

**Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr.Hany Vaisocherové:
„Monitoring of Biomolecular Interactions for Nucleic Acids Research.“
(„Studium biologicky významných interakcí nukleových kyselin.“)**

Disertační práce Mgr.Hany Vaisocherové je věnována mimořádně zajímavému a aktuálnímu tématu – optimalizaci molekulárních rekogničních elementů v moderních biosenzorech založených na měření charakteristik povrchového plasmonu buzeného evanescentní vlnou ve stratifikované struktuře optického senzoru s vrstvou zlata. Řada výsledků této práce je nesporně velmi cenná i pro bezprostřední lékařské aplikace v moderních diagnostických metodách.

Disertační práce je napsána v angličtině. První část disertace v rozsahu 45 stran je zpracována jako úvod do publikací, které jsou dále uváděny *in extenso* ve dvanácti samostatných přílohách. Z nich je možno získat přehled o vlastních výsledcích disertantky. V této úvodní části jsou uvedeny jednak základní informace o interakcích v nukleových kyselinách a vysvětlena fyzikální podstata činnosti optického biosenzoru založeného na měření posuvu rezonanční vlnové délky pro vznik plazmonu v tenké vrstvě zlata. K tomuto spektrálnímu posuvu dochází v důsledku změn indexu lomu způsobených navázáním molekul na aktivním povrchu senzoru. Tento fyzikální princip je pak v disertační práci využíván pro studium rozmanitých interakcí mezi biomolekulami. Přehledně jsou proto uvedeny různé metodiky pro immobilizaci molekul na površích senzoru. V práci byly používány čtyř nebo osmikanálové senzory s postupnou excitací dvou povrchových plasmonů, které byly vytvořeny v Oddělení optických senzorů Ústavu radiotechniky a elektroniky Akademie věd ČR v Praze, kde disertantka působila. Úspěšně se věnovala podrobnému studiu optimalizace molekulárního rekogničního elementu, který je klíčovým místem při využívání těchto senzorů v biologicko-lékařských aplikacích při sledování interakce mezi různými biomolekulami.

Cíle disertační práce, týkající se immobilizace receptorů na povrchu senzoru jsou definovány na str.16. V další části práce jsou popisovány vlastní výsledky, jichž se podařilo disertantce získat:

1) Byla vyzkoušena celá řada metodik pro immobilizaci proteinů. Přitom se zjistilo, že nejvhodnější a versatilní metodou je použití samoorganizujících se monovrstev. Zejména bylo rozpracováno a optimalizováno navazování molekul pomocí alkythiolů a úspěšně použito pro immobilizaci několika různých protilátek (proti imunoglobulinu E a G, křenové peroxidáze a lidskému choriovému gonadotropinu). Významným úspěchem bylo zlepšení citlivosti detekce protilátek v krevním séru proti viru Epstein-Barrové, který je původcem infekční mononukleózy. V souvislosti s tím byly rovněž ověřeny experimentální možnosti osmikanálového senzoru. Tyto výsledky byly publikovány a jsou uvedeny podrobně v přílohách II, III, IV a VII. Zkušenosti zde získané využila disertantka rovněž k sepsání velmi záslužného přehledného článku o využití senzorů s plazmonovou rezonancí v lékařské diagnostice (příloha XI).

2) Další část práce je věnována studiu interakcí v nukleových kyselinách, zejména hybridizaci. Pomocí metod optické spektroskopie byly sledovány hybridizace nonamerních duplexů a určena jejich stabilita. Výsledky tohoto studia byly publikovány a jsou uvedeny v příloze I.

3) Hlavní část práce se soustřeďuje na problematiku interakcí oligonukleotidů studovaných pomocí plazmonového senzoru. Zde se podařilo úspěšně vyřešit otázku immobilizace a to pomocí spontánně se uspořádající alkylthiolové matrice za současného využití systému biotin-avidin. Výsledky na oligonukleotidech a nukleových kyselinách jsou obsaženy v přílohách VII a IX. Ukázalo se, že použitá experimentální metoda je vhodná i pro sledování časových průběhů vazebných reakcí.

4) Pomocí osmikanálového senzoru s vrstvou navázaného avidinu se podařilo v reálném čase monitorovat aktivitu viru HIV, respektive jeho integrázy, která katalyzuje jeho začleňování do hostitelského genomu. Tato skutečnost je velmi významná z hlediska přípravy možných léčiv nemoci AIDS.

Celá práce Mgr.Hany Vaisocherové svědčí o tom, že dokonale ovládla několik oblastí molekulární biologie. Současně se jí podařilo dosáhnout výborných výsledků, které mohou mít bezprostřední aplikaci v humánní medicíně (diagnoza mononukleázy, stanovování gravidity a imunodeficience). Velmi oceňuji zejména tu skutečnost, že byl v rámci této práce připraven souhrnný referát o možnostech biosenzoru s plazmonovou tezonancí v diagnostice.

K práci samé nemám žádné podstatné připomínky. Výsledky byly většinou publikovány a prošly tudíž oponentním řízením. Mám pouze jedinou poznámku, která se týká zpracování autorského referátu. Ten totiž v podstatě reprodukuje text v samotné práci. Domnívám se, že autorský referát by měl být zpracován tak, aby bylo jasně a hlavně přehledně vidět, v čem je autorův vlastní přínos.

Domnívám se, že tato práce naprosto vyhovuje požadavkům na doktorské práce. Co nejvřeleji proto doporučuji, aby na jejím základě byl Mgr.Haně Vaisocherové udělen titul PhD.

V Praze dne 22.září 2006

