

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Lenky Beranové “Advanced fluorescence techniques applied on biomolecules (lipid membranes and DNA).”

V předkládané doktorské disertační práci se Mgr. Lenka Beranová zabývá studiem vybraných biofyzikálních systémů pomocí moderních fluorescenčních metod. Práce je tvořena pěti publikacemi s doprovodným textem v anglickém jazyce v rozsahu 57 stran a 71 citacemi.

Jádrem disertace jsou 3 původní vědecké práce otištěné v renomovaných vědeckých časopisech (*Lagmuir*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *J. Phys. Chem.*), přičemž na dvou je Mgr. Lenka Beranová uvedena jako první autor. Přiloženy jsou také dvě publikace autorky shrnující principy metod FCS (*Chemické listy*) a FLCS (*Proceedings. of SPIE*).

V úvodní části doprovodného textu autorka vysvětluje principy použitých fluorescenčních technik zahrnujících zejména metody korelační fluorescenční spektroskopie (FCS, FLCS, Z-scan FCS) a metody měření spektrálních posuvů fluorescenčních spekter (TDFS, TRES). V odborné části jsou prezentovány původní vědecké výsledky zabývající se procesem kondenzace DNA a studiem vlivu oxidovaných lipidů a těžké vody na lipidické dvojvrstvy.

Aplikace metody FLCS umožnila sledovat proces kondenzace malých molekul DNA, které není možno pozorovat přímo optickým mikroskopem. V případě interakce DNA se sperminem probíhala kondenzace s rostoucí koncentrací sperminu skokovitě, zatímco s kationickým surfaktantem CTAB docházelo k tzv. zhutnění molekul DNA (z angl. compaction) postupně. Vliv oxidovaných lipidů se zkráceným sn-2 acylovým řetězcem na biofyzikální vlastnosti membrán byl sledován na modelových systémech velkých unilamelárních vesikul tvořených lipidem POPC. Metodou TDFS používající fluorescenční sondy citlivé na změnu polárnosti svého mikrookolí bylo zjištěno, že přítomnost oxidovaných lipidů v membráně vede k její vyšší hydrataci, metodou Z-scan FCS bylo v poškozené membráně pozorováno zvýšení rychlosti laterální difuze fosfolipidů. Pomocí molekulárně dynamických simulací byla též diskutována orientace poškozených řetězců oxidovaných lipidů v membráně. Při studiu membrán vedla náhrada H<sub>2</sub>O za D<sub>2</sub>O k relativně malým změnám jejich vlastností. Metodou TDFS bylo zjištěno, že oblasti polárních hlaviček membrán vykazují při použití D<sub>2</sub>O menší hydrataci a také menší pohyblivost. Měření

anizotropie fluorescence a použitím metody dvouohnskové FCS byly u zkoumaných membrán nalezeny malé změny v parametru uspořádání a v laterální difuzi lipidů.

Z formálního hlediska nemám k práci žádné námitky. Práce je sepsána velmi dobrou angličtinou a má hezkou grafickou úpravu. Snad jen obrázky č.13 a 15 mohly být pro lepší orientaci čtenáře zpracovány přehledněji.

Z odborného hlediska je možno konstatovat, že aplikací špičkových spektroskopických technik se podařilo Mgr. Lence Beranové získat řadu původních vědeckých výsledků a tyto výsledky úspěšně publikovat v kvalitních zahraničních časopisech. Není pochyb, že výsledky dosažené v oblastech studia kondenzace DNA a vlastností biologických membrán posunují vědecké bádání v těchto oblastech kupředu.

K práci mám tyto poznámky a dotazy:

- 1) V mikroskopických měřeních je velmi častým jevem nízká intenzita fluorescence ze sledované oblasti vzorku případně její vybělování v časových měřeních. Bylo třeba efekt vybělování v korelačních experimentech nějakým způsobem korigovat?
- 2) Všechny prezentované experimenty byly provedeny na modelových systémech. Bylo by možné některé z experimentů (např. pozorování kondenzace DNA) provést přímo na živých buňkách?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená práce splňuje podle mého názoru kriteria, která jsou na doktorskou práci kladena. Práci hodnotím kladně a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze 10. září 2013



Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.