

**Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Petra Prášila s názvem: Specification of the pheromone receptor repertoire of the domestic dog (*Canis familiaris*) at DNA level**

Diplomová práce Petra Prášila je badatelsky zajímavým dílem, protože si klade za cíl něco opravdu aktuálního, totiž prozkoumat diverzitu predikovaných a známých feromonových receptorů a zjistit, které z nich jsou intaktní a mohou tak sloužit své funkci. Celá práce je sepsána na 49 stranách včetně 5 stran použité literatury.

Struktura práce: Práce je vcelku čtivá a pochválil bych, že je sepsána v angličtině. Nebude pak těžké předělat DP do formy vědecké publikace. Na druhé straně musím s politováním konstatovat, že některé zásadní argumenty nejsou řádně ocitovány; proč není jediná citace na straně 1 (t.j. v kapitole Introduction)? Některé citace a informace úplně chybí. V úvodu i v diskuzi chybí celá řada informací ohledně transportu feromonů pomocí proteinů z rodiny lipokalinů. To je škoda, protože celá řada z nich se účastní desenzitizace chemosenzorických neuronů či prodloužení doby jejich působení v olfaktorické a i VNO sliznici. Většina těchto mechanismů byla sice popsána u myši domácí, celá řada těchto proteinů je ale přítomna i u psa.

Ke struktuře a čelnění práce mám ještě jednu výhradu. Trochu mě rozptylovala od ohniska problému příliš dlouhá a manuálově strukturovaná metodika. Myslím si, že celá metodika klonování mohla být stručnější s tím, že některé pasáže, evidentně převzaté z manuálů kitů mohly být přesunuty do appendixu. O důvod k přesunutí více je fakt, že více kitů bylo použito evidentně proto, že něco chodilo lépe a něco hůře.

Jádro badatelství: Fakt že, intaktních receptorů specificky vázajících feromony je tak málo (t.j. 8x VR a 2 TAAR) u organismu, který se považoval za otroka feromonů, je pro mě zajímavé ale ne moc nové. Nebylo totéž sděleno již v review z roku 2008 (The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity)? Jsou to ty samé receptory? Považoval bych za vhodné se nad celým problémem znovu zamyslet a přijít s nějakou interpretací na evoluční úrovni a naznačit, proč je intaktních feromonových receptorů tak málo. Například u člověka došlo k pseudogenizaci V1R a V2R asi proto, že

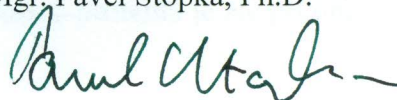
jsme začali vidět trichromaticky a proto taky většinou nemáme funkční vomeronasální orgán. Takové či obdobné myšlenky a domněnky konfrontované se známými literárními zdroji jsem v diskuzi DP postrádal. Celá diskuze je opět spíše metodologická a řeší, proč některé klonovací techniky fungovaly a jiné ne. Diskuze vlastně neřeší biologickou podstatu problému řešeného v rámci DP. Považuji ji za nejslabší část DP.

Sporná jsou i některá tvrzení v DP a to hned na straně 1 v úvodu. Představa, že VNO deteguje feromony a OE deteguje odoranty včetně environmentálních stimulů je zastaralá. Mezi oběma orgány je překryv a některé organismy, t.j. ty co ztratily VNO detekují feromony, přestože mají pouze OE.

Závěr: Zabývat se něčím, za co byla v tomto století udělena Nobelova cena je jistě prospěšné a to i v případě, kdy se diplomantovi podařilo stávající informace pouze doplnit. Vřele proto doporučuji tuto práci k obhajobě a vzhledem k výše uvedeným pochybnostem či nedostatkům navrhuji známku 2.

V Praze dne 21. května 2012

doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.





### **Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Petra Prášila**

Práce Petra Prášila se zabývá identifikací genů pro feromonové receptory třídy VIR a TAAR u psa domácího a jejich následným zaklonováním do různých vektorů. Součástí práce byla také implementace nových klonovacích metod. Ve svém posudku se budu nejprve zabírat formální stránkou práce a poté jejím vědeckým přínosem.

#### **Formální stránka práce**

Magisterská práce má celkem 45 stran a klasické členění. Práce neobsahuje poděkování, doufám, že toto autor pouze opomněl. Stránky 38-45 jsou v práci dvakrát (přehmat, nad kterým můžeme přihmouřit oči, pokud by se jednalo o bakalářskou práci, u magisterské práce to zavání nedbalostí a ledabylostí).

Úvod je napsaný poměrně dobře, i když není dokonalý. Figure 1.3. není v práci zmíněn, autor do podrobnosti popisuje přenos signálu přes cAMP, nicméně obrázek 1.3. znázorňuje jinou signální dráhu (přes fosfolipázu).

Na straně 5 autor zmiňuje, že VNO receptory se vyvíjely mnohem rychleji než receptory MOS, mohl by autor vysvětlit, jak se k tomuto závěru došlo? Pro odborníka je to asi patrné z obrázku 1.4., ale pro laika (a já se za laika v oblasti čichacích genů považuji) to může být trochu nepochopitelné.

Tabulka na straně 6, která nemá číslo ani popis, je nepřehledná a nedává smysl. Ve sloupci s nápisem „possible signal in male“ bych předpokládala reakci samce, který je určitému signálu vystaven, ale v pár případech se zde také vyskytuje popis reakce samice (např. řádek 2, 3 atd.) V kapitole 1.2. bych uvítala odstavec ohledně situace u lidí.

Na straně 16, kapitola 3.1.1, řádek 4, má být V2R, ne VIR2

Strana 17 – pravděpodobně překlep týkající se délky overhangu u primerů (200bp ?)

Výsledky jsou napsány rychle a spoustu obrázků není vysvětleno (např. 4.1. – 4.5.)

Strana 31 – v textu jsou uvedeny geny TAAR1 a TAAR2 – v tabulce (opět bez čísla a názvu) TAAR4 a TAAR5.

Ke kapitole 4.4.1 – chybí obrázek výsledků

Obrázky 4.6. a 4.7. považuji za úplně zbytečné

Tabulka primerů patří do metodiky

Obrázek 4.8. a 4.10 – chybí označení bandů markeru

Obrázek 4.13 – mutace nemá za následek „shift“ of serine to leucine, ale „switch of serine to leucine“ – nedochází k posunu, ale k výměně aminokyselin

Obrázek 4.14 – v popisu autor zmiňuje VIR1, ale má být VIR7

Obrázek 4.16 má znázorňovat SNP v pozici 242, sekvence končí nukleotidem 230

## Vědecký přínos práce

Ve zkratce se dá shrnout, že autor identifikoval 10 genů kódující feromonové receptory třídy V1R a TAAR a zamplifikoval a zaklonoval 8 těchto genů. Je škoda, že nezbylo čas na „opravdové“ experimenty díky autorovým problémům s klonováním. Chápu, že klonování může být občas časově náročné a frustrující, ale zde nechápu, proč autor nezvolil trochu více systematický přístup (považuji za zbytečné opakovat metodu 20x) a pokud ho zvolil, rozhodně ho nevysvětlil ve své práci. Také možná se mohl soustředit pouze na jeden, dva geny, zaklonovat je do expresního vektoru a přistoupit ke dvou-fotonové polarizační mikroskopii a tím dát projektu trochu více vědeckého zadostiučinění. Také pokud bylo součástí práce zavedení a srovnání různých klonovacích metod bych ocenila, že u jednoho genu autor zkusí všechny tři zmíněné metody (BP rekombinaci PCR produktu s attB místy, „blunt end“ klonování pomocí PmeI a TOPO TA cloning) a poté srovná jejich časovou a finanční náročnost. Myslím si, že toto srovnání by mělo velký přínos pro naši jihočeskou komunitu.

### Otázky:

1. Strana 16 – pokud se vědělo, že genom psa neobsahuje V2R, vědělo se také o 8 genech pro V1R, anebo to jsou čistě autorova originální data.
2. Autor neustále zmiňuje pseudogeny pro V1R7 a další receptory – mohl by autor vysvětlit jejich vznik, jak rozhodl, že tyto úseky DNA jsou pseudogeny daného genu, jak hodně jsou tyto pseudogeny odlišné od „pravého“ genu a proč jsou důležité. K tomuto tématu se také vztahuje obrázek 4.18, který není vůbec vysvětlen a není jasné, co tímto schématem chtěl autor říci, může být toto trochu lépe rozvedeno?
3. Strana 32 – autor uvádí, že pomocí primerů V1R7 amplifikoval pseudogeny, ale na obrázku 4.8. je pouze jeden band, mohl by autor tuto nesrovnalost vysvětlit?
4. Proč autor nezkusil klonování PCR produktu, který by měl attB overhangy pro klonování do vstupního Gateway vektoru?
5. Pokusil by se autor lépe vysvětlit spontánní mutaci a instabilitu pDONR201-PmeI vektoru? Co se dělo se sekvencí plasmidu, že na gelu je vidět více forem plasmidu i před jeho naštípáním?
6. SNPs - pokud dobře chápu prezentované obrázky, tak v případě SNP-83 a SNP-242 u V1R7 je klon V1R7-1 GW1 vždy shodný s referenční sekvencí. Jedná se opravdu o SNPs, nebo pouze o chyby polymerázy (ano, vím, že jste používali proof-reading polymerázu)?
7. Strana 38 – první odstavec  
Úplně zde nesouhlasím s autorovým závěrem, že pes je ideální pro studium feromonových receptorů pro savce, jelikož hlodavci jich obsahují hodně a primáti zase málo. Dle mého názoru, pokud je různorodost mezi skupinami savců natolik vysoká, pes se hodí ke studiu psů, myš se hodí ke studiu myši a primáti ke studiu primátů, ale je možné, že mi tento názor během své prezentace autor vyvrátí.
8. Mohl by autor trochu lépe rozvést myšlenku v závěru své diskuze, jak studie psích feromonových receptorů pomůžou při vývoji látek pro kontrolu populací krys a myši, či při ochraně vzácných druhů zvířat?

Jak je vidět z mého posudku, z této práce jsem nebyla úplně nadšená. Dle mého názoru se podobá spíše bakalářské práci (poměrně hodně formálních nedostatků a nepříliš velký vědecký přínos). Nicméně i přes tyto nedostatky práce Petra Prášila splňuje požadavky Přírodovědecké

fakulty kladené na magisterskou práci a práci doporučuji k obhajobě. V současné chvíli navrhuji hodnocení velmi dobře až dobře. Bude záležet na obhajobě studenta.

V Českých Budějovicích 27.5.2012



Alena Zíková