

Oponentský posudek disertační práce Ing. Pavla KIELKOWSKIHO „Nové funkcionalizované nukleové kyseliny pro aplikaci v chemické biologii (New functionalized nucleic acids for application in chemical biology)“

Disertační práce Ing. Pavla Kielkowskiego řeší vysoce aktuální problematiku důležitou pro poznání chemie nukleových kyselin. Konkrétně se jedná se o syntesu modifikovaných 2'-deoxyribonukleosidů a nukleotidů, které jsou substituované v pozici 5 pyrimidinů a pozici 7 7-deazaadeninů další nukleobazí. Dále pak syntesu sady (trialkylsilyl)ethynyl modifikovaných 7-deaza-2'-deoxyriboadenosinů a jejich trifosfátů. Připravené deriváty byly následně využity pro studium jejich inkorporace do DNA, včetně sledování efektivity jejich inkorporace oproti inkorporacím přirozených substrátů. Dále pak studium interakcí připravených modifikovaných molekul DNA s enzymy, které jsou esenciálních pro modifikaci DNA v epigenetických procesech *in vivo*, DNA-methyltransferasami. Důležité jsou i studie vykonané kandidátem v oblasti vývoje nových metod využitelných v přechodné ochraně DNA proti štěpení DNA restrikčními endonuklasami.

Deriváty stavebních kamenů DNA byly připraveny klasickými chemickými syntesami, a modifikované DNA pak enzymovými reakcemi využívanými pro inkorporaci syntetisovaných modifikovaných deoxynukleotidů do DNA. Modifikované deriváty deoxynukleosidů, deoxynukleotidů a modifikované DNA byly detailně charakterizovány pomocí řady metod, jako jsou elektroforesa na polyakrylamidovém gelu, nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní analýza („electrospray ionization“) a metody spektroskopické (měření IR spekter). Téma práce je vysoce aktuální, neboť syntetisované sloučeniny jsou slibné pro využití ve studiu vlastností přirozených molekul DNA a jejich strukturních změn po interakci s látkami fyziologického i nefyziologického původu. Z tohoto hlediska je tedy předkládaná disertační práce významnou studií.

Selekce připravovaných sloučenin se jeví jako racionální pokračování předchozích studií laboratoře, kde byla disertační práce vypracovávána. Metody přípravy derivátů nukleotidů nesoucích zmíněné funkční skupiny lze považovat za vhodné pro efektivní syntesu navržených modifikovaných složek DNA. Synthetisované deriváty pak byly využity pro inkorporaci do DNA (modifikovaných DNA) prostřednictvím enzymových reakcí pomocí experimentů "primer extension" (PEX) nebo polymerasové řetězové reakce (PCR). Použity byly různé DNA polymerasy, aby se docílila produkce optimálního množství produktu. Navržené sloučeniny, které byly syntetisovány výše uvedenými postupy a enzymově katalyzovanými reakcemi, byly připraveny v takovém množství produktů, jež bylo dostatečné

pro jejich charakterizaci. Positivně hodnotím výběr syntesy tzv. „dvouhlavých“ 2'-deoxynukleosidů, které mohou sloužit ke studiu interakcí DNA s DNA-methyltransferasami. Připravené sloučeniny tedy mohou být využity pro analýsy slibné pro studium vztahů mezi strukturou DNA a její funkcí v buňkách. Zvolené téma disertační práce Ing. Pavla Kielkowského je tedy užitečné a využitelné pro další studie.

Z disertační práce je patrné, že autor je kvalitním pracovníkem, který se rozhodně uplatní v řadě laboratoří pro syntézu organických sloučenin. Z práce jasně vyplývá, že musel zvládnout širokou škálu metodik, které jsou pro syntézu a charakterizaci chemických vlastností výše uvedených sloučenin nezbytné. Ať je to syntéza jednotlivých intermediátů sloučenin i enzymově katalyzovaná příprava finálních produktů modifikovaných DNA, tak i jejich další charakterizace rozličnými metodami (viz výše uvedené). Positivně hodnotím využití enzymových reakcí pro inkorporace syntetizovaných modifikovaných deoxynukleotidů do DNA a sledování jejich vlastností pomocí elektromigračních metod.

Výsledky disertační práce Ing. Pavla Kielkowského odpovídají vytčeným cílům. Hodnocení práce mě usnadnila skutečnost, že většina výsledků již byla publikována ve formě čtyř časopiseckých publikací v renomovaných vědeckých časopisech s vysokou hodnotou impaktového faktoru (Angew. Chem. Int Ed., IF₂₀₁₁ 13.455, IF₂₀₁₃ 11.336, J. Org. Chem., IF₂₀₁₁ 4.450 a ChemBioChem, IF₂₀₁₃ 3.060). Tato skutečnost plně dokumentuje opravdu vysokou vědeckou kvalitu disertační práce. Na všech těchto publikacích je kandidát prvním autorem. To ukazuje i jeho vysoký podíl na uvedených publikacích. Výsledky práce disertanta proto hodnotím velmi vysoko.

Disertační práce Ing. Pavla Kielkowského je jak po stránce formální tak i obsahové velmi kvalitně vypracována. I když výsledky již byly publikovány, je psána klasickým způsobem, používaným pro doktorské disertační práce. Je psána kvalitní angličtinou, srozumitelně a používané metody i získané výsledky jsou detailně popsány a výsledky adekvátně diskutovány. Z disertační práce je patrné, že kandidát je kvalitně připraven pro vědeckou práci ve studované oblasti a bude, dle mého názoru, platným členem laboratoří zaměřených na syntézu organických sloučenin. Z celkového řešení zvolené problematiky je zcela evidentní, že nejen kandidát, Ing. Pavel Kielkowski, ale i školící pracoviště, kterého je členem, jsou na vysoké úrovni.

K práci mám následující dotazy, které předkládám především jako podklad pro diskusi:

- 1) Podobně jako v předchozích pracích laboratoře, kde byla disertační práce vypracována, je možné, že by připravené sloučeniny mohly být využitelné v biomedicínálním výzkumu. V

tomto směru je však vhodné znát jejich účinky na organismy. Můj dotaz směřuje k tomu, zda sloučeniny připravené v předkládané práci i deriváty DNA připravené v předchozích pracích, byly testovány z hlediska potenciální toxicity.

- 2) V práci byly pro inkorporaci připravených sloučenin do DNA užity různé DNA polymerasy. S potěšením konstatuji, že v předkládané disertační práci již byly s některými sloučeninami provedeny kinetické studie jejich inkorporace do DNA pomocí těchto DNA polymeras (zjištěny byly hodnoty K_m , V_{max} , atd. – viz Tab. 19 na str. 80), které v předchozích pracích absentovaly. Z popisu uvedeného v experimentální části práce však není jasné, jak byly zjištěny optimální koncentrace použitých DNA polymeras. V jakém koncentračním rozmezí byly DNA polymerasy testovány a jak byly zjištěny jejich optimální koncentrace pro inkorporační reakce? Prosím o vysvětlení. Pro kinetické studie je rovněž důležitá znalost závislosti rychlosti enzymové reakce na době inkubace s enzymem. Mohl by autor o těchto kinetických studiích informovat? Dále je pro enzymové reakce esenciální i vliv pH na rychlost dané reakce. Závisí rychlosti reakcí katalysovaných DNA polymerasami při využití modifikovaných nukleotidů na pH a jak? Znalost všech těchto skutečností je zásadní pro sledování inkorporace nově připravených sloučenin do DNA.
- 3) V experimentech sledujících kompetitivní inkorporace některých připravených derivátů s přirozenými protějšky byly zjištěny zajímavé výsledky prokazující, že syntetisované deriváty jsou lepšími substráty než přirozené deoxynukleotidy (např. $dA^{Ph}TP$ oproti $dATP$). Byly tyto poznatky ověřeny validními kinetickými studiemi, kde lze přímo určit inhibiční konstanty K_i ?

Závěr:

Disertační práce Ing. Pavla Kielkowskího je kvalitní vědeckou prací. Dle mého názoru práce rozhodně splňuje požadavky kladené na práce obdobného typu. Přináší původní vědecké výsledky, které již také byly publikovány. Proto ji doporučuji k přijetí k obhajobě. Doporučuji rovněž, aby byl na základě úspěšné obhajoby předložené práce Ing. Pavlu Kielkowskému udělen, dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb., akademický titul doktor ve zkratce **Ph.D.** v oboru **Organická chemie**.

V Praze, 7. 10. 2014

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze