

## Oponentský posudek na disertační práci

**Název práce:** Identifikace inhibitorů proteáz

**Autor:** Ing. Lenka Hanusová

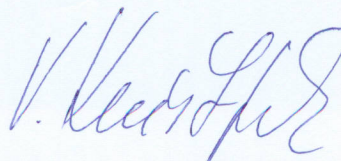
**Oponent:** Ing. Václav Krišťůfek, CSc.

### Hodnocení práce

Název vystihuje dobře obsah práce, je věcný a stručný. Literární přehled je logicky členěný, vztahuje se k zadané problematice a obsahuje kritické hodnocení použitých informací. Cíle a hypotézy jsou jasně formulované. Materiál a metody jsou dostatečně a přehledně popsány. Pokusy byly logicky uspořádané. V kapitole 4.1.1. Popis vybraných odrůd a v Příloze není uveden přesně zdroj údajů o rodokmenech odrůd. Výsledky odpovídají použitým metodikám a jsou přehledně prezentované formou grafů a tabulek. Výsledky se zbytečně neopakují. Interpretace dat je dostatečná a odpovídá rozsahu dat a je podložena dostatečným množstvím literárních údajů. Práce má jasné a jednoznačné závěry, které jsou podloženy daty. Zde je na místě, aby autorka naznačila možnosti chemického složení vhodného elučního pufru pro komerční účely. Použitá literatura je v odpovídajícím rozsahu a je citována bez formálních chyb, jednotně dle norem. Prosím o vysvětlení proč není citována práce autorky ve vědeckém časopise s IF (Chemické listy 101 (7), 536-541). Formální stránka práce je bez výrazných nedostatků. Text je srozumitelný i když ne vždy gramaticky správný. Jedno přečtení práce autorkou navíc by věci jistě prospělo.

Práce se mi líbí a nemám žádných zásadních výhrad či komentářů. Práci pokládám za zdařilou.

Práce splňuje požadavky kladené na disertační práce předkládané na ZF JU a proto ji doporučuji k obhajobě a po úspěšné obhajobě souhlasím s udělením akademického titulu doktor.



Ing. Václav Krišťůfek, CSc.

5.6. 2008



## Oponentský posudek disertační práce

Doktorand: **Ing. Lenka Hanusová**  
Název práce: Identifikace inhibitorů proteáz

Školitel: Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Práce předložena na: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta,

Disertační práce se zabývá problémem významným z hlediska vědního, který by mohl najít také praktické uplatnění m.j. při laboratorní kontrole. Téma poskytuje disertantovi široký prostor pro prokázání nabytých teoretických znalostí, získaných laboratorních dovedností a odpovídající prezentaci na očekávané vědecké úrovni. Výběr tématu proto považuji za zdařilý počin.

Práce obsahuje 72 stran textu a 18 černobílých příloh, pevně spojených v celoplátěné vazbě. Grafická znázornění naměřených hodnot s vyznačením statistického vyhodnocení, a tabulky s číselnými podklady, jsou vřazeny na příslušných místech do textu. Práce se přidržela struktury členění obvyklé u vědeckých publikací. Její celkový rozsah vzhledem k obsahu i formě prezentace považuji za přiměřený, přičemž vlastní práce představuje 2/3 celkového rozsahu. Vyjadřování lze označit adjektivem výstižné a srozumitelné, po gramatické stránce bez větších připomínek. Formální stránka prezentace je přijatelná.

Zpracování disertační práce je zaměřeno výhradně na okruh otázek vymezený názvem, s výhradním zaměřením na bramborové hlízy. Po stručném úvodu je předložen Literární přehled k problematice chemického složení hlízy, role inhibitorů proteáz (PI's) v rostlině, možnosti využití PI's v lékařství a zvláště k metodám detekce.

Připomínky: Kladně hodnotím snahu oprostít kapitolu od zabíhání do přílišné šíře a jít raději do hloubky problému. Proč se tu přesto vzpomínají perspektivy využití PI's v lékařství, které s vlastním řešením – ač tématicky nesporně velmi zajímavé – mají málo společného?

1. Když už se tedy disertantka přece jen rozhodla pojednat o PI's v kladném smyslu, proč se opomíjí jejich jednoznačně negativní působení ve fyziologii trávení, např. u hospodářských zvířat s řadou závažných praktických konsekvencí? Odkaz na ně lze nalézt snad v každé tuctové učebnici výživy!

*Z hlediska výživy zvířat se jedná o antinutriční látky v krmivech, neboť PI's vytvářejí s proteolytickými enzymy značně stabilní komplexy, které však už ztratily enzymovou aktivitu. Tím se snižuje využití dusíkatých látek (NL) v těle zvířete a nestávené NL představují pro životní prostředí navýšení zátěže. (cf. např.: Kalač, P. – Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI Praha, 1997, 317 s.)*

2. V kap. 2.3.1.2. (str. 19) mohlo být řečeno, že v hlízách se PI's nacházejí zejména v kortexu v oblasti klíčku. Slouží jako zásobní bílkoviny v období klíčení.

Cíle práce jsou formulovány v souladu s názvem disertační práce, a sice ve třech bodech (str. 25). Pracovní hypotéza není formulována.

;  
Kapitola Materiál a Metodika je zpracována přehledně, výstižně a vyhovuje obecné premise, aby podle ní bylo možno pokus včetně měření případně zopakovat.



Kapitola Výsledky patří k nejlepším v celé práci. Je zpracována takovým způsobem, aby bylo zřejmé, že naplnění stanovených cílů bylo dosaženo. Lze potvrdit, že se to disertantce podařilo.

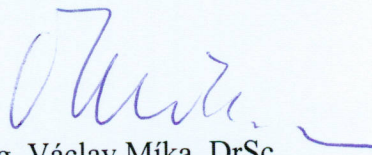
Kapitola Diskuse je členěna vhodným způsobem podle výše uvedených cílů, což usnadňuje orientaci. Jsou v ní (1) konfrontovány vlastní nálezy a výsledky měření s obdobnými jiných autorů, dílem citovaných v Literárním přehledu, (2) vyvozují se souvislosti a pokouší se tu najít spojení s fakty již známými, a (3) upozorňuje se na otevřené otázky a možnosti jejich řešení.

Kapitola Souhrn je na 4 stranách, mohla být stručnější, ale budiž. Vše podstatné, čeho bylo dosaženo, tu je řečeno. Odstavce připomínající Literární přehled musí čtenář jednoduše přeskočit.

V závěru disertační práce je připojen soupis publikací. Ve třech případech z pěti je Ing. Hanusová uvedena jako první autor.

I přes uvedené připomínky prohlašuji, že disertační práce vyhovuje požadavkům kladeným na tento typ prací podle zákona č. 111/1998 Sb. Proto komisi pro obhajobu při JČU ZF v Českých Budějovicích **doporučuji** práci v tomto znění přijmout jako podklad k obhajobě. Po úspěšné obhajobě navrhuji udělit hodnost „doktor“.

V Táboře, dne 27. května 2008



Ing. Václav Míka, DrSc.  
VÚRV Praha, v.v.i.



## **Oponentský posudek**

**Disertační práce:** „Identifikace inhibitorů proteáz“

**Autor disertační práce:** Ing. Lenka Hanusová

**Oponent:** Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá aktuální problematikou detekce proteinových komplexů inhibitorů proteáz bramborové hlízy s důrazem na optimalizaci jejich detekce a kvantifikaci pomocí vysokotlaké kapilární chromatografie (HPLC). Význam studia této heterogenní skupiny bílkovin spočívá v rozsáhlé škále jejich biologické aktivity ovlivňující bezpočet fyziologických procesů rostliny, počínaje regulací odbourávání zásobních bílkovin a konče jejich efektivní zapojení do obranného mechanismu s velkým příslibem jejich využití při procesech transgenozie. Svůj velký význam nalézají inhibitory proteáz v poslední době i v humánní medicíně např. jako protirakovinná činidla. Práce se konkrétně zaměřuje na optimalizaci detekce 7 nejvýznamnějších skupin inhibitorů proteáz a to na podkladě detekce dvou komerčně deklarovaných standardů (Chemotripsin Inhibitor I, Potato Carboxypeptidase Inhibitor, Potato). Optimalizované metody pak byly dále využity pro skrínigovou detekci u kolekcí 17 registrovaných odrůd brambor, včetně jejich otestování v provozních podmínkách při detekci zmiňovaných tříd inhibitorů proteáz v odpadní hlízové šťávě, jež je vedlejším produktem škrobárenského zpracování brambor. Na tomto místě tak musím pochválit navržené téma práce i logickou strukturu řešení vycházející z dobře zajištěného metodického základu s aplikační návazností na odrůdovou (šlechtitelskou) problematiku i přímou vazbu k aktuální provozní problematice využití hlízové šťávy.

Vlastní struktura disertační práce má standardní členění na úvod, rešerši, cíle práce, metodický postup, výsledky, diskusi a závěr. Součástí disertační práce je i autoreferát, jež rovněž zahrnuje publikační aktivitu autorky.

K rešeršní části nemám žádné připomínky. Dle mého názoru doktorandka postihla studovanou problematiku v dostatečné šíři a rešeršní část tak koresponduje se základními aspekty řešené problematiky zahrnující charakterizaci inhibitorů proteáz a způsoby jejich detekce. V návaznosti na předložený metodický postup práce byly navržené cíle jednoznačně a srozumitelně formulovány a dávaly tak dobrý předpoklad pro úspěšné řešení této



problematiky. V metodické části lze vyzdvihnout podrobně zpracované zvolené detekční postupy inhibitorů proteáz. Širší prostor v textu možná mohl dostat i vlastní postup extrakce hlízové šťávy, byť autorka na tento postup odkazuje v uvedené citaci. Z formálního pohledu struktury práce bych rovněž doporučil uváděné počty opakovaných měření u odrůd zmínit již v metodické části a nikoli až ve výsledkové kapitole.

Výsledková část přinesla dva optimalizované detekční postupy pro charakterizaci celého spektra inhibitorů proteáz, s charakteristikou jejich retenčních časů a relativního podílu u vybraných 17 registrovaných odrůd brambor, včetně možného využití těchto metod pro detekci těchto skupin proteinů i v průmyslově získané hlízové šťávě. Tyto získané výsledky tak bezesbýtku naplňují vytýčené cíle práce a předloženou práci lze v tomto aspektu hodnotit za vysoce úspěšnou. K získaným výsledkům i vlastnímu statistickému zpracování bych měl několik dotazů.

V metodické části uvádí autorka jako návazné statistické hodnocení LSD test. Je tím míněn Fisherův LSD post-hoc test nebo se jedná o nějaký vícerozměrný test, na jehož základě byla určena odrůda Kariera jako cituji „nejméně podobná“ v retenčních časech k ostatním odrůdám? Vyjádření nejméně podobná k ostatním by se totiž spíše hodilo pro nějakou aplikaci vícerozměrné statistické metody typu PCA nebo klastrové analýzy.

Proč nebyla v návaznosti na vysokou signifikaci analýzy rozptylu ( $p \leq 0,001$ ) do výsledkové tabulky retenčních časů resp. procentických podílů jednotlivých tříd proteáz rovněž zanesena pomocí písmenných indexů statistická průkaznost pro tyto časy mezi jednotlivými odrůdami?

V metodické části uvedený odkaz (Sýkorová et al. 2006) mimo jiné charakterizuje stav hlíz pro extrakci hlízové šťávy zahrnující jejich optimální vyzrálou, přednostní sklizeň po zaschnutí listů a podmínky skladování. V této souvislosti bych měl dotaz zda je možné očekávat kvantitativní změny inhibitorů proteáz v průběhu skladování hlíz, případně zda toto mohlo mít nějaký dopad na Vámi zjištěné odrůdové diference v podílech těchto proteinů.

Deklarované statisticky průkazné rozdíly v retenčních časech jednotlivých skupin proteáz u některých odrůd by přiváděly rovněž k myšlence jejich využití jako odrůdové markery. Je toto využití podle Vás teoreticky možné, či budou tyto výsledky více podléhat externím vlivům prostředí a fyziologickému stavu hlíz?

K diskusní ani závěrečné části práce již nemám žádné připomínky. Autorka vychází z vytýčených cílů a své výsledky dle mého soudu zdařile konfrontuje s ostatními autory.

Závěrem si dovoluji konstatovat, že disertační práce Ing. Lenky Hanusové zcela splňuje dané požadavky pro tento typ práce a pro pracoviště přináší velmi cenné výsledky



především ve spolehlivé optimalizaci jednotlivých kategorií inhibitorů proteáz, jež budou jistě základním pilířem pro další rozvoj této problematiky na tomto pracovišti. Není sporu o tom, že disertační práce prokazuje zároveň požadovanou vysokou odbornou úroveň doktorandky i její připravenost pro samostatnou vědeckou práci. Proto po úspěšné obhajobě disertační práce doporučuji Vědecké radě ZF Jihočeské univerzity disertační práci schválit a Ing. Lence Hanusové udělit titul Ph.D.

V Praze 2. 6. 2008

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

