

**Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Kateřiny Veselé:  
“Dynamika akrozomální reakce při vnitrodruhové kompetici spermií hlodavců”**

Vzhledem k problémům s reprodukcí u savců, včetně člověka, stojí studium molekulárních mechanismů oplození a reprodukce v popředí zájmu řady světových laboratoří. Poznání všech kroků, které jsou nezbytné pro úspěšné oplození je nezbytné pro řešení problémů neplodnosti. Jedním z důležitých kroků je příprava spermií k vazbě na zona pellucida vajíčka. Kapacitace spermií a poslední krok kapacitace, t. j. akrozomální reakce, jsou nezbytné pro úspěšnou vazbu a oplození vajíčka. Přestože jednotlivé kroky tohoto maturačního procesu jsou intenzivně studované, nejsou zcela známy, proto práce K. Veselé patří k aktuálním tématům výzkumu.

V předložené práci oceňuji **abstrakt s klíčovými slovy**, který je předřazen vlastnímu úvodu, a který uvede čtenáře do studovaného problému a jasně definuje cíle i výsledky práce. Dále je práce klasicky členěna na úvod s literárním přehledem, následuje část materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr a literatura.

**Cíl práce** je jasně definován:

Na laboratorní myši a dvou druhů myšic, s rozdílnou reprodukční strategií, zjistit relokaci specifických proteinů (IZUMO, CD46 a beta 1 integrinu) v průběhu spontánní nebo indukované akrozomální reakce při kapacitaci *in vitro*.

**Literární přehled** je velice rozsáhlý zahrnuje informace o morfologii spermie, přípravě spermatické buňky na oplození a o proteinech důležitých v procesu oplození. Velká pozornost je věnována kapacitaci a akrozomální reakci, kterým se autorka ve své práci především věnuje. V úvodní části je také podána důležitá informace o reprodukčním chování myšovitých hlodavců a rozdílech mezi jednotlivými druhy. Pozornost je věnována dosud známým informacím o vybraných důležitých proteinech spermie (IZUMO, CD46 a beta1 integrin). Při popisu jednotlivých částí literárního přehledu autorka upozorňuje na mezery v poznání a funkci daných proteinů v průběhu kapacitace a akrozomální reakce. Otázky a nejasnosti zde uvedené směřuje k formulování cílů předložené práce.

V části **materiál a metody**, autorka popisuje materiál použitý v experimentu (použitá zvířata, chemikálie, roztoky, přístroje) a řadu metod, které v práci použila (izolace spermií, kapacitace *in vitro*, indukce akrozomální reakce a metody imunodetekce).

Pro tuto práci byl zásadní výběr biomodelů, to jsou myši a myšice. Myši (BALB/c) představují do jisté míry „kontrolní model“ se standardní detekcí fúzogenního proteinu IZUMO, CD46 proteinu a beta1 integrinu. Důležitý byl výběr dalších dvou modelů myšice (Myšice malooká, Myšice křovinná) s různým stupněm promiskuity, absencí CD46 proteinu a rozdílnou morfologií hlavičky spermie.

**Výsledky**, v soulase se zadaným cílem, pojednávají o relokizaci IZUMO proteinu během kapacitace a spontánní akrozomové reakce, během kapacitace při indukci akrozomové reakce v závislosti na promiskuitním prostředí. Výsledky pojednávají dále o relokizaci beta1 integrinu a lokalizaci CD46 proteinu během spontánní a indukované akrozomální reakce.

Autorka získala řadu významných i překvapivých výsledků. Výsledky jsou diskutované ve vztahu k současně dostupným literárním údajům.

**Závěr** práce je jasně definován.

K dynamickým změnám v lokalizaci fúzogenního proteinu IZUMO a beta1 integrinu dochází v průběhu kapacitace a ne akrozomální reakce. Zdá se, že spermie po spontánní akrozomální reakci vykazují stejný fertilizační potenciál jako spermie s intaktním akrozomem. Spontánní akrozomální reakce, která je u myšovitých daleko vyšší než u myši může tak představovat selekční výhodu vlivem promiskuitního prostředí v rámci vnitrodruhové kompetice myšovitých.

**Literatura** (77 citací) je velice rozsáhlá a svědčí o důkladné přípravě autorky nejen k experimentům, ale i k jejich vyhodnocení.

Předložená práce je srozumitelná po odborné stránce, a je velice úhledně členěná a upravená.

K práci předkládám pár otázek a námětů k diskusi:

1. Na str. 28 a dále, autorka popisuje lokalizaci proteinu CD46 na spermii a jeho možnou funkci na spermii. V somatických buňkách se o CD46 proteinu uvažovalo jako o proteinu imunitního systému chránící buňky před vlastním imunitním systémem. Jeho úloha na spermii je nejasná - nemůže mít stejnou funkci jako na somatických buňkách?
2. Str.32 není uveden zdroj, který poskytl modely Myšice malooké a křovinné – jedná se o chov na fakultě?
3. Str. 41 Tabulka 1. Popis tabulky by měl být nad vlastní tabulkou, z textu je jasné co čísla znamenají, ale v popisu k tabulce není tato informace uvedena.
4. V závěru (str. 52) autorka diskutuje možnost, že spermie hlodavců po spontánní akrozomální reakci vykazují stejný fertilizační potenciál jako spermie s intaktním akrozomem. Tento fakt neplatí u lidských spermii, kdy spermie „po spontánní akrozomové reakci“ (bez akrozomu – hlavně bez akrozomálních proteinů důležitých pro vazbu spermie na vajíčko) neuspějí v procesu oplození. Jak by jste tyto rozdíly vysvětila?
5. Budou výsledky publikované? Statistické vyhodnocení by podpořilo zajímavé výsledky.

Předložená práce má vysokou odbornou úroveň, dokazuje nejen pracovitost kandidátky, její schopnost orientovat se v problematice, použít vhodné metodické přístupy, ale též její schopnost získané výsledky dávat do souvislostí a kriticky vyhodnotit. Předložené výsledky jsou unikátní a podávají zcela nový pohled na maturaci spermií a rozdílné strategické možnosti reprodukce u různých druhů živočichů.

Doporučuji tuto práci k přijetí jako práci diplomovou a hodnotím ji na výbornou.

V Praze 7.9.2012

doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc