

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: **Jaroslav SRP**

Název práce: **Trávicí aspartátová proteasa mandelinky bramborové**

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekorresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N – nedostatečné

2. Odborná správnost	
X	A - výborná, bez závažnějších připomínek
	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
X	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
X	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy , chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5.:

Komentář k bodu 1:

Úvod i diskuse poskytují současný a ucelený pohled na problematiku asparátových peptidas se zaměřením na lysozomální aspartátovou peptidasu kathepsin D (CD). Popisují jeho biosyntezu, strukturu a funkci, včetně patofyziologie. Podrobně se zabývají fyziologií trávení proteinů u hmyzu pomocí proteas s hlavním zaměřením na mandelinku bramborovou a její škodlivé působení na rostliny. Naopak zmiňují i obranné mechanismy rostlin proti škůdcům.

Cíl práce byl jasně stanoven: Připravit dva expresní systémy a to v *Escherichia coli* a *Pichia pastoris* pro produkci rekombinantního kathepsinu D (LdCD) z mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Dále provést refolding rekombinantního proteinu, analýsu procesu autoaktivace zymogenu LdCD a aktivace účinkem legumainu a charakterizovat interakci LdCD se substráty a inhibitory.

Z výsledků a závěrů práce jasně vyplývá, že cíle, které si autor vytkl, byly splněny. Významným výsledkem této DP je také zjištění, že inhibitor savčího kathepsinu D izolovaný v r. 1989 dr. Marešem z brambor velmi silně inhibuje také LdCD ze zažívacího traktu mandelinky bramborové a tak zřejmě představuje přirozený nástroj obrany rostlin proti svému škůdci.

Komentář k bodu 2:

Diplomová práce je kvalitní, přehledná, logicky seřazená.

Komentář k bodu 3:

V diplomové práci je uvedeno 136 citací až do r. 2010. Odpovídají plně charakteru práce.

Komentář k bodu 5:

Diplomová práce obsahuje překlepy.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. Jaké byly výtěžky rekombinantního kathepsinu D v systému *Escherichia coli* a v systému kvasinky *Pichia pastoris*?
2. Nehodláte izolovat rekombinantní LdCD také z kultivačního media, kam ho secernuje kvasinka *P. pastoris* na rozdíl od systému *E. coli*, v rozpustné formě což by tak mohlo být jednodušší než izolace z inkluzních tělísek?
3. Je známo jak vypadá přirozená glykosylace kathepsinu D u mandelinky bramborové? Jak bylo prokázáno, že glykosylace kathepsinu D neovlivňuje ani sbalování ani aktivitu enzymu?
4. V diskusi zmiňujete, že aminokyselinová sekvence LdCD z mandelinky bramborové byla analyzována na ÚOCHB AVČR. Pokud byla daná sekvence publikována v odborném tisku, prosím o uvedení této publikace.

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / ~~NE~~

Navrhovaná celková klasifikace **1**

Datum vypracování posudku: 19. 5. 2010

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS):

Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.