

# Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě  
Univerzity Karlovy v Praze

- posudek vedoucího       posudek oponenta  
 bakalářské práce       diplomové práce

Autor/ka:                      Bc. Pavla Ottová  
Název práce:                Mikrokolorimetrické studium termodynamické stability hybridních  
komplexů nukleových kyselin  
Studijní program a obor:      Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika  
Rok odevzdání:                2009

Jméno a tituly vedoucího/opponenta: RNDr. Hana Vaisocherová, Ph.D.  
Pracoviště: Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, v. v. i., Praha  
Kontaktní e-mail: vaisocherova@ufe.cz

## Odborná úroveň práce:

- vynikající    velmi dobrá    průměrná    podprůměrná    nevyhovující

## Věcné chyby:

- téměř žádné    vzhledem k rozsahu přiměřený počet    méně podstatné četné    závažné

## Výsledky:

- originální    původní i převzaté    netriviální kompilace    citované z literatury    opsané

## Rozsah práce:

- veliký    standardní    dostatečný    nedostatečný

## Grafická, jazyková a formální úroveň:

- vynikající    velmi dobrá    průměrná    podprůměrná    nevyhovující

## Tiskové chyby:

- téměř žádné    vzhledem k rozsahu a tématu přiměřený počet    četné

## Celková úroveň práce:

- vynikající    velmi dobrá    průměrná    podprůměrná    nevyhovující

## Slovní vyjádření, komentáře a připomínky oponenta:

Předkládaná diplomová práce se zabývá zavedením nové metodiky založené na diferenční skenovací kalorimetrii (DSC) pro stanovení termodynamických parametrů tvorby komplexů nukleových kyselin s možným přímým využitím pro výběr vhodných antisensních terapeutik. Práce je psána velice přehledně a je dobře strukturovaná.

V úvodní části práce je shrnuta teorie tvorby komplexů nukleových kyselin včetně termodynamické charakterizace. Úvodní část také obsahuje výčet dnešních oligonukleotidových terapií a detailní popis principu funkce antisensních modifikovaných oligonukleotidů a teoretické základy metody diferenční skenovací mikrokolorimetrie. V experimentální části je detailně popsán instrument, příprava vzorků a postup zpracování dat včetně rozpisu termodynamických modelů použitých pro fit experimentálních dat.

Výsledková část práce je rozdělena do tří ucelených částí. První soubor experimentů byl proveden s modelovým přirozeným autokomplementárním oligonukleotidem s cílem odhalit limity použité metody a stanovení vhodné metodiky pro určování termodynamických parametrů tvorby komplexů NK. Bylo přitom potřeba překonat řadu dílčích problémů, souvisejících např. s adsorpcí oligonukleotidů na přívodní hadičky, tvorbou bublin, celkovou reprodukovatelností skenů či hysterézními efekty. Vyřešení těchto problémů obnášelo provedení řady zdlouhavých experimentů a velice kladně hodnotím preciznost přístupu adeptky k řešení těchto otázek. Na závěr této části byla zoptimalizována metodika měření a zpracování dat pro stanovení termodynamických parametrů.

Druhá část navazuje na předchozí výsledky a s pomocí optimalizovaného postupu byla provedena termodynamická charakterizace hybridizačních schopností vybraných modifikovaných oligonukleotidů s polymerní RNA. Vedle standardního dvoustavového termodynamického modelu bylo velice zajímavé použití komplexního McGhee-von Hippelova modelu, který odhalil vysokou kooperativitu vazby krátkých oligonukleotidů na dlouhý polymerní řetězec.

Posledním systémem, který byl studován pomocí DSC, byly RNA vlásenky. Byly určeny termodynamické parametry přechodů otevření TAR vlásenky (část RNA viru HIV-1) a příslušného aptameru R06. Byl také studován systém obsahující směs obou vlásenek. Složitost systému, který obsahoval více přechodů, sice neumožňovala stanovení termodynamických parametrů, přesto tyto pilotní experimenty poukázaly na stabilizující efekt komplexů vlásenek na samotné vlásenky.

Podle mého názoru se jedná z hlediska zavedení nové metodiky a její aplikace na vybrané systémy oligonukleotidů o kvalitní diplomovou práci. Výsledky mohou být velice přínosné pro další mikrokolorimetrické studie termodynamických charakteristik biomolekul.

## Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

Můj první dotaz se týká volby nukleové kyseliny pro otestování metody a zavedení metodiky. Byl nějaký specifický důvod pro výběr právě DNA autokomplementárního oktameru jako modelového systému pro testovací mikrokolorimetrická měření? Byla např. zvažována délka a sekvence tohoto modelového oligonukleotidu?

Jsou termodynamické parametry studovaných hybridních komplexů modifikovaných oligodeoxythymidinů s RNA získané pomocí DSC srovnatelné s výsledky změřenými jinou metodou, např. pomocí UV absorpce? Je patrná minimálně kvalitativní shoda?

Byly navrženy přístupy k řešení instrumentálních problémů, např. extrapolace na nulový čas pobytu vzorku v kyvetě související s adsorpcí NK na stěny přívodních trubiček nebo přístup k řešení hysterézních efektů. Jsou v literatuře zmíněny tyto problémy, a jak se autoři celkově staví k těmto otázkám při prezentaci naměřených dat?

**Práci**

doporučuji

nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

**Navrhuji hodnocení stupněm:**

výborně  velmi dobře  dobře  neprospěl/a

Místo, datum a podpis oponenta:

Praha, 7. září 2009



