



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor

Pracoviště: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Autor: Ing. Adéla Brabcová

Školitel: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2015

Předložená doktorská dizertační práce Ing. Adély Brabcové zpracovává rozsáhlé a v řadě oblastí jen velmi originální téma zaměřené na charakteristiky patatinových proteinů hlíz vybraných kulturních odrůd a planých druhů (genotypů) brambor. Téma práce bylo dle mého soudu velmi pečlivě a systematicky navrženo. Zahrnovalo celkem 7 dílčích cílů týkajících se morfologického popisu vstupních genotypů, vyhodnocení základního polymorfismu patatinového komplexu, metod jeho purifikace a jeho detailní strukturní charakterizace. Neméně významnou součástí práce pak bylo i hodnocení biologických vlastností patatinu, konkrétně jeho enzymatických aktivit (antioxidační, lipidacylhydrolásové a fosfolipásové aktivity).

Členění předložené dizertační práce a popis dosažených výsledků je proveden doložením 9 výstupů, z nichž 3 jsou impaktované publikace, ve 4 případech se jedná o recenzované publikace, kde je předkladatelka prvním autorem a dále o spolupráci na jedné metodice a monografii. V rámci těchto výstupů je v práci i krátce uveden podíl autorky na daném výstupu, což vhodně konkretizuje rozsah jejích aktivit v rámci dosažených výsledků daného autorského kolektivu.

Takovýto počet prací, který navíc v podstatě pokrývá celou problematiku navržené disertační práce, přičemž zasahuje jak do oblasti základního tak současně i do aplikovaného výzkumu, je z mého pohledu u studenta doktorského programu velmi nadstandardní. Je zřejmé, že toto by asi nebylo možné bez výborného personálního a technického vybavení týmu kolem pana školitele a bez získání příslušných projektů pro řešení dané problematiky. To však nijak nesnižuje dosažené výsledky autorky a naopak opakované získávání interních projektů univerzity (celkem 4x), potvrzuje vysokou erudici řešitelky.

Struktura dizertační práce tak zahrnuje, vedle souhrnu, výstižný úvod do problematiky, krátké úvodní komentáře k jednotlivým dílčím cílům resp. výstupům a stručný závěr včetně velmi bohatého seznamu použité literatury. Metodická část je pak plně zahrnuta v doložených publikacích.

Drobnou formální připomínku bych snad měl k pořadí, jak jsou dosažené výsledky prezentovány v kapitole č. 4., kdy jako první dílčí cíl byla zmíněna morfologická charakteristika hlíz, včetně ověření ploidity. V kapitole č. 4 „Dosažené výsledky“ však tuto informaci nalézám až někde uprostřed, v rámci doložené části monografie a pak až v celkovém závěru práce. Zde je rovněž zmíněno cituji: „*Jedním z hlavních cílů dizertační práce byl morfologický popis hlíz netradičních kulturních a planých druhů hlíz a ověření ploidity*“. Pokud to tedy považujete za klíčovou informaci, bylo by vhodné ji asi zdůraznit i



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

v rámci nějakého krátkého komentáře před doložením vlastních výsledků, a to hned na počátku této kapitoly.

Vzhledem k výše uvedenému doložení již oponovaných výstupů (publikací, metodiky a recenzované monografie) je v tomto případě má role jako oponenta jednoduší a zaměřím se tak v této části jen na velmi stručný komentář a případné dotazy k dosaženým výstupům.

V kapitole č. 4 dokladované certifikované metodiky oceňuji velmi pěkný a názorně zpracovaný postup dvoustupňové separace hlízových proteinů. *Zajímalo by mne, jaké byly hlavní optimalizační kroky při navržení tohoto finálního postupu? Případně z jaké primární metodiky se vycházelo?* V kap. č. 7 jste se pak podílela na vypracování metodiky měření aktivity inhibitorů proteáz. *Jaké je přibližná opakovatelnost (chyba měření) v případě této spektrometrické metody?*

Z hlediska doložené monografie, kterou jsem s velkým potěšením měl možnost recenzovat, a aniž bych v té době věděl, na jakých částech se Ing. Brabcová podílela (viz kap. 3.2. Bílkoviny v hlízách vybraných druhů rodu *Solanum*), jsem v rámci své recenze uvedl i toto následující hodnocení: „*Jako vědecký pracovník zabývající se dlouhodobě genetickými zdroji rostlin nemohu nezmínit nesmírně zajímavou kapitolu o charakteristice bílkovin genetických zdrojů rodu Solanum, která se mi z mého (možná subjektivního) pohledu jeví i vzhledem k řadě vlastních detailních analýz jako jedna z nejoriginálnějších kapitol této knihy*“. Velmi mě rovněž zaujala v této kapitole i metoda purifikace lektinu s následným provedením hemaglutinačního testu, jež přineslo dle mého soudu zcela unikátní výsledky v kontrastních vlastnostech hemaglutinační aktivity u testovaných genotypů.

Za nesmírně zajímavý považuji rovněž výstup ve vědeckém časopise „Agricultural and Food Chemistry“ zaměřený na mapování glykanových profilů patatinu a to z hlediska objevení zcela nových u brambor ještě nepopsaných glykanových struktur. V této souvislosti mě napadá otázka, *zda se již nyní ví něco konkrétnějšího o vztahu mezi úrovní alergie a spektru glykosilací v patatinu?*

Podobným dojmem z hlediska vysoké originality výstupu na mne působil i příspěvek o nutriční skladbě izolovaných patatinů v publikaci „Journal of Food and Composition Analysis“. Nalezený donor vysoké nutriční hodnoty patatinu druhu *S. goniocalyx* zřejmě skutečně může nabízet určitý šlechtitelský potenciál pro další zvýšení nutriční kvality hlíz. K tomuto příspěvku mne napadá otázka, *jak obecně fungují určité agrotechnické zásahy (např. úroveň hnojení) na kvantitativní zastoupení patatinu? Lze očekávat nejen jeho absolutní, ale i relativní nárůst v hlíze při zvýšení dávek dusíku? Lze považovat signifikantní rozdíly v hodnotách EAAI u patatinu mezi testovanými genotypy jako jejich jednoznačný nutriční fingerprint jen s velmi malým vlivem externích faktorů?*

Významná část výsledků resp. publikačních výstupů je v práci věnována enzymové a antioxidační aktivitě patatinů vybraných u kulturních i planých druhů. Jako velmi cenný zdroj informací pro směry výzkumu této práce jistě posloužilo vypracování příspěvku uvedeného v časopise Chemické listy: „Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru“. Návazné výsledky poté směřovaly ke konkrétním mapovacím studiím na variabilitu lipidacylhydrolásové aktivity (LAH) a aktivity fosoflipázy A_2 (PLA₂) s významným zjištěním vysoké variability těchto vlastností u jednotlivých druhů. Přičemž vysoké aktivity dosáhly především netradiční kulturní a plané druhy rodu *Solanum*. *Je možné v tomto směru nalézt či očekávat nějakou souvislost mezi strukturou glykosilace patatinu a sledovanou enzymatickou aktivitou, jejíž potenciální efekt autorka zmiňuje u antioxidační aktivity patatinu?*

Studium antioxidační aktivity patatinu zahrnovalo nejen aktivitu izolovaného patatinu, ale i jeho jednotlivých složek získaných enzymatickým štěpením. Právě po enzymatickém rozštěpení patatinu jeho antioxidační aktivita významně narostla včetně výrazného nárůstu



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

mezidruhové variability tohoto parametru. Zajímavé zde byl významný meziodrůdový rozdíl dvou kulturních odrůd (Desireé vs. Kuras).

Lze nějak porovnat (okomentovat) úroveň (příspěvek) této antioxidační aktivity patatinu (jeho štěpů) ve srovnání s uváděnými hlavními komponenty ovlivňující antioxidační aktivitu celé hlízy (polyfenoly, vitamin C, karotenoidy, tokoferoly aj.) ?

Závěrem lze pouze s potěšením konstatovat, že vzhledem k výše uvedeným faktům a celkové vysoké odborné úrovni předložené dizertační práce resp. předloženým publikačním výstupům jednoznačně doporučuji, aby oponovaná práce Ing. Adély Brabcové byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl udělen jmenované akademický titul „Ph.D.“

V Praze dne 27.1. 2016

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.
Středoevropský technologický institut
Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF
Masarykova univerzita
UKB, pavilon A26
Kamenice 5
625 00 Brno

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Adély Brabcové:

Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor

Ve své disertační práci se Ing. Adéla Brabcová zabývala systematickým popisem vlastností vybrané skupiny genotypů brambor a to jak kulturních, tak netradičních kulturních i planých druhů. Základním cílem práce byl vývoj metodiky pro izolaci patatinových bílkovin a studium variability jejich vlastností u jednotlivých genotypů. Výsledkem je soubor nových znalostí o těchto druzích brambor, zejména pak o vlastnostech patatinových bílkovin netradičních a planých druhů brambor, které se mohou následně uplatnit při šlechtění brambor či v nových biotechnologických aplikacích.

Výsledky práce publikovala Ing. Brabcová ve 4 recenzovaných publikacích jako první autorka a ve třech článcích v odborných časopisech s impaktním faktorem jako spoluautorka, dále pak je spoluautorkou certifikované metodiky a monografie. V rámci své disertační práce se také aktivně podílela na plnění cílů několika výzkumných projektů zabývajících se problematikou patatinových bílkovin.

Vlastní práce je vypracována jako kombinace psaného úvodu do problematiky a vlastních publikačních výstupů opatřených krátkými komentáři. Výsledky jsou pak shrnuty v závěru. Takto i přes značný rozsah je práce přehledná. Psané části jsou pečlivě zpracované jen s drobnými nedostatky (některé viz níže). Někdy se autorka nevyhnula drobným nepřesnostem či „laboratornímu slengu“.

Na základě prostudování disertační práce mám tyto poznámky:

- Neúplný seznam zkratk, např. DEAE, velmi často v textu používaná zkratka není nikde vysvětlena.
- Text některých příloh je poměrně malý, těžko čitelný, např. str. 123.
- Summary – „...*properties of the patatins and the isolated patatins*“. Neodpovídá české verzi
- str. 27 – věta není správně formulována – „...*bílkovin, patří mezi serinové inhibitory.*“ – správněji dle mého názoru je – „...*patří mezi inhibitory serinových proteas*...“
- str. 29/30 – rozpor v citaci Sonenwald et al (1989) – na str. 29 je zmíněno – „... *patatin exprimovaný v listech transgenního tabáku je glykosylovaný na dvou místech (asparagin 60 a asparagin 90)*...“, zatímco na str. 30 u stejné citace je – „... *po izolaci patatinu z transgenního tabáku (odrůda Berolina) 3 glykosylační místa v polypeptidovém řetězci v pozicích 37, 67 a 181*...“ – prosím vysvětlíte.
- str. 30 – nesprávná formulace – „... *s nárůstem acetylace histonu H4 lysinem.*“ – lysinem se histon neacetyluje

- str. 36 – nesprávná formulace – „...se zhášecí aktivitou radikálu peptidů...“
- str. 122 – „...typickým... glykanům....(m/z 1301)“ – lépe uvést *m/z* 1169 nebo uvést, že to je *m/z* derivatizovaného produktu

Dále pak mám tyto otázky, u kterých předpokládám jejich zodpovězení či komentář v rámci obhajoby:

- Vysvětlíte prosím, co znamená tvrzení „*patatiny jsou glykoproteiny, ..., kterou tato homogenní skupina izoform má.*“ (str.15). Z jakého pohledu je tato skupina homogenní?
- Uveďte prosím výhody a případné nevýhody Vašeho postupu pro izolaci patatinových bílkovin oproti stávajícím postupům.
- Jakou ze zjištěných vlastností u netradičních či planých brambor považujete za nejperspektivnější pro uplatnění v praxi (biotechnologické aplikace)?

Závěrem mohu prohlásit, že i přes dílčí připomínky, práce splňuje kritéria doktorské disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D. a doporučuji ji k obhajobě.

v Brně, dne 22.1. 2016



Zbyněk Zdráhal

Ing. Adély Brabcové

na téma: „**Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor**“

Školitel: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Konzultant: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

Předložená disertační práce doktorandky Ing. Adély Brabcové s názvem „Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor“ představuje nesporný přínos pro modernizaci šlechtitelského procesu bramboru a to především při tvorbě výchozích šlechtitelských materiálů se zvýšeným zastoupením patatinových bílkovin v hlízách a pro zpřístupnění a využitelnost genetických zdrojů bramboru pro šlechtitele.

Posuzovaná disertační práce je uvedena na 188 stranách. Po stručném úvodu následuje poměrně obsáhlá literární rešerše, sestavená na základě studia 141 citovaných literárních pramenů. Obsah, způsob a forma jejího zpracování svědčí o velmi dobré orientaci doktorandky ve sledované problematice a schopnostech práce s příslušnou převážně cizojazyčnou odbornou a vědeckou literaturou.

Základní cíl práce – studium variability vlastností a struktury patatinových bílkovin u vybraných genotypů netradičních kulturních a planých druhů brambor, je jasně a výstižně formulován. Doktorandka si velice dobře a logicky naplánovala dílčí cíle nezbytné k splnění základního cíle práce a to jednak morfologický popis hlíz netradičních a planých druhů brambor a ověření ploidie z listů těchto druhů pomocí průtokové cytometrie, studium proteinových spekter pomocí elektroforetických technik (SDS-PAGE, PAGE, čipová elektroforéza), purifikaci patatinů z hlíz pomocí chromatografických technik, detailní popis strukturních a biochemických vlastností patatinů pomocí moderních proteomeckých technik (2D PAGE, IEF, MS), detekci lipidacylhydrolasové aktivity purifikovaných patatinů z hlíz kvalitativně (na polyakrylamidovém gelu) a kvantitativně (spektrofotometricky) a detekci rozdílů při použití substrátů s mastnými kyselinami o rozdílném počtu uhlíků v uhlovodíkovém řetězci, ověření dalších vybraných enzymových aktivit patatinu, zejména fosfolipasové aktivity A_2 a ověření antioxidační aktivity patatinu a patatinových štěpů získaných enzymaticky.

Tradiční kapitoly – metodika, výsledky a diskuse, doktorandka nahradila kapitolou 4 Přehled o dosažených výsledcích. Tato kapitola je členěna do čtyř samostatných částí –

„Purifikace patatinů z hlíz netradičních kulturních a planých druhů brambor“, „Základní strukturní a biochemické vlastnosti patatinů“, „Enzymová a antioxidační aktivita patatinů“ a „Nutriční hodnota hlízových bílkovin“. Získané výsledky včetně jejich statistického zhodnocení jsou prezentovány odpovídajícím způsobem, umožňujícím jejich doložení prostřednictvím certifikované metodiky, monografie, tří impaktových publikací a čtyř recenzovaných publikací. U všech těchto prací je doktorandka autorkou či spoluautorkou. Svůj konkrétní a významný podíl při experimentální práci a zpracování publikací pak uvádí v úvodu disertační práce.

V předložené disertační práci v kapitole 5 Závěr je uveden souhrn výsledků studia majoritní skupiny hlízových bílkovin brambor – patinu, které byly izolovány z vybraných netradičních kulturních a planých druhů brambor. Výsledky o biochemických vlastnostech, enzymových aktivitách a nutriční hodnotě patatinů, které společně s morfologickým popisem hlíz a dalšími informacemi o hlízách těchto druhů tvoří, tak jak konstatuje autorka, ucelený soubor informací o těchto v Evropě netradičních druzích. Z pohledu genofundu bramboru uchovávaného ve Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě se podařilo získat a shromáždit velice cenná popisná data.

Chci se zeptat doktorandky jakou má představu o využití netradičních a planých druhů v procesu novošlechtění bramboru. Jakým způsobem by mohly být jednotlivé druhy využity? Jak ovlivní jejich využitelnost úroveň ploidie?

Problematika charakteristiky patatinových proteinů z hlíz byla doktorandkou zvládnuta na vysoké úrovni. Doktorandka se podílela na tvorbě metodiky „Metody izolace vybraných proteinů brambor“. Získané poznatky byly doktorandkou publikovány ve vědeckých publikacích.

Posuzovaná disertační práce Ing. Adély Brabcové na téma: „Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor“ je svým obsahem, odborností i způsobem zpracování na velmi vysoké úrovni a doporučuji ji přijmout k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělit jmenované akademický titul „Doktor“.

V Havlíčkově Brodě 18. 1. 2016

Jaroslava Domkářová

