

Posudek vedoucího na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Petra Lakomá

Název práce: Charakterizace aminoaldehyddehydrogenasy z kukuřice seté (*Zea mays*)

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	pracovní aktivita	4
2	zájem o řešenou problematiku (četnost diskusí s vedoucím, znalost relevantní literatury)	3
3	manuální zručnost	4
4	pečlivost a spolehlivost	3
5	samostatné plánování experimentů	3
6	vyhodnocování a interpretace experimentálních výsledků	2
7	samostatnost při sepisování práce	3
Celkem bodů		22

celkem
35

Komentář k práci, připomínky a dotazy

Petra Lakomá se věnovala analýze dvou rekombinantních aminoaldehyddehydrogenas z kukuřice (ZmAMADH1 a 2), které purifikovala z lyzátů transformovaných buněk *E. coli* pomocí chelatační chromatografie. Identita obou enzymů byla ověřena hmotnostní spektrometrií. Dále byly charakterizovány jejich molekulární a kinetické vlastnosti a byla stanovena relativní rychlost přeměny vzhledem k přirozenému substrátu 3-aminopropionaldehydu. Pro čtyři nejlepší přirozené substráty pak byly určeny kinetické parametry K_m a V_{max} . Výsledky získané s jednotlivými enzymy byly porovnány a diskutovány. I když diplomantce nelze upřít pracovní aktivita, práce má řadu formálních nedostatků ve zpracování a proto ji celkově hodnotím jako průměrnou. V teoretické části je diskutován metabolismus polyaminů a vznik substrátů APALu a ABALu. Oproti tomu metabolismus a vznik TMABALu a GBALu zůstaly opomenuty. V diskuzi jsou kinetické výsledky srovnávány zejména s rajčatovými AMADH podle diplomové práce Hany Moskalíkové z roku 2009. Srovnání s publikovanými výsledky u hrachových AMADH (Tylichová et al., 2010) chybí. I když je na obrázku 6 zobrazena struktura hrachové AMADH, chybí jakýkoliv popis aktivního místa a vazebného místa pro koenzym. Pak by se totiž z porovnání sekvencí těchto enzymů, příslušných residuí a kinetických dat získaných jak pro substráty, tak pro koenzymy daly vysvětlit naměřené rozdíly ve specifitě.

Faktické chyby: str. 37, chybí plus v rovnici Michaelis-Mentenové, str. 38 je na obrázku 13 špatně označen průsečík s osou Y jako $1/2 V_{lim}$. Dále musím vytknout nejednotnost v používání desetinné čárky nebo tečky u číslic, v používání nebo nepoužívání tečky u „ $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ “ nebo „ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ “. Není vhodné užívat pojmy „pelet“, ale sediment nebo usazenina, „falkonka“ nebo „ependorfka“, ale mikrozkušavka o daném objemu. Aktivitu nevykazuje substrát, ale enzym (str. 53) a enzymy se nepodrobují SDS-PAGE (str. 59), ale analyzují

metodou SDS-PAGE. V citacích chybí 1 citace: Nakamura *et al.* (1997) a naopak 2 citace přebývají: Suzuki (1996) a Kurys *et al.* (1989).

Otázka na závěr: Jak byl vypočítán výtěžek z 200 ml kultury na straně 44, tz. Jak se došlo k výsledným hodnotám 13 mg a 40 mg.

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne 12.5.2010

Podpis: