

## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI HELENY LÍBALOVÉ "LOKALIZACE A CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH PROTEINŮ SAVČÍCH SPERMIÍ POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK NA INTAKTNÍCH A DEMEMBRANIZOVANÝCH SPERMIÍCH"

Helena Líbalová zpracovala v teoretickém úvodu podrobně stavbu spermie jak hlavičky, tak i bičíku, pohyb bičíku, energetický metabolismus pohybu bičíku, demembranizaci a reaktivaci spermií a monoklonální protilátky. Literární úvod je sepsán výstižně k danému tématu doplněn sedmi obrázky i nejnovějšími citacemi.

Cíl práce byl jasně stanoven:

Zavedení metody demembranizace a reaktivace savčích spermií jako nástroje pro studium motility. Detekce vybraných proteinů savčích spermií pomocí připravených monoklonálních protilátek na intaktních a demembranizovaných spermiích. Využit novou monoklonální protilátku Hs-23 k charakterizaci odpovídajícího detekovaného proteinu na kančích i lidských spermiích. V závěru práce, ze souhrnu výsledků, jasně vyplývá, že cíle, které si autorka vytkla byly splněny.

V diplomové práci si osvojila metody na zpracování spermií, semenné plasmu, extrakce, demembranizace a reaktivace spermií, přípravu preparátů pro imunofluorescenci, zvládla různé biochemické, chromatografické a analytické metody, jako afinitní chromatografii na G-protein Sepharose, SDS- a 2D SDS-elektroforesu, Western blot a imunodetekci proteinů pomocí monoklonálních protilátek.

Získala výsledky lokalizace proteinů imunofluorescenčním značením proteinů pomocí monoklonálních protilátek Hs-8, Hs-14, Hs-23 a ACR 2 na intaktních a demembranizovaných kančích spermiích. Přečištěná protilátka Hs-23 imunofluorescenčně značila intaktní lidské spermie i JAR buňky.

Jednorozměrnou i dvojrozměrnou SDS elektroforesou a imunodetekcí s protilátkou Hs-23 označila v extraktu lidských spermií 50 kDa protein s pI 7, který pomocí MALDI byl stanoven jako enolasa 1. Výsledky jsou prezentovány přehledně ve 14ti obrázcích, 2 grafech a 4 tabulkách.

V diskusi jsou dosažené výsledky podrobně analyzovány a jsou z nich naznačeny seriózní závěry.


Diplomová práce je kvalitní, přehledná a logicky seřazená.

K práci mám několik dotazů a připomínek:

- 1) Extrakce spermií (SDS, Triton, Urea)-postupy dle koho, citace, proč nejsou přidávány inhibitory proteas?
- 2) str.25 Zpracování semenné plasmu, týká se jen lidské nebo i kančí? Proč semenná plasma ponechána do druhého dne při 4°C?
- 3) str.28. Příprava JAR buněk - RPMI medium, FCS, popsat zkratky
- 4) str.44. Obr. 3.5. přehozeno označení frakce 2 ve sloupcích 2 a 3.
- 5) poprvé užití označení p<sub>Hs-23</sub> není vysvětleno
- 6) str.51. Obr.3.11, popis 1-ureový extrakt lidských nebo kančích spermií?
- 7) Diskuse- str.57. má autorka i jiné pokusy, vysvětlení pro názor, že "Akrosin je volně lokalizován v akrosomu a po akrosomové reakci indukované demembranizačním roztokem se vylévá z akrosomu".

Moje dotazy a připomínky nesnižují výsledky, které získala Helena Líbalová, které pečlivě zpracovala a napsala kvalitní diplomovou práci. Hodnotím ji jako výbornou.

V Praze 18. 5. 2007



Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.