

STUDIUM VAZBY SPERMIE NA OVIDUKTÁLNÍ EPITEL PRASNICE

Reprodukce je velmi komplexní proces počínající vývojem gamet a končící jejich splynutím a vznikem nového jedince. Aby došlo k setkání spermie s vajíčkem ve správnou dobu a na správném místě, musí být tato událost velmi přesně načasována. Jakmile se spermie dostanou do samičího pohlavního traktu, jsou zachyceny v istmické části oviduktu. V tomto rezervoáru mohou být spermie uskladněny až několik dní a vyčkávají na impuls daný ovulujícím oocytem. Princip zachycení spermií v oviduktu je založen na interakci povrchových proteinů spermie se sacharidovými řetězci přítomnými na povrchu buněk epitelu.

Diplomová práce Evy Hanzlíkové je zaměřena na podstatu interakcí povrchových proteinů spermie (pocházejících ze semenné plasmy) s komponentami oviduktální tekutiny u prasete a vlivu oligosacharidových řetězců glykoproteinů přítomných v oviduktální tekutině na tuto interakci. Literární úvod obsahuje popis samičího i samičího urogenitálního traktu prasat, stavbu gamet, úlohu rezervoáru spermií a proces fertilizace. Následují dosud publikované poznatky o proteinech semenné plasmy, o složení oviduktální tekutiny a interakcích proteinů kančí semenné plasmy s epitelem a tekutinou oviduktu.

Kapitola Materiál a Metody je celkem přehledně rozčleněna do podkapitol týkajících se separačních a analytických metod, modifikace proteinů a studia proteinových interakcí. Bohužel zde zcela postrádám metodiku pro fluorescenční mikroskopii (kap. 3.6) a popis vlivu autolýzy proteinů oviduktální tekutiny na vazbu s proteiny kančí semenné plasmy (kap. 3.11).

Výsledky jsou shrnuty do několika grafů, tabulek a obrázků.

K práci bych měla několik formálních i věcných připomínek a dotazů:

Úvod

latinský název druhu psát kurzívou, pokud jsou používány latinské názvy *zona pellucida* (str. 12), *cauda epididymis* (str. 4) – tak by se neměly skloňovat, není ujednoceno

špatné odkazy na strany u obrázků v textu

dochází k tvorbě rezervoáru spermií, který napomáhá ke zvýšení úspěšnosti páření (str. 3) – spíše úspěšnosti oplodnění

oploďná vajíčka se vyvíjí až do narození (str. 3) – použila bych výrazu embrya

odkaz na kap. 1.1.3 (str. 3) za větou *vytváření zátky ze sekretů Cowperových žláz* je chybný (ta se týká pohlavního cyklu samice)

kteří jiné pohlavní hormony se tvoří ve varlatech než testosteron? (str. 4)

obr. 2b – *epididymis x epididymidis* (jednotné x množné číslo)

cumulus oophorus - není obal vajíčka, shluk kumulárních buněk folikulu okolo vajíčka

obr. 4b – *mitochondrie lokalizovány na bičíku* – přesněji v bičíku

popis hustoty náboje na povrchu spermie (str. 9) – nevyplývá z něj, k čemu je důležitý, upřednostnila bych popis složení epididymální tekutiny

tvrzení, že *na povrch se asociuje především AWN spermadhesin* je trochu zavádějící a neodpovídá citaci [20] Ekhlasi (2005), která je mimo jiné uváděna ještě pod číslem [66]

změna modelu pohybu bičíku – spíše charakteru (str. 11)

tvrzení *uchytí se pomocí receptorů typu integrinů a nejen jich* (str. 12) se mi zdá dost nekonkrétní
název kap. 1.4.1 Složení (viz. tab. 1) – odkaz na tabulku bych do názvu nedávala – navrhuji jiný název

Proteiny semenné plasmy

(str. 13) cit. [36] Maňásková 2002 se týká proteinů prostaty, ne semenné plasmy

upřednostnila bych zkratku heparin vázajících a nevážajících proteinů H^+ a H^- psát s horním indexem PSP nemají $M_r = 14\ 000$, ale v rozmezí 12-17 000 a určitě se nejedná o cit. Maňásková 2002 (opět proteiny prostaty)

cit. [38] Maňásková 1999 nevystihuje přesně, co je napsáno, uvedla bych citaci Jonáková 1998 [39]

skupina glykoproteinů, které mají schopnost vázat zona pellucida jsou identické se spermadhesiny Parry 1992

β -microseminoprotein není exprimován v testes, zatím byl prokázán pouze v prostatě, v cit. [42] o tom není rozhodně zmínka

cit. [43] Jeng 2001 se netýká arylsulfatasy, ale β -microseminoproteinu, má být uvedena cit. [44]

Gadella 1993, ta je uvedena nesprávně na str. 14 u agregovaných forem proteinů semenné plasmy citace [37, 44] u agregovaných forem jsou špatné, měly být Maňásková 1999 a 2000

a u interakcí ne Maňásková 2000 [45], ale Maňásková 2003 (vzájemné interakce mezi proteiny kančí semenné plasmy)

u interakcí s kyselými polysacharidy je opět špatná citace [37] Maňásková 2002 (proteiny prostaty), stejně tak interakce se ZP nemá být Maňásková 2003, ale Maňásková 1999 nebo 2000

citace se nemusí opakovat za každou větou, pokud jsou ze stejného zdroje, ale stačí až na konci odstavce

DQH protein není spermadhesin

str. 15, tabulka 2 – v popisu jsou SPI a protein X, které vůbec v tabulce nefigurují

odkaz na tabulku by měl být v textu, ne v názvu kapitoly

mělo by zaznít, že proteiny semenné plasmy se váží na povrch spermie při ejakulaci, z toho vyplývá, že jsou povrchovými proteiny spermie a mohou se účastnit dalších kroků reprodukce, jako je např.

tvorba rezervoáru spermií v oviduktu, tedy interakce s glykoproteiny přítomnými v tekutině nebo na povrchu epiteliálních buněk oviduktu

proč autorka používá množného čísla *oviduktální tekutiny*?

mannan x manosa

postrádám vysvětlení zkratky WGA v textu a PSM a BSM v popisu tabulky

co znamená věta (str. 18) *Obě frakce kančí semenné plasmy v oviduktálních tekutinách reagují především s glykoproteiny?*

v cíli práce bych nepoužívala zkratku POT, která navíc není definována

Metody

ocenila bych princip metod

zcela chybí metodika k fluorescenční mikroskopii a sledování změny vazby POT a proteinů KSP při autolýze

podářilo se dostatečně rozpustit proteiny KSP a oviduktální tekutiny v destilované vodě?

pokožová teplota – spíše laboratorní

pro centrifugaci 500 g kurzívou nebo x g

používala bych spíše byla získána než *získala se*

elektroforeza x elektroforesa (sjednotit), správně elektroforéza nebo elektroforesa

Výsledky

kap. 3.1 – Proč byl použit jako navazovací pufr pro afinitní chromatografii 0,2 M NH_4HCO_3 ? Proč ne PBS? Jaké bylo pH pufru?

Proč graf 1 (průběh afinitní chromatografie) nezačíná v nule? Jaký byl v tom případě referenční roztok, proti kterému byly hodnoty ukazující průběh chromatografie naměřeny? v popisu grafu by měly být znovu vysvětleny použité zkratky

kap. 3.2 – sjednotit *SDS-elektroforesa* nebo bez pomlčky

v popisu obr. 6 bych nepoužívala výraz *nános* pro nanesené množství proteinu, standard ne *standart* v obr. 6C chybí dráha 2

posunutě šipky s hodnotami Mr standardů – zavádějící, u B a C chybí a standardy nejsou vidět

připadá mi podivné pokud barvení Coomassie blue ukazuje na degradaci proteinů OT (6A, 3 a 6) po chemické deglykosylaci, tak naopak proteiny obarvené stříbrem se zdají být nedegradovány (6B, 2), předpokládám, že jde o chybu v popisu obrázku

obrázek není v textu řádně vysvětlen (viz dráha...), skutečně má majoritní protein Mr 65 000?

autorka píše, že *celkovou chemickou deglykosylaci nebereme v potaz, protože i přes opakované pokusy docházelo k degradaci*, což je vidět na obr. 6A (3 a 6), ale na obr. 6B (2) se to tak již nejeví a překvapuje mne, že přesto v dalších pokusech (studium vazby POT na KSP, **kap.3.5 a 3.8**) byly použity takto deglykosylované biotinem značené proteiny

kap. 3.3 – obr. 7 (str. 36) je stejný jako polovina obr. 6 (str. 34) a je vysvětlován dvakrát na různých místech

jak si autorka vysvětluje vymizení proužků u POT po chemické desialyzaci po barvení na glykoproteiny, když sialové kyseliny jsou na koncích oligosacharidových řetězců, a tudíž po odstranění pouze těchto koncových sacharidů (Sia) by měla zbylá část oligosacharidového řetězce glykoproteinu být barvitelná touto metodou?

kap. 3.4 (str. 35) chybí tabulka 8, na kterou je odkaz v textu, proč autorka použila metodu pro určení množství sialových kyselin, při které dochází ke spolustanovení i dalších monosacharidů a tedy zavádějícím hodnotám?

kap. 3.5 (str. 37) název *Identifikace agens odpovědného za vazbu spermie na ovidukální tekutiny* naprosto nevystihuje výsledky popsané v této kapitole, nehledě na slovo *agens*, kterému tak úplně nerozumím

nepoužila bych výraz *účastník interakce*

věť *Proteiny KSP tedy pravděpodobně zprostředkovávají rozpoznávací funkci, k níž je zapotřebí nedenaturovaná struktura* zcela nerozumím, je logické, že pro interakci *in vivo* je taková struktura nutností, není možné, že se ztrácí vazebná schopnost proteinů KSP po SDS-PAGE k POT z toho důvodu, že tyto proteiny by mohly mít větší afinitu k POT ve svých agregovaných formách, ve kterých se přirozeně vyskytují?

v obr. 8 je špatný název, nejedná se o elektroforeticky rozdělené proteiny KSP, ale POT v textu je popsáno, že vazba H^+ proteinů s POT je silnější (obr. 8B, 1) než H^- proteinů (obr. 8A, 1), což se mi z obrázku nejeví, na obr. 8A (1) je viditelný proužek okolo 42 000 a druhý pravděpodobně v oblasti 65 000 (nejsou mol. hm. standardů), na rozdíl od obr. 8B, kde je pouze téměř neviditelná šmouha; také barvení proteinů OT na membráně pomocí Ponceau se mi zdá nedostatečné (obr. 8C) myslím, že se jedná o poměrně slabé vazby mezi POT a proteiny KSP, byl použit substrát pro Px chlornaftol, který myslím není dostatečně citlivý a doporučila bych použití např. substrátu TMB nebo metody chemiluminiscence

uvítala bych kontrolu biotinem značených proteinů, které byly použity, rozdělených SDS-PAGE a přenesených na NC- membránu pomocí avidin-Px

použity biotinem značené deglykosylované POT, které se jeví jako degradované (obr. 6, str. 34)

kap. 3.6 lokalizace – chybí metodika, šlo o ejakulované kančí spermie? Proč byl použit derivát FITC pro POT a RITC pro proteiny KSP? Rozpustily se při přípravě FITC a RITC derivátů proteiny KSP a POT v pufru o pH 8,5? Byla vazba prováděna najednou, postupně nebo zvlášť a v suspenzi? Byla provedena nějaká negativní kontrola?

podle obrázku se mi popis v textu nejeví zcela správný nebo jsou obrázky přehozeny, podle mého názoru se proteiny KSP (pokud jde opravdu o obrázek vlevo) vážou do postakrosomální oblasti hlavičky a střední části bičíku (nepoužívala bych angl. termínu middle piece), zatímco POT se vážou do oblasti akrosomu a střední části bičíku

kap. 3.7 – graf 2 – co znamená *pozadí*? vazba s avidin-Px?

z výsledků zcela nevyplývá jaký *blokátor* (lépe řečeno desaktivací činidlo) byl vybrán pro další studium metodou ELBA, podle metodik jde pravděpodobně o BSA, i když s ním biotinylované POT slabě reagují a nejlépe se mi jeví rybí želatina

kap. 3.8 – graf 3 – co znamená pojem *neovlivněná vazba*? Je tím myšlena vazba nativních POT s proteiny KSP? Jaký je rozdíl v síle vazby mezi POT a proteiny KSP u H^+ a H^- frakce podle metody ELBA? Opět použity biotinem značené deglykosylované POT, které se jeví degradované (obr. 6, str. 34)

kap. 3.9 – graf 4 – opět co znamená *neovlivněná vazba*?

kap. 3.10 – v textu *časová závislost vazby deglykosylovaných POT s proteiny KSP* předpokládám, že má autorka spíše na mysli závislost vazby na době (tedy míře) deglykosylace

grafy 5, 6, 7, 8, 9 – měla by být uvedena také hodnota v čase nula jako 100% vazby, proč je kontrola (6) nižší než vazba ovlivněná deglykosylacemi? popis osy y poněkud zavádějící %vazby neupravených POT s KSP

kap. 3.11 – nesjednoceno *autolýza* x *autolysa*, chybí metodika pro přehlednost lepší popis grafu 9 v textu (např. viz křivka ...), čára x křivka z výsledku studia vlivu autolýzy POT na vazbu s proteiny KSP vyplývá, že všechny předcházející vazebné testy by měly být prováděny během velmi krátké doby (% vazby se snižuje téměř okamžitě) nebo v přítomnosti inhibitorů proteinas, aby nedocházelo k autolýze POT

Diskuse

bylo by jasnější, pokud by autorka zdůraznila, že PNGasa F odštěpuje N-vázané oligosacharidové řetězce z glykoproteinů

nerozumím odkazu na **kap. 3.6** (Topologická lokalizace na spermiích) v tvrzení, že *Mimo jiné odstranění sialových kyselin vede k výraznému snížení interakce i s jinými proteiny než jen s KSP.*

Jak si autorka vysvětluje rozdílnou vazbu proteinů oviduktální tekutiny a proteinů KSP na spermii, jaké závěry by z toho vyvodila?

Vedle množství překlepů a dokonce i gramatických chyb, které by se neměly v odborném textu vůbec objevit, se zde vyskytují také další formální chyby (různá velikost písma, odsazení odstavce, nejednotná úprava citací v seznamu literatury,...).

Seznam mých připomínek a dotazů je poněkud obsáhlý. Přesto si myslím, že diplomová práce Evy Hanzlíkové má zajímavou myšlenku a základ, který byl nastíněn v diskusi a týká se inhibičního mechanismu tvorby rezervoáru spermií v oviduktu pomocí oviduktální tekutiny, vlivu jednotlivých sacharidů v postranních řetězcích glykoproteinů v ní přítomných a také regulace vazby spermií na oviduktální epitel zprostředkované proteolytickou aktivitou. Bohužel mám pocit, že autorka nevěnovala dostatečnou pozornost nejen sepsanému textu, ale i uspořádání a interpretaci svých experimentů a výsledků. Přes všechny mé výtky, si myslím, že diplomová práce Evy Hanzlíkové může být předložena k obhajobě.

V Praze 17.5.2007

RNDr. Pavla Maňásková, PhD.