

Posudek disertační práce

Autor: Ján Matyašovský

Název práce: Enzymová syntéza DNA modifikované v malém žlábkú

Disertační práce je zaměřena na studium enzymatické syntézy DNA modifikované v malém žlábkú pomocí malých substituentů v poloze 2 purinových bazí. Celkově svou náplní zapadá tato práce do oblasti organické chemie s přesahem do molekulární biologie. Svým zaměřením je pokračováním systematického studia přípravy a vlastností modifikovaných nukleových kyselin, což je vysoce sledované téma v oblasti výzkumu bioorganické chemie a chemické biologie.

Samotná práce je standardně rozčleněna do šesti hlavních kapitol včetně seznamu použitých literárních zdrojů. Je sepsána v anglickém jazyce na dobré úrovni, vhodně doplněna obrázky a schémata dokreslující daná tvrzení v textu.

V úvodu se autor zabývá známými metodami přípravy modifikovaných oligonukleotidů, syntézou modifikovaných DNA a postsyntetickými modifikacemi DNA. Tato kapitola je pak zakončena přehledem o fungování restričních endonukleas na modifikované nukleové kyseliny. Celá tato kapitola je psána velmi přehledně a adekvátně stručně. Oceňuji zejména jasnou, kriticky pojatou sumarizaci stávajících metod přípravy a studia modifikovaných nukleových kyselin. Tato část, na kterou navazuje kapitola Cíle práce tak jasně předurčuje zamýšlený posun v dané oblasti výzkumu.

Cíle práce jsou shrnuty v pěti základních bodech, které jsou následně podrobněji rozebrány a vysvětleny. Hlavní pozornost byla zaměřena na syntézu 2-modifikovaných 2'-deoxyadenosin trifosfátů a 2-modifikovaných 2'-deoxyinosin trifosfátů, které měly být enzymaticky inkorporovány do příslušné sekvence v malém žlábkú DNA. Pozornost byla dále věnována postsyntetické modifikaci DNA v jejím malém žlábkú a následně i studium aktivity endonukleas vůči takto modifikovaným DNA. Všechny cíle práce byly splněny. Během jejího řešení se podařilo připravit modifikované oligonukleotidy purinového typu a definovat, které z nich jsou pomocí enzymatické syntézy inkorporovatelné do DNA. Studovány a vyhodnoceny byly dále různé metody postsyntetické modifikace DNA, které mohou do budoucna nalézt praktické uplatnění např. v diagnostice. Zajímavé výsledky pak byly dosaženy i při studiu aktivity restričních endonukleas, jejichž aktivita byla závislá na typu modifikace, což je v práci přehledně rozebráno. V této oblasti se podle mého názoru otvírají další možnosti pro budoucí účelné studium.

Autor se podle zaměření práce a dosažených výsledků zhostil nelehkého úkolu, kdy musel získat a uplatnit dostatečné znalosti a dovednosti nejen v organické syntéze, ale i v oblasti molekulární biologie. Výsledky, které jsou součástí předkládané práce, ukazují na velmi dobrý přístup k zadanému úkolu. Bezpochyby musel být kladen důraz na systematickú, se kterou byly jednotlivé fáze studie plánovány a pečlivost, se kterou musely být jednotlivé experimenty prováděny. Důležitým faktorem je i správnost při vyhodnocování výsledků, čehož se autor velmi dobře zhostil. Výsledkem jsou tak tři prvoautorské publikace v prestižních odborných časopisech, které přímo souvisejí s předkládanou disertační prací. Pracovitost disertanta pak dokládají ještě další tři spoluautorské publikace v uznávaných časopisech.

Celkově hodnotím rozsah práce, její zaměření a dosažené výsledky jako nadprůměrné a doporučuji proto přijmout tuto práci k obhajobě.

K samotné práci mám následující komentáře k diskuzi.

Str. 54: Autor uvádí, že thiol-ene reakce u DNA⁴A, vedla ke vzniku produktu čtyřech reakcí, ale že nejvíce zastoupený je produkt transformace jedné nebo dvou vinylových skupin. Toto tvrzení je podepřeno záznamem MALDI spektra (příloha 1). Není mi úplně jasné, jak jsou detekovány čtyři produkty a jaké je jejich zastoupení.

Str. 74: Autor srovnává konverzi postsyntetické modifikace DNA mezi thiol-enovou reakcí a azido-click reakcí. Z textu úvodního odstavce na této straně a porovnání Figure 30 a 19 mi není úplně jasné, která z těchto reakcí je lepší a proč.

Str. 80: V textu autor popisuje experiment související s detekcí oligonukleotidů pomocí FRET. Obsah textu podle mého názoru neodpovídá obrázku 36, na který je odkazováno. Obr. 36 je pak shodný s Obr. 35.

V Olomouci dne 18.3.2012

prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.