

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Protein RAB-2A: Jeho lokalizace a funkce v lidských spermích a fertilizaci

Autor: Bc. Lucie Sadílková

Diplomová práce Lucie Sadílkové je zaměřena na studium proteinu Rab-2A v lidských spermích. Ke studii tohoto proteinu byly využity biochemické a imunofluorescenční metody za využití monoklonálních protilátek. V první části práce se autorka věnuje testování monoklonální protilátky 5C5 proti proteinu RAB-2A, vytvořené v Laboratoři Reprodukční Biologie. Protilátka 5C5 byla testována na proteinech lidských spermích a následně byly detekované proteiny analyzovány hmotnostní spektrometrií, kde se přítomnost proteinu Rab-2A povedlo prokázat ve všech bandech značených protilátkou 5C5. Další část práce je zaměřena na detekci proteinu Rab2A v lidských spermích po kapacitaci a akrosomalni reakci. Je zde ukázáno, že sledovaný protein se pravděpodobně uvolňuje ze spermie během acrosomální reakce. Pokus o detekci proteinu Rab-2a na povrchu spermii pomocí biochemických metod nebyl úspěšný. Následně byla analyzována exprese proteinu Rab-2A u spermii s různými patologiemi, kde autorka prokázala snížení exprese u patologických spermii. Další část práce je věnovaná lokalizaci proteinu Rab-2a v lidských spermích metodou nepřímé fluorescence za využití konfokální superrezoluční mikroskopie, kde byla ukázána změna lokalizace proteinu Rab-2A během kapacitace a akrosomalní reakce. Poslední část práce je věnována detekci Rab-2A v semenné plasmě, kde se povedlo detekovat tento protein v sekrečních exosomech.

Práce je dobře napsaná, text je formulován jasně a členěn přehledně, grafická část práce (obzvláště mikroskopické obrázky) je zpracována velmi pečlivě. Práce je členěna do sedmi kapitol. Úvodní kapitoly ukazují, že autorka se orientuje v dané problematice, a že zvládla veškeré používané metody. Do literárního přehledu bych ještě zařadila podkapitulu, ve které by byla detailně popsána akrosomální reakce. Výsledky jsou prezentovány přehledně a splňují většinu cílů předkládané práce. V závěru práce jsou pak výsledky shrnuty a podrobně diskutovány, je zde detailně diskutována i rozporuplnost některých výsledků a zdůvodněno, proč některé cíle práce nebyly zodpovězeny. Trochu mi v diskuzi chyběly odkazy na příslušné obrázky/grafy, které by pomohly lépe se orientovat v textu. Dobrou kvalitu diplomové práce trochu snižují drobné překlepy (např. "Axonema ve střední část bičíku" str.2, "spermatolíoza" str.4, "Alkalický lyzační puř" str. 23,...) a chyby v popisu obrázku (Obr. 16D – 3 myslím, že místo „neredukujících podmínek“ tam má být redukujících podmínek, Obr. 20 – nesedí číslování vzorků.)

V souhrnu vše ukazuje na to, že autorka zvládla studovanou problematiku a je schopna vlastní tvorby odborného textu. Podle mého názoru se jedná o dobrou diplomovou práci.

Otázky a připomínky:

1) Protilátka 5C5 značí na Western blotu spousty bandů, zatímco u proteinu Rab-2A jsou známy pouze dvě isoformy (23.5 kDa a 20.8 kDa), které značí i komerční protilátka. V diskuzi je zmíněno, že by to mohlo být různými postranslačními modifikacemi. V souvislosti s tímto mám pár otázek:

A) Ví se přesně, jak jsou schopny jednotlivé postranslační modifikace ovlivnit migraci proteinů v gelu? Sedí vámi detekované postranslační modifikace s posunem, který vy pozorujete u jednotlivých bandů (protilátka 5C5 detekuje band o velikosti 30kDa, tedy posun o 6 kDa)?

B) Neuvažovali jste o možnosti, že protilátka 5C5 váže také jiný protein než jen Rab-2A? Nezkoušeli jste nebo neplánujete vyzkoušet 2D elektroforézu, kde byste dostali více specifické bandy a případně by se dala odhalit možná vazba 5C5 protilátky na nějaký další protein?

2) Z analýzy hmotnostní spektrometrie jste museli obdržet celou řadu identifikovaných proteinů z každého bandu. Myslím, že by seznam všech identifikovaných proteinů měl být zahrnut v diplomové práci v přílohách. Byl mezi identifikovanými proteiny nějaký, který by se opakoval ve všech frakcích stejně jako protein Rab-2A?

3) Zkoušeli jste pro detekci proteinu Rab-2A u pacientů s různými patologiemi spermií také použít komerční protilátku proti Rab-2A?

4) U pokusu ukazujícího vazbu glykoproteinu ZP na proteiny spermií mě překvapilo, že signál je tak dominantní pro nízkomolekulární proteiny (protože mezi proteiny vázajícími ZP je i řada vysokomolekulárních proteinů) Máte porovnání s jinými studiemi, je toto běžný jev?

5) Obrázek 32 (izolace PT) – zajímalo by mě, proč v případě detekce protilátkou proti proteinu Rab-2A nebyl zahrnut extrakt proteinů vnitřní akrozomální membrány? Přišlo by mi to relevantní vzhledem k tomu, že u prodloužených spermatid Rab-2A zůstává zachován mimo jiné na celé vnitřní akrozomální membráně.

6) V závěru mi trochu chybí shrnutí vašich poznatků v souvislosti s lokalizací a funkcí proteinu RAB-2A u spermií. Mohla byste, prosím, krátce shrnout (třeba graficky) vaši hypotézu, jak se podle vás protein Rab 2a chová během zrání spermie, jak k jeho relokaci dochází a jaké jsou podle vás hypotetické funkce proteinu Rab-2A v jednotlivých fázích?

7) Spíše návrh než otázka – autorka v diskuzi píše, že možným důvodem, proč se nepovedla izolace povrchových proteinů je, že některé proteiny se nepodařilo z avidinových částic uvolnit. Tomu by odpovídal i fakt, že clusterin (pozitivní kontrola) nebyl detekován v žádné frakci (Obr. 23 C nanáška 4 a 5). Řešením tohoto problému by mohlo být použití streptavidinových kuliček, ze kterých se navázané proteiny nemusejí vymývat, dají se nanést i s kuličkami rovnou na gel.