

Posudek oponenta na diplomovou práci Niny Davidové, na téma: Studium proteinů inhibitorů proteinas samčího reprodukčního traktu.

Diplomová práce Niny Davidové působí uceleným dojmem, je členěna do jednotlivých kapitol dle standardního postupu.

Literární úvod je velice přehledný a kromě klasických prací zahrnuje i práce s novými současnými poznatky.

Cíl práce je jasně formulovaný, separace a charakterizace proteinů epididymální tekutiny a určení výskytu inhibitorů proteinas v kančím reprodukčním traktu.

Metodická část zahrnuje jak biochemické, tak biologické metody, včetně detekce genu pro inhibitor akrosinu kančí semenné plasmy (INH) v různých tkáních.

Výsledky jsou jasně popsány a dokumentované ve formě obrázků. Diskuse je zasvěcená a jednotlivé výsledky jsou diskutovány v rámci současných znalostí. Literatura (93 citací) je velice bohatá a svědčí o dobré orientaci diplomantky v daném tématu.

Proteinasy a jejich inhibitory mají v buňkách důležitou úlohu nejen pro jejich stabilitu, ale i funkční děje, které v nich probíhají. Speciální úlohu mají vybrané proteinasy a jejich inhibitory v reprodukčním traktu.

Autorka určila 4 frakce z epididymální tekutiny, ve dvou určila proteolytickou aktivitu serinovým proteinas v oblasti 30 000-40 000 kDa a metaloproteinasy v oblasti okolo 60 000). Vzhledem k tomu, že tyto proteinasy byly popsány především v semenné plasmě, jedná se o cenný výsledek. Další dvě frakce vykazovaly naopak inhibiční aktivitu pro serinové proteinasy trypsinového typu (včetně akrosinu). Inhibitor akrosinu byl prokázán na reprodukčních orgánech pomocí polyklonální protilátky. Dále byla testována exprese genu pro daný inhibitor v reprodukčních orgánech.

Formální připomínky:

- 1.1.4. změna formulace:...“vně samčího pohlavního traktu“
- Str.60, Obr. 3.22, nejedná se o „imunofluorescenci sekundární protilátky proti králičímu Ig konjugované s FITC“ – taková protilátka by neměla nic značit.

Lépe:

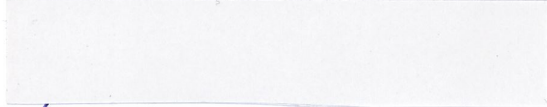
Imunofluorescence inhibitoru akrosinu (INH) na různých tkáních (testes, cauda epididymis, prostata, semenné vaky) pomocí polyklonální protilátky (anti-INH). INH, zeleně (FITC), jádra buněk, modře (DAPI).

Otázky do diskuse:

1. Na str. 12: 1.1.6. je uvedeno, že funkce ovidukálního reservoáru je oddálení kapacity a tím synchronizace s ovulací vajíčka, dále zabránění polyspermie. Jakým způsobem je zabráněno polyspermii?
2. Na téže straně (12), 1.1.7. Kapacitace.....Tyto změny jsou reversibilní ... jak si autorka představuje tento proces?
3. Str.52, dělení frakcí EF3 pomocí RP HPLC (Obr. 3.10) a SDS PAGE frakcí EF3 (Obr. 3.11), výsledky znamenají, že frakce 5 – 8 jsou stejné?
4. Jakým způsobem byla připravena polyklonální protilátka proti inhibitoru akrosinu (není v textu popsán) – (Str. 60)?

5. Zajímavá je diskuse o možné „ochranné úloze“ inhibitoru akrosinu na ejakulovaných spermích, před proteolytickým štěpením akrosinu předčasně uvolněného z poškozených spermích.
Na jakém modelu by se mohla (alespoň částečně) tato úloha otestovat?
6. Budou výsledky dotaženy do publikace?

Na závěr bych chtěla vyjádřit, že diplomová práce Niny Davidové předkládá řadu zajímavých poznatků ve studiu inhibitorů protinas samčího reprodukčního traktu a přispívá tak k pochopení složitého procesu přípravy spermíí na vazbu s vajíčkem. Doporučuji tuto práci k přijetí jako práci diplomovou a hodnotím ji na výbornou.


Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc

V Praze, dne 20. května 2007