

## **Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Jiřího Demutha:**

### **Studium azaftalocyaninů jako zhášče fluorescence v oligonukleotidových sondách.**

Disertace je předložena formou komentáře k 3 publikacím, publikovaných v respektovaných mezinárodních časopisech s rigorózním recenzním řízením, což zaručuje vynikající kvalitu výsledků. Tato forma prezentace je ale z mého pohledu nestandardní a nepříliš vhodná pro disertaci - zejména proto, že není úplně zřejmé, které konkrétní experimenty z těch publikací prováděl disertant sám, a které části byly provedeny spoluautory (i když je to částečně vysvětleno vymezením podílu disertanta v kap. 8). Očekával bych také, že u disertace bude více prostoru k diskuzi i případných neúspěšných pokusů, optimalizace syntéz a dalších aspektů, které se do publikovaných prací nevešly - bohužel tato šance zde využita nebyla. Co se mi ale na disertaci naopak velice líbilo, je úvod do problematiky, který je velice přehledný a čtivý a při jeho čtení jsem se i v leccm přiučil.

Vlastní výsledky dizertace zahrnují syntézu cca. 15 nových derivátů azaftalocyaninů, jejich připojení k oligonukleotidovým sondám, studium fotofyzikálních vlastností samotných fluoroforů i jejich ODN-konjugátů (zejména zevrubné studium tvorby a rozkladů J-dimerů) a potom aplikace jako zhášče fluorescence při qPCR. U syntetické části mi chyběla hlubší diskuze výtěžků a obtížnosti separací produktů. U studia fotofyzikálních vlastností zase chyběla diskuze efektu substituentů. Naopak studium tvorby a rozkladu agregátů bylo provedeno a je i diskutováno velmi zevrubně – jen je škoda, že disertant pouze zkopíroval velmi hutné a malé obrázky přímo z publikací, které se kvůli miniaturní velikosti dosti špatně čtou. Aplikace v qPCR je velmi zajímavá, ale je otázka, zda může skutečně konkurovat komerčním kitům.

Přes výše uvedené výhrady k předložené disertaci se nepochybně jedná o velmi kvalitní a komplexní vědecké dílo. Disertant musel zvládnout celou paletu metodik od syntézy až k fotofyzikálním měřením. Proto jeho disertaci doporučuji k obhajobě a dalšímu řízení k udělení titulu PhD.

K práci mám následující dotazy a podněty k diskuzi:

1. Disertant by měl v diskuzi explicitně vymežit, které části experimentů z uvedených 3 publikací neprovedl on sám, ale byly provedeny některými ze spoluautorů.
2. Prosím zhodnoťte a porovnejte syntézy pyrazinových prekurzorů i finálních azaftalocyaninů a komentujte i separaci produktů.
3. Prosím zhodnoťte vliv různých substituentů na fotofyzikální vlastnosti látek – dají se tyto vlastnosti jemně ladit pro konkrétní aplikace ?
4. Lze využít FAM-ODN-7Zn konjugát využít i jako přímou hybridizační sondu pro stanovení přítomnosti komplementární sekvence DNA nebo RNA (bez PCR amplifikace) ?
5. Máte v plánu nějak aplikačně využít rozklad J-dimerů pyridinem ?
6. Vzhledem k rozsáhlé spolupráci s firmou Generi Biotech se nabízí otázka, zda některé ODN konjugáty hodláte aplikovat i v některých komerčních kitech - prosím o komentář.