

# **Oponentský posudek na diplomovou práci**

**Autor: Bc. Zuzana Adamová**

**Název práce: Cytoskeleton-membrane protein interaction network in sperm**

Práce si klade za cíl studovat interakci proteinů ezrin a CD46 v hlavičce myší spermie a sledovat změnu lokalizace těchto proteinů během akrozomální reakce.

## **Souhrn**

Práce se podobnou metodikou jako recentní publikované články skupiny Dr. Dvořákové-Horthové zaměřuje na kolokalizaci a interakci proteinů v hlavičce spermií. S využitím moderních metod fluorescenční mikroskopie ukazuje velmi detailně lokalizaci studovaných proteinů a jejich možnou asociaci. Pomocí imunoprecipitace dokládá pravděpodobnou interakci. Mikroskopické výsledky jsou přesvědčivé, biochemické metody již méně, přesto lze předkládaná data považovat za zajímavé předběžné výsledky, které nepochybně laboratoř v příštích letech zúročí v publikaci.

Práce je psaná ve formě, která je blízká odbornému článku. Prvotní dojem je tak velmi dobrý, protože práce je přehledná a srozumitelná. Na druhou stranu diplomová práce by měla ze všeho nejvíce ukázat metodické zkušenosti studenta. Kapitola Results je však na pouhých sedmi stranách, na kterých většinu místa zabírají až zbytečně velké obrázky. Samotný text výsledků odpovídá komprimované formě odborného článku. Není tak zřejmé, jestli autorka skutečně provedla jen jí uvedené experimenty (což je na zhruba dvouletou stáž v laboratoři málo), nebo jen vybrala ty pozitivní (což by byla škoda, protože i negativní kvalitně provedené výsledky mají své místo v diplomové práci).

## **Formální úroveň práce**

Práce je psaná v anglickém jazyce a má 55 stran (bez přehledu literatury 39). Na diplomovou práci je to poměrně krátký text, nicméně obsahuje všechny požadované kapitoly. Po jazykové, gramatické i stylistické stránce je práce na velmi dobré úrovni. Obrazová dokumentace je dobrá ve výsledkové části. V literárním přehledu by si obrázky zasloužili lepší rozlišení. U prvního obrázku barvy neodpovídají vysvětlujícímu textu. Je to pravděpodobně způsobeno tiskárnou, ale při zkušebním tisku obrázku se těmto nepatřičnostem dá předejít.

## **Hodnocení kapitol diplomové práce**

### **Literární přehled**

Literární přehled je napsán dobře a srozumitelně. Drží se hlavního tématu a má logickou návaznost. Úvodní a závěrečné věty u částí textu udržují plynulost a čtivost textu. Je rozsáhle popsáno dozrávání spermie a akrozomální reakce, ale charakterizace proteinů CD46 a ezrin, které jsou hlavním tématem práce, je poněkud stručná. Každému je věnována jen jedna strana. Myslím, že zrovna o ezrinu by se dalo napsat mnohem víc. Jeho role a funkce v různých tkáních je analogická a podrobnější popis jeho funkce a regulace nejenom ve spermiích by dle mého názoru v této práci mohl být. Rovněž by neškodilo, kdyby v přehledu bylo více schémat.

## **Metody**

Kapitola metody je pojatá stylem odborného článku. Sice obsahuje všechny informace a metody jsou popsány dostatečně detailně, avšak za současné minimalizace celkového textu. Vzhledem k tomu, že metodicky vychází z již publikovaných prací laboratoře, autorka si tak práci značně usnadnila (porovnání s články Frolíková 2016 a Frolíková 2018). Dále si myslím, že není dobré v metodách uvést: „*as described previously*“. Je to diplomová práce, ne odborný článek.

## **Výsledky**

Výsledky jsou nejslabší kapitolou. Obsahuje pouze osm obrázků. Polovina výsledků ukazuje lokalizaci a změnu distribuce ezrinu a CD46 během akrozomální reakce. Obrázky z fluorescenčních mikroskopů jsou velmi pěkné a přesvědčivé. Formulace, že pro kolokalizační experimenty byla použita metoda konfokální mikroskopie místo SIM, protože SIM je příliš časově náročná, mi nepřijde vhodná. Především v práci, kde výsledkům očividně nebylo věnováno tolik času, jako je u diplomových prací zvykem. Analýza kolokalizace pomocí SIM by naopak mohla být přínosnější, vzhledem k velikosti hlaviček spermií.

Druhá polovina výsledků pomocí western blotu ukazuje detekci P-ezrinu a imunoprecipitaci CD46 za ezrin. Jsem si vědom, že je obtížné získat dostatek materiálu. Teoreticky však na opakování experimentů byl dostatek času (vzhledem k celkově malému množství dat) a metoda western blot je už laboratorní rutina. U Fig. 9 chybí kontrola nanášky a vysvětlení negativní kontroly by mělo být v textu obrázku. Fig. 10 by měl mít detekci P-ezrinu a CD46 v „*total*“ lyzátech. Výsledky z Fig. 11 jsou velmi rozporuplné. Autorka to v diskuzi obšírně diskutuje a vysvětluje možnou příčinu. Z textu vyplývá, že bylo provedeno pouze jedno biologické opakování.

## **Diskuze**

Diskuze je naopak velice dobrá a detailní. Vysvětluje význam experimentů, diskutuje experimentální komplikace, porovnává výsledky s literaturou i předkládá alternativní experimenty.

## **Souhrn**

Závěr práce je ve formě krátkého souhrnu, opět odpovídající článkové formě. V diplomové práci by asi bylo vhodnější odděleně konstatovat splnění jednotlivých cílů.

---

Dle mého názoru je patrné, že Zuzana Adamová je především schopna z průměrných dat sepsat velice dobrý text. Proč vlastním experimentům nevěnovala více času, je otázka na školitele. Z pozice oponenta mám určité výhrady, ale práci jako celek ke schválení doporučuji.

---

## Otázky

- 1) Proč používáte neredukující lyzační pufr pro vzorky, kde stanovujete celkové množství proteinu? (Kap. 5.2 a 5.4)
- 2) Absenci detekce celkového ezrinu na western blotu považují za velký nedostatek, pokud chcete tato data v budoucnosti publikovat. Při zběžném průzkumu jsem narazil na spoustu anti-ezrin protilátek (osvědčené společnosti nevyjímaje). Kolik protilátek jste vyzkoušela?
- 3) Vaše předběžné výsledky ukazují možnou interakci ezrinu a CD46 v hlavičce spermie. Zkoušeli jste tuto interakci testovat v systémech, kdy by nebyla limitována množstvím biologického materiálu? (např. standardní buněčná kultura a (případná) nadprodukce jednoho z proteinů)
- 4) Autorka si je vědoma, že nekonzistentní výsledky porovnávající intaktní spermie a spermie po akrozomální reakci mohly být způsobeny experimentálními podmínkami. Proč tedy nebyl experiment opakován (nejméně dvakrát) a s větším počtem vzorků? *(PS: Předpokládám, že laboratoř zabývající se touto tematikou a dlouhodobě publikující články v kvalitních časopisech nemá nedostatek biologického materiálu.)*
- 5) Proč jste se rozhodli testovat interakci CD46 zrovna s ezrinem? Doménu FERM má velké množství proteinů *(byť vy přímo netvrdíte, že interakce je zprostředkována doménou FERM)*. V práci Frolíková 2016 ukazují vaši kolegové kolokalizaci CD46 s integriny  $\beta 1$  a  $\alpha 3$ . Proteiny talin a kyndlin, které mají rovněž doménu FERM, přímo regulují aktivitu integrinů. Talin je navíc oním propojením s aktinovými vlákny, které ve vztahu k CD46 hledáte. Netestovali jste interakci/kolokalizaci CD46 s talinem/kyndlinem?

---

RNDr. Ondřej Tolde, Ph.D.

v Praze dne 20. 5. 2019