

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Terezy Toralové:
“Identifikace genů nezbytně nutných pro normální průběh oplození a
preimplantačního vývoje skotu v podmínkách *in vitro*“**

Předložená práce si klade za cíl nalézt a charakterizovat geny, které jsou nezbytné pro normální preimplantační vývoj. Určení těchto genů a jejich exprese s následnou syntézou proteinů jsou podstatné nejen pro vývoj kvalitního embrya a pochopení embryogeneze, ale i pro optimalizaci kultivačních podmínek *in vitro*.

Jedná se o nový přístup k hodnocení oocytů a embryí, který není závislý jen na morfologickém hodnocení, který se dosud převážně používá jak v laboratořích, tak v asistované reprodukci.

Důležité geny pro preimplantační vývoj jsou identifikovány na základě aktivace jejich exprese z embryonálního genomu. Geny, které se exprimují během embryonální genové aktivace (EGA) jsou nejdůležitější.

Autorka se v předložené práci věnuje expresi dvou genů pravděpodobně důležitých pro preimplantační vývoj (CENPF a nucleofosmin) a genu důležitému pro úspěšnou fertilizaci (UCHL1). Velice stručně, CENPF má úlohu v buněčném dělení, nukleofosmin je multifunkční fosfoprotein a UCHL1 je deubiquitinační enzym.

V předložené práci byly vybrány náročné laboratorní postupy, které Mgr. Toralová zvládla a použila v jednotlivých částech práce pro identifikaci exprese vybraných genů.

Práce je členěná na stručný, ale výstižný literární úvod, charakterizaci nejdůležitějších použitých metod (RNA interference, kvantitativní PCR, nepřímou imunofluorescence), cíle práce, velice užitečné komentáře k předloženým publikacím včetně výsledků a diskuse, závěr, bohatou referenci (180 citací) a přiložené čtyři publikace.

Cíle práce jsou jasně definované:

- . Nalézt kandidátní geny, které bude možné využít jako markery vysokého potenciálu embryí během technik asistované reprodukce
- . Charakterizovat expresi a funkci těchto genů během fertilizace a preimplantačního vývoje u skotu

- . Potvrdit důležitost těchto genů pro správný průběh *in vitro* fertilizace a vývoj embrya

Výsledky jsou v práci diskutovány a stručně shrnuty v závěru.

- Autorka a spolupracovníci potvrdili, že vybrané geny (CENPF a UCHL1) jsou nezbytné oplození a preimplantační vývoj.
- Proteiny CENPF a nukleofosminu mají během embryogeneze zvýšenou stabilitu, nukleofosmin je uchováván až do stádia blastocysty.
- Jadérové proteiny odrážejí tvorbu jadérka
- Pomocí mikročipů bylo nalezeno velké množství kandidátních genů.

K práci předkládám pár otázek a námětů k diskusi:

1. V jednom z cílů práce se autorka zmiňuje o možnosti využít kandidátních genů jako markerů vysokého potenciálu embryí v asistované reprodukci. Jak by jste si takové využití v praxi představovala?
2. Ve výsledcích jste upozornila na fakt, že je rozdíl v genové expresi u embryí získaných *in vivo* a *in vitro*. Jaké faktory mohou tento rozdíl způsobit? Vnější, vnitřní?
3. Použitím hydroláz na inaktivaci UCHL1 vede k vysoké polyspermii. Nedochozí k primární (?) a sekundární (?) inhibici polyspermie, proč?
4. Zmiňujete se o nalezení dalších kandidátních genů (~134), z toho ~97 zajímavých, kolika z nich se budete věnovat a jak bude probíhat jejich výběr?
5. Jaký je osud publikace Tolarova et al., zaslané do *Biology of Reproduction*?

Předložená práce má vysokou vědeckou úroveň, dokazuje nejen pracovitost kandidátky, její schopnost orientovat se v problematice, použít vhodné technické přístupy ale též její schopnost získané poznatky analyzovat a dávat do souvislostí, jak potvrzují přiložené publikace. Práce odráží vysokou úroveň pracoviště a zainteresované vedení školitele.

Předložená práce splňuje všechny náležitosti pro podání dizertační práce, proto ji doporučuji přijmout pro obhajobu doktorské disertace Mgr. Terezy Toralové.

Praze 22.8.2011

Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc