

Vyjádření školitele k disertační práci **Ing. Shirly Josefiny Espinozy Herrery** *Function of Magnesium Ions in the Formation of Biologically-Active Nucleic Acids Structures*

Disertační práce je věnovaná problematice vlivu hořečnatých iontů na strukturu a strukturní stabilitu vybraných molekulárních modelů nukleových kyselin (NA). Jako dvojmocný kov s nejvyšší vnitrobuněčnou koncentrací hraje hořčík, přesněji řečeno hořečnaté ionty, významnou úlohu při stabilizaci jednovláknových i vícevláknových struktur nukleových kyselin. Způsob interakce hořečnatých iontů s nukleovými kyselinami může být velmi rozdílný v závislosti na konkrétní geometrii strukturního útvaru NA i bázevém složení, počínaje nespecifickou elektrostatickou interakcí vedoucí ke zvýšení výskytu kationtů v blízkosti záporně nabitých fosfátových skupin až po poměrně pevnou koordinační vazbu do specifického vazebného místa. Přestože znalost role hořečnatých iontů je významná pro pochopení fyzikálně-chemických vlastností NA, pro správný návrh a interpretaci *in vitro* strukturních a interakčních experimentálních studií NA i pro výzkum a vývoj jejich chemoterapeuticky významných analog, je současná znalost většinou omezena na to, jak hořečnaté ionty ovlivňují tvorbu duplexů mezi komplementárními sekvencemi NA. Tento stav má do značné míry příčinu v tom, že hořečnaté ionty si zřejmě ve většině případů při interakci s NA zachovávají neporušený solvatační obal a vytvářejí pouze vazbu vnější sféry, tedy vážou se vodíkovými můstky mezi molekulami vody koordinačně vázané k hořečnatému iontu a atomu na NA. Díky tomu je poměrně obtížné experimentálně sledovat projevy této interakce.

V předložené doktorské práci byla k tomuto studiu použita Ramanova spektroskopie, která umožňuje sledovat jak změny ve strukturním uspořádání NA, tak případné přímé projevy silového působení hořečnatých iontů. S ohledem na malou intenzitu spektrálních změn bylo nutné pracovat s co nejvyšší přesností a zviditelnovat spektrální rozdíly pomocí technik diferenčních spekter a faktorové analýzy. Ke studiu bylo vybráno několik modelových systémů NA, u kterých bylo možné očekávat citlivost strukturního uspořádání na přítomnost hořečnatých iontů.

Prvním systémem byly komplementární RNA homopolynukleotidy polyA a polyU, u kterých je známé, že snadno tvoří duplexy i triplexy, přičemž hořečnaté ionty více stabilizují triplexy. V rámci práce bylo pomocí Ramanovy spektroskopie potvrzeno, že afinita iontů hořčíku vůči polyU-polyA-polyU triplexům je tak velká, že tyto ionty v roztoku polyA-polyU duplexů způsobí jejich částečnou disociaci a vytváření triplexů. Dále byly nalezené ramanovské charakteristiky vazby hořečnatých iontů do specifického vazebného místa u triplexů a toto místo charakterizované.

Dalším systémem byl analogický systém DNA homopolynukleotidů poly(dA) a polyT. V tomto případě bylo potvrzené, že tvorba triplexů je málo výrazná a hořčík jí příliš neovlivňuje. Rozhodně nevede ke tvorbě triplexů z duplexových struktur. Na druhé straně bylo zjištěné, že hořečnaté ionty mají velký vliv na teplotně indukovaný „premelting“ B' → B přechod v poly(dA)-polyT duplexech, kdy se přednostně vážou na B strukturu duplexu, čímž modifikují její geometrii.

Byla studována i interakce s RNA oligonukleotidem představujícím vrcholovou vláseňku segmentu TAR genomické RNA viru HIV-1. U této vláseňky bylo již dříve zjištěno, že kromě teplotně indukovaného přechodu otevření vláseňky existuje ještě „premelting“ přechod při nižších teplotách, který byl připsán změně geometrie nepárových nukleotidů ve smyčce vláseňky. V rámci práce bylo ukázáno, že hořečnaté ionty ovlivňují celkovou stabilitu vláseňky jen velmi slabě, ale výrazněji ovlivňují „premelting“ přechod. Jejich účinek je však zcela odlišný od případu DNA duplexů, neboť u TAR vláseňky hořečnaté ionty usnadňují tento přechod, ale nevedou k větším změnám Ramanova spektra, které by bylo možné interpretovat jako projev specifického vazebného místa pro hořečnaté ionty ve smyčce vláseňky.

Tyto originální výsledky významně přispívají ke znalostem vlivu iontů hořčíku na strukturu NA. Byly doktorandkou prezentované na několika mezinárodních konferencích ve formě posterů a jedné přednášky a jsou předmětem čtyř rukopisů článků, z nichž v současné době jeden vyšel a jeden je v tisku.

Doktorandka pracovala po celou dobu řešení disertační práce poměrně samostatně a vyrovnala se s velkým objemem prováděných experimentů i poměrně obtížným a zdlouhavým zpracováním spekter. Chci poznamenat, že vzhledem k charakteru sledovaných spektrálních změn bylo nutné násobné opakování experimentů, vyhledávání a eliminace nejrůznějších artefaktů. Data uvedená v práci představují proto ve skutečnosti pouze zlomek provedených experimentů a výsledků spektrálních analýz.

Domnívám se, že Ing. Shirley Josefina Espinoza Herrera jednoznačně prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Její disertační práci proto doporučuji k obhajobě a po úspěšné obhajobě doporučuji udělení titulu Ph.D.

V Praze, dne 22. prosince 2010

Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
školitel