombyx mori*. In *Int. Symp. Olfaction and Taste IV*. D. Schneider, Ed.: 207–213. *Wiss. Verlages. Stuttgart.*
- Karlson P. a Lüscher M.** (1959): "Pheromones" a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55–56.
- Katada S., Hirokawa T., Oka Y., Suwa M. a Touhara K.** (2005): Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J Neurosci* 25: 1806– 1815.
- Khew-Goodall Y., Grillo M., Getchell M. L., Danho W., Getchell T. V. a Margolis F. L.** (1991): Vomeronodulin, a putative pheromone transporter: cloning, characterization, and cellular localization of a novel glycoprotein of lateral nasal gland. *Fedn Am. Socs exp. Biol. J.* 5: 2976–2982.
- Kishimoto J., Cox H., Keverne E. B. a Emson P. C.** (1994): Cellular localization of putative odorant receptor mRNAs in olfactory and chemosensory neurons: a non-radioactive in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* 23: 33–39.

- Kondrashov F. A. a Kondrashov A. S.** (2006): Role of selection in fixation of gene duplications. *Journal of Theoretical Biology* 239: 141–151.
- Krishna N. S. R., Getchell M. L. a Getchell T. V.** (1994): Expression of the putative pheromone and odorant transporter vomeromodulin mRNA and protein in nasal chemosensory mucosae. *J Neurosci Res* 39: 243–259.
- Krishna N. S., Getchell M. L., Margolis F. L. a Getchell T. V.** (1995): Differential expression of vomeromodulin and odorantbinding protein, putative pheromone and odorant transporters, in the developing rat nasal chemosensory mucosae. *J. Neurosci. Res.* 40: 54–71.
- Lazar J., Greenwood D. R. Rasmussen L. E. L. a Prestwich G. D.** (2002): Molecular and functional characterization of an odorantbinding protein of the Asian elephant, *Elephas maximus*: implications for the role of lipocalins in mammalian olfaction. *Biochemistry* 41: 11786–11794.
- Lee K. H., Wells R. G. a Reed R. R.** (1987): Isolation of an olfactory cDNA: Similarity to retinol-binding protein suggests a role in olfaction. *Science* 235: 1053–1056.
- Liberles S. D. a Buck L. B.** (2006): A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442: 645–650.
- Liman E. R.** (1996): Pheromone transduction in the vomeronasal organ. *Current Opinion in Neurobiology* 6: 487–493.
- Löbel D., Strotmann J., Jacob M. a Breer H.** (2001): Identification of a third rat odorant-binding protein (OBP3). *Chem. Senses* 26: 673–680.
- Lundrigan B. L., Jansa S. A. a Tucker P. K.** (2002): Phylogenetic relationships in the genus *Mus*, based on paternally, maternally, and biparentally inherited characters. *Syst. Biol.* 51: 410–431.
- Lynch M. a Conery J. S.** (2000): The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* 290: 1151–1155.
- Lynch M. a Force A.** (2000): The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459–473.
- Lynch M., O’Hely M., Walsh B. a Force A.** (2001): The Probability of Preservation of a Newly Arisen Gene Duplicate. *Genetics* 159: 1789–1804.
- Macholán M., Kryštufek B. a Vohralík V.** (2003): The location of the *Mus musculus*/*M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriol.* 48(2): 177–188.
- Macholán M., Munclinger P., Šugerková M., Dufková P., Bímová B., Božíková E., Zima J. a Piálek J.** (2007): Genetic analysis of autosomal and x-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61: 746–771.
- Malnic B., Hirono J., Sato T. a Buck L. B.** (1999): Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713–723.
- Marshall J. T.** (1977): A Synopsis of Asian Species of *Mus* (Rodentia Muridae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 158: 175–220.
- McClintock M. K.** (1998): On the nature of mammalian and human pheromones. *Ann NY Acad Sci* 855: 390–392.

- Meredith M. a O'Connell R. J.** (1979): Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol* 286: 301–316.
- Meredith M.** (1991): Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39: 601–614.
- Meredith M.** (1998): Vomeronasal function. *Chem. Senses* 23: 463–466.
- Millery J., Briand L., Bézirard V., Blon F., Fenech C., Richard-Parpaillon L., Quenedey B., Pernellet J. C. a Gascuel J.** (2005): Specific expression of olfactory binding protein in the aerial olfactory cavity of adult and developing *Xenopus*. *Eur J Neurosci.* 22(6):1389–99.
- Miyawaki A., Matsushita F., Ryo Y. a Mikoshiba K.** (1994): Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in the vomeronasal organ. *EMBO J.* 13: 5835–5842.
- Mombaerts P.** (2004): Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14: 31–36.
- Musser G. G. a Carleton M. D.** (1993): Family Muridae. In *Mammal species of the world: A taxonomic and geographical reference* Wilson D. N a Reeder D. M., Eds.: 501–756. Smithsonian Institution, Washington.
- Niimura Y. a Nei M.** (2003): Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12235–12240.
- Niimura Y. a Nei M.** (2005): Comparative evolutionary analysis of olfactory receptor gene clusters between humans and mice. *Gene* 346: 13–21.
- Niimura Y. a Nei M.** (2007): Extensive Gains and Losses of Olfactory Receptor Genes in Mammalian Evolution. *PloS ONE* 2: e708.
- Nishimura K., Utsumi K., Yuhara M., Fujitani Y. a Iritani A.** (1989): Identification of puberty-accelerating pheromones in male mouse urine. *J Exp Zool* 251: 300–305.
- Nordlund D. A. a Lewis W. J.** (1976): Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J Chem Ecol* 2: 211–220.
- Ohno S.** (1970): *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Ohno K., Kawasaki Y., Kubo T. a Tohyama M.** (1996): Differential expression of odorant-binding protein genes in rat nasal glands: implications for odorant-binding proteinII as a possible pheromone transporter. *Neuroscience* 71: 355–366.
- Okada S., Ohtsuka A., Akagi H., Nishizake K. a Masuda Y.** (1995): Blood microvascular organization of the nasal-associated lymphoid tissue of the guinea pig: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Acta Med. Okayama* 49: 213–219.
- Orth A., Belkhir K., Britton-Davidian J., Boursot P., Benazzou T. a Bonhomme F.** (2002): Hybridation naturelle entre deux especes sympatriques de souris *Mus musculus domesticus* L. et *Mus spretus* Lataste. *C. R. Biol.* 325: 89–97.
- Paulos M. A. a Tessel R. E.** (1982): Excretion of beta-phenethylamine is elevated in humans after profound stress. *Science* 215: 1127–1129.
- Pelosi P., Baldaccini N. E. a Pisanelli A. M.** (1982): Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem. J.* 201: 245–248.
- Pelosi P.** (1994): Odorant-binding proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29: 199–228.

- Pelosi P.** (1998): Odorant-binding proteins: structural aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 855: 281–93.
- Pelosi P.** (2001): The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell Mol Life Sci*. 58(4): 503–9.
- Pelosi P. a Maida R.** (1995): Odorant-binding proteins in insects. *Comp Biochem Physiol* 111B: 503–514.
- Pes D., Dal Monte M., Ganni M. a Pelosi P.** (1992): Isolation of two odorant-binding proteins from mouse nasal tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 103: 1011–1017.
- Pes D. a Pelosi P.** (1995): Odorant-binding proteins of the mouse. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B: 471–479.
- Pes D., Mameli M., Andreini I., Krieger J., Weber M., Breer H. a Pelosi P.** (1998): Cloning and expression of odorant-binding proteins Ia and Ib from mouse nasal tissue. *Gene*. 212: 49–55.
- Pevsner J., Trifiletti R. R., Strittmatter S. M. a Snyder, S. H.** (1985): Isolation and characterization of an olfactory receptor protein for odorant pyrazines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82: 3050–3054.
- Pevsner J., Sklar P. B. a Snyder S. H.** (1986): Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4942–4946.
- Pevsner J., Reed R. R., Feinstein P. G. a Snyder S. H.** (1988a): Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science* 241: 336–339.
- Pevsner J., Hwang P. M., Sklar P. B., Venable J. C. a Snyder S. H.** (1988b): Odorant-binding protein and its mRNA are localized to lateral nasal gland implying a carrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2383–2387.
- Pevsner J., Hou V., Snowman A. M. a Snyder S. H.** (1990): Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 265(11): 6118–6125.
- Pevsner J. a Snyder S. H.** (1990): Odorant-binding protein: odorant transport function in vertebrate nasal epithelium. *Chem. Senses* 15: 217–222.
- Prager E. M., Orrego C., a Sage R. D.** (1998): Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. *Genetics* 150: 835–861.
- Regnier F. E.** (1971): Semiochemical-structure and function. *Biol Reprod* 4: 309–326.
- Rabelais F.** (1565): *Songes Drolatiques de Pantagruel, česky Gargantua a Pantagruel*. Praha: Státní nakladatelství krásné literatury a umění (1968).
- Sage R. D., Atchley W. R. a Capanna E.** (1993): House mice as models in systematic biology. *Systematic Biology* 42: 523–561.
- Saitou N. a Nei M.** (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Salier J. P.** (2000): Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochim Biophys Acta* 1482: 25–34.
- Sandler B. H., Nikonova L., Leal W. S. a Clardy J.** (2000): Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chem. Biol.* 7: 143–151.

- Sanger F. S., Nicklen S. a Coulson A. E.** (1977): DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463–5467.
- Sansom C. E., North A. C. a Sawyer L.** (1994): Structural analysis and classification of lipocalins and related proteins using a profile-search method. *Biochim Biophys Acta*. 1208(2): 247–55.
- Sbarbati A. a Osculati F.** (2006): Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones. *Cells Tissues Organs* 183(4): 206–19.
- Scaloni A., Paolini S., Brandazza A., Fantacci M., Bottiglieri C., Marchese S., Navarinni A., Fini C., Ferrara L. a Pelosi P.** (2001): Purification, cloning and characterization of odorant- and pheromone-binding proteins from pig nasal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 823–834.
- Serizawa S., Ishii T., Nakatani H., Tsuboi A., Nagawa F., Asano M., Sudo K., Sakagami J., Sakano H., Ijiri T., Matsuda Y., Suzuki M., Yamamori T., Iwakura Y. a Sakano H.** (2000): Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat Neurosci* 3: 687–693.
- Shahan K. M., Denaro M., Gilmartin M., Shi Y. a Derman E.** (1987): Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary and lachrymal glands and in the liver. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1947–1954.
- Shaw P. H., Held W. A. a Hastie N. D.** (1983): The gene family for major urinary proteins, expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell* 32: 755–761.
- She J. X., Bonhomme F., Boursot P., Thaler L. a Catzeflis F.** (1990): Molecular phylogenies in the genus *Mus*: Comparative analysis of electrophoretic, scnDNA hybridization, and mtDNA RFLP data. *Biol. J. Linn. Soc.* 41: 83–103.
- Shen S. H., Slightom J. L. a Smithies O.** (1981): A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell* 26: 191–203.
- Schofield P. R.** (1988): Carrier-bound odorant delivery to olfactory receptors. *Trends Neurosci.* 11: 471–472.
- Singer A. G., Macrides F., Clancy A. N. a Agosta W. C.** (1986): Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J. Biol. Chem.* 261: 1332.
- Singer A. G. a Macrides F.** (1993): Composition of an aphrodisiac pheromone. *Chem. Senses* 18: 630.
- Skerra A.** (2000): Lipocalins as a Scaffold. *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 337–350.
- Snoddy A. M., Heckathorn D. a Tessel R. E.** (1985): Cold-restraint stress and urinary endogenous beta-phenylethylamine excretion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 497–500.
- Spinelli S., Ramoni R., Grolli S., Bonicel J., Cambillau C. a Tegoni M.** (1998): The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry* 37: 7913–7918.
- Steinbrecht R. A.** (1996): Are Odorant-binding Proteins Involved in Odorant Discrimination? *Chem. Senses* 21(6): 719–727.
- Steinbrecht R. A.** (1998): Odorant-Binding Proteins: Expression and Function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855: 323–32.

- Stopková R., Stopka P., Janotová K. a Jedelský P. L.** (2007): Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *J Chem Ecol.* 33(4): 861–9.
- Stopková R.** (2009): Struktura a funkce vybraných lipokalinů a jejich role v chemické komunikaci savců. Praha: Přírodovědecká fakulta UK, Disertační práce.
- Stopková R., Hladovcová D., Kokavec J., Vyoral D. a Stopka P.** (2009): Multiple roles of secretory lipocalins (Mup, Obp) in mice. *Folia Zoologica* 58 (Suppl. 1): 29–40.
- Stopková R., Zdráhal Z., Ryba S., Sedo O., Sandera M. a Stopka P.** (2010): Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* 11: 45.
- Strotmann J., Wanner I., Krieger J., Raming K., Breer H.** (1992): Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurons. *NeruroReport* 3: 1053–1056.
- Strotmann J., Wanner I., Helfrich T., Beck A., Meinken C., Kubick S. a Breer H.** (1994): Olfactory neurones expressing distinct odorant receptor subtypes are spatially segregated in the nasal neuroepithelium. *Cell Tissue Res.* 276: 429–438.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. a Kumar S.** (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Taylor A. J., Cook D. J. a Scott D. J.** (2008): Role of Odorant Binding Proteins: Comparing Hypothetical Mechanisms with Experimental Data. *Chemosensory Perception* 1: 153–162.
- Tegoni M., Ramoni R., Bignetti E., Spinelli S. a Cambillau C.** (1996): Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat. Struct. Biol.* 3: 863–867.
- Tegoni M., Pelosi P., Vincent F., Spinelli S., Campanacci V., Grolli S., Ramoni R. a Cambillau C.** (2000): Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (1-2): 229–40.
- Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S. a Menini A.** (2009): From pheromones to behavior. *Physiol Rev.* 89:921–956.
- Touhara K. a Vosshall L. B.** (2009): Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 307–32.
- Utsumi M., Ohno K., Kawasaki Y., Tamura M., Kubo T. a Tohyama M.** (1999): Expression of major urinary protein genes in the nasal glands associated with general olfaction. *J. Neurobiol.* 39: 227–236.
- Vassar R., Ngai J. a Axel R.** (1993): Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74: 309–318.
- Veselovsky Z.** (2005): Etologie: biologie chování zvířat. Praha: Academia.
- Vogt R. G. a Riddiford L. M.** (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161–163.

- Vogt R. G.** (1987): The molecular basis of pheromone reception: Its influence on behavior. In *Pheromone Biochemistry*. Prestwich, G. D. a Blomquist, G. J., Eds.: 385–431. Academic Press Orlando.
- Vogt R. G., Rybczynski R. a Lerner M. R.** (1991): Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.* 11: 2972–2984.
- Wojasek H. a Leal W. S.** (1999): Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and interaction with membranes. *J. Biol. Chem.* 274: 30950– 30956.
- Wyatt T. D.** (2003). *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Oxford: Oxford University Press.
- Wysocki C. J.** (1978): Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev* 3: 301–341.
- Xu F., Schaefer M., Kida I., Schafer J., Liu N., Rothman D. L., Hyder F., Restrepo D. a Shepherd G. M.** (2005): Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol.* 489(4): 491–500.
- Yonekawa H., Moriwaki K., Gotoh O., Miyashita N., Matsushima Y., Shi L. M., Cho W. S., Zhen X. L. a Tagashira Y.** (1988): Hybrid origin of Japanese mice "*Mus musculus molossinus*": evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol.* 5(1): 63–78.
- Young J. M., Friedman C., Williams E. M., Ross J. A., Tonnes-Priddy L. a Trask J.** (2002): Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum Mol Genet* 11: 535–546.
- Ziegelberger G.** (1995): Redox-shift of the pheromone-binding proteins in the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Eur. J. Biochem.* 232: 706–711.
- Zhang X. a Firestein S.** (2002): The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5: 124–133.
- Zozulya S., Echeverri F. a Nguyen T.** (2001): The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol* 2: RESEARCH0018.
- Zuckerkindl E. a Pauling L.** (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving Genes and Proteins*. Bryson V. a Vogel H. J., Eds.: 97–66. New York: Academic Press.

8. Přílohy

8.1 Seznam aminokyselinových sekvencí použitých pro zkonstruování evolučního stromu savčích OBP

Sekvence OBP ve fasta formátu, nově získané jsou označeny*, ostatní pocházejí z databází GenBank a EMBL-EBI. Bt – *Bos taurus*; Dm – *Drosophila melanogaster*; Cc – *Cricetus cricetus*; Em – *Elephas maximus*; Md – *Mus musculus domesticus*; Mg – *Myodes glareolus*; Mm – *Mus musculus musculus*; Mmi – *Mus minutoides*; Rn – *Rattus norvegicus*; Ss – *Sus scrofa*; Xl – *Xenopus laevis*. APHRO – aphrodisin; FLP – female lacrimal protein; MSP – male-specific protein.

>Mm_OBP1*

MVKFLLIALALGVSCAHHESLDISPSEIDGNWRTFYIAADKEEKVKMNGALRAYFEHMECNDDCGTLK
VKFHVQMNGKQCQHTHTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVRKKDGALFFHNVNVDSESGQETNVILVA
GKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDTCNQ

>Mm_OBP5*

MAKFLLLALTFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVTFYVNENGGQ
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNRYKLVDESPENLIFYSENVDRADRKTLLFILGHGPLTSEQKEK
FAELAEKGIKPAKNIREVLITDYCPE

>Mm_OBP6*

MAKFLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVTFYVLENGQ
CSLTTITGYLQEDGKTCKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDRADRKTLLIFVLGNKPLTSEENE
RLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCPE

>Mm_OBP7*

MMVKFLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGGQWKTTAIMADNIDKIETSGPLELFFVREITCDEGCQKMKVTF
YVNQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFDENVDRASRKTLLYILGKG
EALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLKELAHEDTCPE

>Md_OBP1*

MVKFLLIAIALGVSCAHHESLDISPSEVNGDWRTLYIAADKVEKVKMNGDLRAYFQHMECNDDCGTLK
VKFHVQMNGKQCQHTHTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVMKEDGALFFHNVNVDSESGQETNVILVA
GKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDTCNQ

>Md_OBP5*

MAKFLLLLALTFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVTFYVNENGG
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRKTLLFILGHGPLTSEQKE
KFAELAEKIPARNIREVLITDYCPE

>Md_OBP6*

MAKFLLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGKLRUYCRSLTCEKECKEMKVTFYVLENGQ
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDRADRKTLLIFVLGNKPLTSEENE
RLVKYAVSSHIPPENIRHVLTDTDCPE

>Md_OBP7*

MMVKFLLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGGWKTAIMADNIDKIETSGPLELHVREITCDEGCQKMKVTF
YVKQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFYDENVDRASRKTLLYILGKG
EALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLRELAHEDTCPE

>Mmi_OBP1*

FLLIALLGVSCAHHESLDISPSEVNGAWRTLVIASDNVDKVKEGGELRAYFEHMECSEDCQTLKVKF
HVQVNSECQHTVVGEEKEDGRYTTDYSGRNYFHVVMKKDGALYFHNVNVDENEQKTNVILVAGKE
ETLSKAQKQELKLLKEYNIPKENIQHLAPTDCNQ

>Mmi_OBP4*

MVKFLLLLALAFGLAHAEMEGPWKTVAIAADRVGKIEPNLRLYLSLECEDECQKLIVTFYVLENEQC
TLTKVTGYLQEDKTYRSQFQGDNHYKLLKQTRKHLVYSENEVDADRKTLLIFVLGHEPLTTEENEQ
FESYAESKGIPPENIRHVLETDTDCPEV

>Mmi_OBP5*

MAKFLLLLALTFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVTFYVNENGG
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRKTLLFILGHGPLTSEQKE
KFAELAEKIPARNIREVLITDYCPE

>Mmi_OBP6*

MAKFLLLLALAFGLAHAEMEGPWKTVAIAADRVGKIEPNLRLYLSLECEDECQKLIVTFYVLENEQC
TLTKVTGYLQEDKTYRSQFQGDNHYKLLKQTRKHLVYSENEVDADRKTLLIFVLGHEPLTTEENEQ
FESYAESKGIPPENIRHVLETDTDCPEV

>Mmi_OBP7*

MMVKFLLLLALAFGLTHAHEHAQLEGQWRTLAIMADNMDLIEHGGRMELFIREITCDDNDEECKEMRVS
FYVNQNGQCSKTIVIGYMEEDQQTITNQYEGENHYRLLEGTSEYLIFYDENVDRASRKSLLYALGKG
DPLTEEQKEKLLAFAKEKIPAENIKLLTHEDICPE

>Md_NCBI_OBP1

MVKFLLIALALGVSCAHHESLDISPSEVNGDWRTLYIAADKVEKVKMNGDLRAYFEHMECNDDCGTLK
IKFHVQMNGKCQHTTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVMKEDGALFFHNVNVDSESGQETNVILVA
GKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDTCNQ

>Md_NCBI_OBP3

MVKFLLIVIALGVSCAHHESLDISPSEVNGDWRTLYIAADKVEKVKMNGDLRAYFEHMECNDDCGTLK
VKFHVQMNGKCQHTTVVGEKQEDGRYTTDYSGRNYFEVVMKEDGALFFHNVNVDSESGQETNVILVA
GKGETLSKAQKQELGKLVKEYNIPKENIQHLAPTDTCNQ

>Md_NCBI_OBP4

MVKFLLLALTFGLAHAQTDGPWKTIAAADNVDKIEISGEDKIEISGELRLYFHQITCEKECKKMNVTFYV
NENGQCSLTTITGYLQDDGNTYRSQFQGDNHYATVRTTPENIVFYSENVDRAGRKTKLVYVVGSGHP
LTLEQKEKIVEYAKENNIPPGNIREVLTTDYCPR

>Md_NCBI_OBP5(OBP1a)

MAKFLLLALTFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGELRIYCRSLTCEKECKEMKVTFYVNEGQ
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQFQGNRYKLVDESPENLTFYSENVDRADRKTKLLFILGHGPLTSEQKE
KFAELAEKIPAGNIREVLITDYCPE

>Md_NCBI_OBP6

MAKFLLLALAFGLAHAAMEGPWKTVAIAADRVDKIERGGKLRUYCRSLTCEKECKEMKVTFYVLENGQ
CSLTTITGYLQEDGKTYKTQYQGDNHYELVKETPENLVFYSENVDRADRKTKLIFVLGNKPLTSEENE
RLVKYAVSSHIPPENIRHVLGTDTCP

>Md_NCBI_OBP7(OBP1b)

MMVKFLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGQWKTTAIMADNIDKIETSGPLELTVREITCDEGCQKMKVTF
YVKQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFYDENVDRASTRKTKLLYILGKG
EALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLRELAHEDTCPE

>Md_NCBI_OBP8

MMVKFLLLALVFGLAHVHAHDHPELQGQWKTTAIMADNIDKIETSGPLELTVREITCDEGCQKMKVTF
YVKQNGQCSLTTVTGYKQEDGKTFKNQYEGENNYKLLKATSENLVFYDENVDRASTRKTKLLYILGKG
EALTHEQKERLTELATQKGIPAGNLKELAHEDTCPE

>Rn_OBP1

MVKFLLIVLALGVSCAHHENLDISPSEVNGDWRTLYIVADNVEKVAEGGSLRAYFQHMECGDECQELK
IIFNVKLDSECQHTTVVQKQKEDGRYTTDYSGRNYFHVLLKKTDDIIFHNVNVDSESGRRQCSDLVAGKR
EDLNKAQKQELRKLAEYINIPNENTQHLVPTDTCNQ

>Rn_OBP1f

MVKFLLLIVLALGVSCAHHENLDISPSEVNGDWRTLYIVADNVEKVAEGGSLRAYFQHMECGDECQELK
IIFNVKLDSECQTHTVVGQKHEDGRYTTDYSGRNYFHVLLKTTDDIIFHNVNVDESGKETNVILVAGKR
EDLNKAQKQELRKLAEYENIPNENTQHLVPTDTCNQ

>Mg_OBP1a

MIKFLLMALAFGLAHAQAELEGKWVTTAIAADNVDKIERGGPLRLYIRKITCTEACSKMEVTFYVNENN
QCSQTKITGYRQEDGNYRAQFEGDNVFKPVAATEDIIVFASENVDRAGRRTTNLVLVAGKGQPLTPEQ
HEKLEAYAKEHNIPPENIRDLLATDTCPE

>Mg_OBP1b

MIKFLLMALAFGLAHAQAELEGKWVTTAIAADNVDKIERGGPLRLYIRKITCTEACSKMEVTFYVNENN
QCSQTKITGYRQEDGNYRAQFEGDNVFKPVAATEDTIVFASENVDRAGRRTTNLVLVAGKGQPLTPGQ
HEKLEAYAKEHNIPPENIRDLLATDTCPE

>Mg_OBP2

MVKFLLLALSFGLAHAQAELEGKWVTTAIAADNIDTIEEEGPMRIYVRELTCSSEACSKMGVTFYVNANG
QCSETKVIGYRQEDGKYRTQFEGDNRFEPVHATPENIVFTNKNVDRTGRTTKLIFVVGKGQPLTPEQY
EKLEEFKQGIPTENIREVLPTDTCPE

>Mg_OBP3

MVKFLLLALAFGLVHAYAELEGTWYTTAIAADNVDTIEEEGPLRLYVRELTCSKGCNKLGVTFYVNANG
QCSKTTVTGYMQEDGKYRTQFEGDDRFPVHATPDNIVFISQNVDRAGRRTTNLIFVVGKGQPLTPEQ
YEKLEEFKQNIPTENIRNVLATDTCPE

>Cc_APHRO

MVKILLLALVFSLAHAQDFAELQGKWTIVIAADNLEKIEEGGPLRFYFRHIDCYKNCSEMEITFYVITNN
QCSKTTVIGYLKNGTYQTQFEGNNIFQPLYITSDKIFFTNKNMDRAGQETNMIVVAGKGNALTPEEN
EILVQFAHEKKIPVENILNILATDTCPE

>Cc_MSP

MVKFLLLALALGVSCAQHQNLEVSPSEVDGKWHSLYIAADNKSXVSEGGPLRVYVKHLECSDECQTF
TIKFYTKVENVCQEHRVVGRKGDGKYITDFSGQNYFHVVEKADDTMTFHNVNVDSDGKTNVILVVG
KGESSSIEQQRFEKTAEKYDIPKENIEHLVTTDTCNQ

>Cc_FLP

MVKFLLLALALGVSCAHYQNLEVSPSEVDGKWYSLYIAADNKEKVSEGGPLRAYIKNVECIDECQTLKI
TFYTKVEGVCQEHTIVGRKGEDGKYITDFSGQNYFHIVEKSDDTMTFHNVNVDSDGKTNVILVVGGRG
SSSIEQKQRFEKTAEEYDIPKENIEDLVPTDNCDQ

>Em_OBP

MLEEPDLLDEYCSSEISGTWYTIYEASANIEVLSSENSPLRGYFRLIKCHPDGETLLVIFYTKENGTCCQLYNK
QQQRIDENGYTTNYEGKVDFFSFIQQAKDFLLIHAINKNEEGNVFEVVGALAREKDISEENYQAFLEFAV
ENGIPKENIVKVIDTDTCPETLT

>Bt_OBP

MKVLFLTLLLGVVCAAQEEEEAEQNLSELGSGSWRTVYIGSTNPEKIQENGPFRITYFRELVFDDEKGTVD
FYFSVKRDGKWKVHVHVKATKQDDGTYVADYEGQNVFKIVSLSRTHLVAHNINVDKHHGQKTELTGLFV
KLNVEDEDLEKFWKLTEDKGIDKKNVVNFLENEDHPHPE

>Bt_OBPlike

MKILFLSLVLLVCAAQETPAEIDPSKVVGWRTIYAAADNKEKIVEGGPLRCYNRHIECINNCEQLSLS
FYIKFDGTCQFFSGVLQRQEGGVYFIEFEGKIYLIHVTDNILVFYYENDDGEKITKVTEGSAKGTSTPT
EEFQKYQQLNNERGIPNENIENIETDDCPP

>Ss_OBP

MKSLLLSLVLGLVCAQEPQPEQDPFELSGKWITSYIGSSDLEKIGENAPFQVFMRSIEFDDKESKVYLN
FFSKENGICEEFSLIGTKQEGNTYDVNYAGNNKFVVSYASETALIISNINVDEEGDKTIMTGLLGKGTDI
EDQDLEKFKEVTRENGIPEENIVNIIERDDCPAK

>XI_OBP

MQPVMVKPFFLLLLLVFLLGRTGADLPADPNFTNDKLMGEWVGVAVASDCPTFSAMKAEMKTEPVVKF
WKDGANLICGTGFRTSKGCQKREITLKENGNGHFTYSVPQMGDSVMTILSITPTLCLAHTLTNAPDGK
VYIELQFFKRGAEPPGAKKQFSDYAIKLGKEDNIVFFEKGEKCHFK

>Dm_OBP57d

MPEKMSLRLVPHLACIIFILEIQFRIADSNPCPHNQGIDEDIAESILGDWPANVDLTSVKRSHKCYVTCI
LQYYNIVTASGEIFLDKYYDTGVIDELAVAPKINRCRYEFRMETDYCSRIFAIFNCLRQEILTKS