

**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Tomáše Drába:
“Studie tekutin a sekretů z reprodukčních traktů prasete (*Sus scrofa f. domestica*) a
skotu (*Bos primigenius f. taurus*)“**

Autor vypracoval svou disertační práci pod vedením RNDr. Jiřího Liberdy Ph.D., na Přírodovědecké fakultě University Karlovy na katedře biochemie.

Molekulární mechanizmy oplození savců zahrnující interakce spermie-vajíčko a intracelulární i extracelulární změny probíhající v obou gametách jsou stále předmětem studia. Aby k oplození došlo, prochází spermie v samičím oviduktu řadou biochemických změn a funkčních modifikací jakými jsou např. maturace, kapacitace, vazba spermie k *zona pellucida* (ZP) vajíčka, akrozomální reakce (AR), průchod spermie přes ZP, fúze spermie s oolemou vajíčka atd.

Práce je sestavena v souladu se zákonem ze souboru publikovaných prací disertanta. Ten je doprovázen úvodem, kde autor popisuje v kapitole 1.1 s názvem “Savčí fertilizace“ maturaci gamet, biologii a biochemii samčích gamet; kapacitaci spermie; vazbu spermie s vajíčkem a akrozomální reakci a fúzi gamet; tekutiny samičího reprodukčního traktu (folikulární, oviduktální, uterinální); glykoproteiny a glykosylace v savčí reprodukci. V kapitole 1.2 popisuje imunitní systém v samičím reprodukčním traktu a v kapitole 1.3 metody elektroseparace proteinů;

Literární přehled je doprovázen obrázky, schematicky, 321 citacemi a poskytuje současný a ucelený pohled na danou problematiku.

Cílem práce bylo rozšířit znalosti o tekutinách a sekretech ze samičích a samčích reprodukčních traktů, hlavní zaměření bylo na protein-sacharidové interakce, které jsou důležité ve více krocích v reprodukci. Byly uvedeny čtyři dílčí cíle:

1. Vyhodnocení aktivit glykosidas ve folikulární tekutině (FF) jejich charakterizace a navržení možné úlohy v reprodukci.
2. Vyvinutí elektroseparační metody vhodné pro detekci glykosidas a dalších enzymů v biologických tekutinách a sekretech účastnících se reprodukce.
3. Porovnání antimikrobiálních vlastností tekutin z folikulu, oviduktu a dělohy spojené s identifikací látek, které jsou za ně zodpovědné.
4. Porovnání vlastností sekretů Cowperových žláz u býka a kance, jejich role v reprodukci a interakci se samičím reprodukčním traktem.

Experimentální část práce, je provedena adekvátními metodami. Výběr metod odpovídá studovanému problému a praktické zvládnutí svědčí o dobrých experimentálních schopnostech autora

V souladu s cíli přinesla disertace tyto poznatky:

1. Charakterizace aktivit pěti glykosidas v tekutinách z terciálního a preovulačního folikulu a krevní plasmě u prasnice a krávy ukázala rozdíly jak mezidruhové, tak i rozdíly dané maturačním stádiem folikulu. α -L-fukosidasa byla neaktivnější v kravské FF při neutrálním pH, zatímco α -D-manosidasa zase v prasečí. Napodobení maturace prasečí zony pellucidy (ZP) inkubací s glykosidasami (α -D-manosidasa a α -D-galaktosidasa) ukázala jejich negativní vliv na vazbu ZP s povrchovými proteiny spermie AQN a AWN spermadhesiny. Srovnání aktivit glykosidas ve folikulární tekutině (FF) a v krevní plasmě ukázalo, že bez ohledu na maturační stav folikulu aktivity studovaných glykosidas jsou výrazně vyšší ve FF než v krevní plasmě (dvě práce připravené k publikaci).
2. Vyvinuli a optimalizovali nový typ nativní elektroforézy nazvaný “červená nativní elektroforesa“, která umožňuje separaci proteinů a jejich komplexů dle molekulových hmotností a zároveň pak následnou vizualizaci enzymatických aktivit přímo v gelu. Tuto

metodu použili pro porovnání glykosidasových aktivit v prasečí FF a krevní plasmě. (Electrophoresis 32, 3597-9, 2011; J Sep Sci 34, 1692-5, 2011).

3. Porovnání antimikrobiálních aktivit folikulární, oviduktální a děložní tekutiny ukázalo, že u obou druhů je nejefektivnější oviduktální tekutina. Antimikrobiální aktivita z kravských reprodukčních traktů se vyskytuje v nízkých molekulových hmotnostech do 30 000. Pomocí SDS elektroforézy následované MALDI-TOF byly identifikovány jako nízkomolekulární proteiny s antimikrobiální aktivitou histony H2A typ 2-C, H2B typ 1-K, H3.3 a H4. Role histonů jako antimikrobiální látky byla potvrzena pomocí polyklonální protilátky proti histonu H2B. (BBRC 443, 987-90, 2014).

Vytčené cíle byly splněny a získané výsledky jsou uvedeny ve třech publikacích, ve čtyřech rukopisech připravených pro publikace, dále jsou zde uvedeny výsledky nezahrnuté do publikací. Všechny uvedené výsledky jsou v disertaci rozebírány a diskutovány. Autor v anglickém a českém autoreferátu stručně shrnuje dosažené výsledky.

K disertaci mám minimum připomínek a dotazů:

Formální připomínky:

Práce je sepsána pečlivě, anglicky, s minimálním počtem překlepů.

Str. 35 Isolace AQN a AWN spermadhesinů, které jste dostal darem byla provedena podle jiné publikace než uvádíte v disertaci. Jonáková et al. FEBS Letters 280, 183-186 (1991); Jonáková et al. J. Reprod Fertil. 144, 25-34 (1998).

Str. 56 u citace [1] je uveden rok 2008, ale v referencích rok 2006.

Dotazy:

1. Antimikrobiální aktivitu jste určili u histonů H2A, H2B, H3.3 a H4. V diskusi na str. 61 uvádíte, že jiní autoři antimikrobiální aktivitu spojují s histonem H1. K identifikaci typů histonových molekul jste použili metodiku MALDI-TOF. Můžete ukázat, které peptidové úseky z histonů H2A, H2B, H3.3 a H4 posloužily k jejich identifikaci? Zkusili jste porovnat tyto úseky se strukturou histonu H1? Je známo, která část struktury histonů odpovídá za jejich antimikrobiální aktivitu?

2. O funkci histonů v buňce, v jádře v souvislosti s DNA je hodně známo. Zajímala by mě, ale otázka jak jsou histony transportovány z buňky ven?

Výsledky dosažené Mgr. Tomášem Drábem představují hodnotný vědecký přínos, který má význam pro rozvoj výzkumu v oblasti reprodukční biologie a biochemie.

Závěr: Mgr. Tomáš Dráb prokázal schopnost tvůrčí vědecké práce, osvojil si hluboké teoretické i metodické znalosti, splnil vědecký úkol, jímž byl pověřen. Podkladem disertační práce jsou tři publikace v časopisech s IF, kde ve všech (BBRC 2014; Electrophoresis 2011; J Sep Sci 2011) je prvním autorem. Další výsledky uváděné v disertaci jsou připraveny k publikování.

Doporučuji, aby disertační práce Mgr. Tomáše Drába byla přijata k obhajobě a stala se základem k udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze dne 10. června 2014

Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i
Laboratoř reprodukční biologie