

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

**Oponent: Ing. Michal Jeřeta, Ph.D.**

Předkládaná disertační práce je zpracována na aktuální téma charakteristiky genů významných pro normální preimplantační vývoj. Bližší identifikace genů nezbytných pro fertlizaci a vývoj embryí je důležitá pro pochopení regulačních mechanismů časného embryonálního vývoje a představuje tak cestu jak efektivně optimalizovat kultivační podmínky v prostředí *in vitro*. Tato problematika je významná nejen pro reprodukci hospodářských zvířat, ale dotýká se i humánní sféry. I proto považuji tento typ studií prováděných na bovinních embryích za velmi přínosný. Tato práce je zaměřena na expresi a význam genů významných pro preimplantační vývoj (CENPF a nucleophosmin) a genu UCHL1, který je nezbytný pro správný průběh fertlizace bovinních oocytů.

Cílem této práce bylo nalézt a charakterizovat vhodné kandidátní geny využitelné jako markery vysokého vývojového potenciálu embryí. Předkládaná práce dokládá, že stanovené cíle byly splněny. O vysoké úrovni získaných výsledků svědčí přiložené vědecké publikace disertantky, které byly zveřejněny v prestižních vědeckých časopisech.

Použité metodické postupy jsou velice vhodně zvoleny a navzájem se výborně doplňují. Jako experimentální materiál byla využita embrya získaná *in vitro* fertlizací oocytů izolovaných z vaječníků jatečných krav. Pro studium významu sledovaných genů byla využita metoda RNA interference. V případě genu UCHL1 byla použita inhibice pomocí specifických inhibitorů. Expres proteinů byla následně vyhodnocena pomocí western blotu a imunofluorescence. Pro ověření intenzity degradace proteinů byl použit inhibitor proteosyntézy - Cykloheximid. Při studiu role genu UCHL1 na kortikální reakci byla sledována lokalizace kortikálních granul. Rozdílná exprese genů mezi *in vivo* a *in vitro* embryi byla charakterizována pomocí qRT-PCR.

Cíle práce jsou definovány výstižně a vhodně reagují na vyslovené hypotézy. Výsledky jsou přehledně zpracovány. Použité metodické přístupy považuji za dobře zvolené a adekvátní stanoveným cílům.

Úvodní část je velice hezky zpracována a disertantka cituje v textu více než 170 vědeckých publikací. Po formální stránce je práce na velice dobré úrovni. Práce je vhodně

doplněna o komentáře k publikacím a seznam použitých zkratk. Závěry jsou výstižné a zodpovídají na teze stanovené v úvodu práce.

Prezentované výsledky považuji za velice kvalitní a významné. Důkazem jsou úspěšná oponentní řízení v redakcích vynikajících vědeckých časopisů.

K autorce mám tyto dotazy a připomínky:

- 1) V práci Susor et al. 2010, jste sledovali vývoj embryí po partenogenetické aktivaci ionomycinem v přítomnosti inhibitoru C30. Prezentované výsledky podporují teorii, že UCHL1 je významný pro průběh kortikální reakce. Jaký však byl procentuální podíl embryí, která se vyvíjela až do stádia blastocysty, vycházíme-li z celkového počtu oocytů vystavených účinkům ionomycinu?
- 2) Jaká byla úspěšnost *in vitro* zrání při použití inhibitorů C16 a C30? Byla použita koncentrace 20 $\mu$ M dostatečně účinná na bovinní oocyty?
- 3) Z práce Vodickova et al. 2011, jsou patrné výrazné rozdíly v expresi šesti vybraných genů při kultivaci embryí ve dvou různých kultivačních médiích. Jsou to velice zajímavé výsledky. Jak si tento stav vysvětlujete? Do jaké míry si myslíte, že může složení kultivačního média ovlivnit expresi ostatních genů nezbytných pro úspěšný embryonální vývoj? Myslíte si, že by se v případě použití média Menezo výrazně lišila exprese genů CENPF a nukleofosminu?

#### **Závěr:**

Práce přináší nové významné poznatky a autorka prokázala schopnost vědecky pracovat. Práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci v tomto oboru a vzorně reprezentuje nejen autora, ale i laboratoř školitele. Souhlasím, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení aby byl Mgr. Tereze Toralové udělen titul PhD.

V Brně dne 15. července 2011

Ing. Michal Jeřeta, PhD.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i.