

Posudek na doktorskou disertační práci s názvem „In situ study of nucleic acids interactions key for gene expression and therapy based on its silencing“ Mgr. Tomáše Špringera.

Obečným cílem práce bylo přispět k pochopení interakcí mezi nukleovými kyselinami (NK) pomocí in situ studia interakce mezi vybranými sekvencemi nukleotidů prostřednictvím SPR spektroskopie. Autor si správně uvědomil, že pro hodnocení interakcí je podstatné co nejspolehlivěji určit asociační k_a a disociační k_d rychlostní konstanty tvorby komplexů oligonukleotidů (ON), které lze vypočítat z měření kinetiky v reálném čase metodou SPR. Na rozdíl od rovnovážné asociační konstanty K_A nelze tyto konstanty určit nepřímými metodami obvykle používanými ke studiu NK interakcí. Platnost hodnot K_A vypočtených z SPR experimentů byla ověřena srovnáním s publikovanými hodnotami získanými jinými metodami metodou. Autorovi se podařilo výrazně zpřesnit kinetická měření konstrukcí nového mikrofluidního systému (dispersionless microfluidics, kapitola 4.1.), který do velké míry odstraňuje problémy způsobené směřováním roztoku při měření kinetiky reakcí při použití konvenční mikrofluidiky. Nový mikrofluidní systém, jehož účinnost při měření hybridizace oligonukleotidů byla dostatečně prokázána v této disertaci, může obecně usnadnit in situ studium mezimolekulárních interakcí afinitními biosensory. V kapitole 4.2 bylo studováno oslabení stability komplexu vytvořeného hybridizací ON imobilizovaným na SPR povrchu (sonda) s komplementárním nebo jen částečně komplementárním ON z testovaného roztoku („cíl“) působením odpuzivých elektrostatických sil mezi záporně nabitým cílem a sousedními imobilizovanými sondami a vliv koncentrace monovalentních Na^+ a divalentních Mg^{2+} kationtů v roztoku na tyto interakce je popsáno. Za důležitý výsledek lze považovat zvyšování koncentrace imobilizovaných sond v přítomnosti kationtů v imobilizačním roztoku, proměření zvyšující se stability komplexu v při zvyšování koncentrace kationtů, zejména Mg^{2+} , zesílení vlivu odpuzivých sil při zvyšování koncentrace zachycených cílových ON a nalezení optimálního iontového složení roztoku kterým lze dosáhnout nejlepší rozlišení komplementárních a částečně komplementárních ON při vysoké stabilitě komplexů. Výsledky mají podstatný význam pro SPR biosensory i pro v současnosti intenzivně používané DNA čipy (DNA array).

Kapitola 4.3. se zabývá výzkumem vlastností nových chemicky modifikovaných oligonukleotidů, které by mohly sloužit jako léky proti HIV. V experimentech byl využit nový dispersionless microfluidics systém a poznatky popsané v kapitole 4.2. Modifikované ON byly připravovány spolupracující skupinou z ÚOCHB AVČR, tak jak je to běžné v multidisciplinárním výzkumu. Modifikované anti-TAR oligonukleotidy byly odvozeny od struktury RNA aptameru R06, jehož léčivý účinek spočívá v tvorbě komplexu s oligonukleotidovým TAR motivem ve struktuře viru (kissing complex). V disertaci byla hodnocena tvorba a stabilita komplexů mezi imobilizovanou TAR sondou a cílovými anti-TAR oligonukleotidy podle rychlostních k_a , k_d a rovnovážných K_a , K_A , K_d a K_D asociačních a disociačních konstant vypočtených z SPR měření (konstanty označené různými symboly by měli být vysvětleny v kapitole 3.2.). Významným výsledkem této části disertace jsou hodnoty asociačních a disociačních konstant mezi TAR sondami a 63 modifikovanými anti-TAR oligonukleotidy vypočtené z příslušných SPR měření. Na základě těchto údajů bylo možné analyzovat míru vlivu různých chemických modifikací provedených na nukleotidech situovaných na různých místech anti-TAR oligonukleotidové sekvence na tvorbu a stabilitu komplexu s TAR sondou. Hlubší náhled o příčinách destabilizace způsobené chemickými modifikacemi byl získán molekulární dynamickou simulací. Získané poznatky by mohly být použity pro navrhování nových léčiv proti HIV i léčiv založených na tvorbě ON komplexů pro genovou terapii.

Kvalita i význam předkládané práce je dostatečně dokumentován 9 publikacemi v impaktovaných časopisech. U pěti z nich je Mgr. Špringer prvním autorem

Disertační práce prokazuje předpoklady Mgr. T. Špringera k samostatné tvořivé práci.
Doporučuji přijmout práci k obhajobě.
V Praze 27.4.2015

RNDr. Eduard Brynda, CSc.

Otázky a komentáře

Jaký je fyzikální princip „stacking interactions“ mezi bázemi?

3.1.3V následujících kapitolách je vždy odkazováno na popis použité modifikace SPR povrchu imobilizovaným streptavidinem (SA) uvedený v části 3.1.3. Popis uvedený na str. 28 je nedostatečný, aniž by si jej čtenář vyhledal v publikaci [98]. Pro všechny další kapitoly je důležité znát koncentraci imobilizovaného SA, která opět závisí na koncentraci karboxylových skupin na povrchu SAM. Jedinou zmínku o koncentraci SA jsem objevil až na str.57.

Str.29 DNA a ON hybridizace je multivazebná reakce, během které každý pár bází může asociovat a disociovat, zejména při tvorbě ne zcela kompatibilních komplexů. Může tím být ovlivněn „pseudo first-order“ model kinetiky?

Jaký model je používán v BIAevaluation software ?

Jaký je vliv K^+ na hybridizaci? Při genové terapii působí ON léčiva uvnitř buňky, kde koncentrace K^+ může být vysoká.

Na str.30 jsou zavedeny asociační k_a a disociační k_d , které lze vypočítat z měření kinetiky tvorby a disociace komplexů a rovnovážná asociační konstanta K_A . V kapitole 4.3.2. jsou používány také rovnovážné asociační a disociační konstanty značené různými symboly, které by měly být předem vysvětleny v teoretické části.

4.1.3. Obr. 23 ukazuje měření kinetiky s použitím konvenčního a dispersionless microfluidics systému. Odezva zahrnuje smíchání roztoků a zachycování cílových ON. Jak vypadá odezva na samotnou výměnu roztoku s různým indexem lomu (různá koncentrace solí)?

Str.51 Co je vše zahrnuto do „interaction layer“? Jak se vypočítala její tloušťka?