

Posudek na disertační práci Mgr. II. Vaisocherové "Monitoring of Biomolecular Interactions for Nucleic Acid Research"

Původním hlavním předmětem disertační práce bylo studium hybridizace syntetických oligonukleotidů s ohledem na potenciální terapeutické aplikace. Pro řešení tohoto tématu zvolila Mgr. Vaisocherová optimální a netradiční přístup založený na použití SPR senzorů. Na rozdíl od současně používaných metod jsou SPR biosenzory schopné in situ měřit kinetiku hybridizačních reakcí a nabízejí tak dosud nerealizovatelné aplikace při diagnostice defektů v nukleových kyselinách nebo při studiu komplexních interakcí s účastí proteinů a léčiv. Mgr. Vaisocherová našla postupy pro přípravu optimálních sensorických vrstev s imobilizovanými oligonukleotidy pro SPR čipy, které umožnily vytvoření prototypu biosenzoru pro detekci oligonukleotidů a monitorování kinetiky hybridizace (Appendix VIII a IX) a biosenzoru pro vyšetřování komplexních reakcí mezi nukleovými kyselinami a proteiny (Appendix IX, Monitorování aktivity HIV-1 integrázy). Navržené prototypy se mohou stát základem řady nejrůznějších biosenzorů určených pro lékařskou diagnostiku a vývoj léčiv. Možná ještě významnějším příspěvkem do oblasti biosenzorů je soubor prací, ve kterých Mgr. Vaisocherová vyvinula obecné postupy pro přípravu optimálních sensorických vrstev s imobilizovanými proteinovými ligandy (protilátky, antigeny) a nízko-molekulárními antigeny konjugovanými se sérum albuminem. V porovnání se stávajícími biosenzorickými systémy splňují tyto vrstvy mnohem lépe požadavky na přípravu in situ biosenzorů pro reálné praktické aplikace, jako je zachování vazebné aktivity imobilizovaných ligandů a přístupnost vazebných center pro detekované látky, minimální nespecifická adsorpce cizorodých látek, stabilita imobilizace a možnost opakovaného používání senzoru po disociaci zachycených analytů bez ztráty aktivity imobilizovaných ligandů. Nedostatečné splnění těchto požadavků je v současnosti hlavní překážkou pro aplikaci in situ afinitních biosenzorů při analýze biologických tekutin v lékařské diagnostice a biotechnologiích a ochraně životního prostředí. Vyvinuté imobilizační postupy byly následně použity pro přípravu SPR biosenzorů schopných paralelní detekce 4 proteinů relevantních pro lékařskou diagnostiku a senzoru pro detekci protilátek proti Epstein-Barr viru v krevním séru. Zatímco tento druhý typ senzoru naznačuje cestu k reálným biosenzorům pro analýzu tělních tekutin a díky své citlivosti je přímo použitelný pro detekci klinicky relevantních koncentrací protilátek spojených se závažným virovým onemocněním, první typ senzoru je předstupněm k dalšímu vývoji proteinových čipů schopných simultánně monitorovat v reálném čase velké množství interakcí mezi proteiny, proteiny a nukleovými kyselinami, proteiny a léčivy a dalšími látkami. Očekává se, že proteinové čipy budou použitelné při komplexní analýze souborů proteinů v biologických vzorcích, jako jsou tělní tekutiny, tkáňové extrakty nebo buněčné lyzáty, exprese proteinů v geneticky upravených buňkách nebo detekci protilátek v séru souvisejících se specifickým stavem organismu. Monitorování proteinových profilů a mapování proteinových interakcí umožní sledovat známé, ale i dosud nepopsané reakce, signální buněčné dráhy, potenciální místa působení léčiv a tím zjišťovat změny vyvolané onemocněním a kontrolovat působení terapeutických zásahů. V návaznosti na dnes již široce rozpracovanou genomiku využívající DNA čipy tak proteinové čipy slibují principiální pokrok v proteomice a lékařské diagnostice s následným uplatněním v medicíně, biotechnologiích a ochraně životního prostředí.

Podle svých zkušeností splňuje úroveň disertace včetně formálního zpracování nejvyšší požadavky kladené na takové práce v tuzemských VŠ i renomovaných zahraničních univerzitách.

Vzhledem ke značnému významu výsledků práce vztahujících se k vývoji proteinových biosenzorů asi měla být této problematice věnována větší pozornost v úvodní části.

2 technické připomínky:

Na str. 7 dole by "Fig. 2" v závorkách měly být nahrazeny "Fig. 7".
V 1.5. Kinetic aspects by měl být odkaz na Appendix XII.

Je zbytečné podrobně hodnotit vědeckou úroveň a kvalitu získaných výsledků. Vysoká úroveň a podstatný význam pro danou oblast výzkumu je jasně dokumentována ve 12 publikacích v renomovaných mezinárodních časopisech (Appendix I-XII).

Do diskuse o jednotlivých publikovaných výsledcích vybírám pouze několik konkrétních otázek, které jsou zajímavé pro mě a obecně pro výzkumníky zabývající se afinitní detekcí v reálném čase.

Results

3.1. Na str. 18 je mezi testovanými metodami zmíněna imobilizace proteinů na karboxymethyl dextranové matrici, která je v současnosti nejvíce používanou technikou. Můžete porovnat tuto metodu s ostatními, které byly použity?

3.2. (Appendix VII)

Při lékařských aplikacích senzorů detekujících v reálném čase je velkým problémem nespecifická odezva senzoru v kontaktu s nějakou tělní tekutinou. Jak byla velká celková a nespecifická odezva na BSA a sérum u EBNA a CMV povrchu?. Dá se porovnání signálů od těchto dvou kanálů použít pro zviditelnění specifické odezvy na anti-EBNA při nahrazení pufru v měřicí komoře testovaným vzorkem? Jaké jsou klinicky relevantní koncentrace anti-EBNA v takto zředěném séru?

3.4. Immobilization of Oligonucleotides (Appendix IX)

Při velké hustotě imobilizovaného biotinu může docházet k obsazení více než jednoho ze 4 biotin-vazebných center následně imobilizovaného streptavidinu a tím ke snížení jeho schopnosti zachycovat biotinilované molekuly. Byl takový efekt pozorován v studovaném systému?

Výhodou afinitních senzorů založených na hybridizaci ON, na př. při použití proteinových ligandů kovalentně konjugovaných s komplementárním ON, je nedestruktivní regenerace disociací ON páru při zvýšení teploty. Počítáte v budoucnu s měřením v různém teplotním režimu umožňujícím důležité studium disociace nebo s teplotní regenerací?

Str. 28 Uvádíte, že limit pro detekci studovaných ON by 100x nižší než je obvyklé. Je tato hodnota srovnávána s hodnotami publikovanými pro stejné nebo velmi podobné ON?

3.7. HIV-1 Integrase (IN) Activity

Nerozumím dobře pozorovaným procesům. Enzym IN by se po integraci pTS s imobilizovaným SS měl z komplexu uvolnit. Je něco takového senzorem detekováno?

Disertační práce jasně prokazuje předpoklady Mgr. Vaisocherové k samostatné tvořivé práci.

V Praze dne 21.9.2006

