

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Prírodovedecká fakulta



Doc. RNDr. Viktor Víglaský, PhD.

Moyzesova 11, 040 01 Košice

tel.: +421 (055) 234 1262, fax: +421 (055) 622 21 24, IČO: 00397768

e-mail: viktor.viglasky@upjs.sk, <http://www.science.upjs.sk>

Doc. RNDr. Peter Mojžeš, CSc.

Fyzikální ústav, Oddělení

fyziky biomolekul

Matematicko-fyzikální fakulta

Univerzity Karlovy

Ke Karlovu 3

Praha

Posudok na doktorskú dizertačnú prácu Mgr. Jána Plackého: „Studium biologicky významných nekanonických štruktúr nukleových kyselín v komplexech s kationickými porfyrínami“.

Vzhľadom k tomu, že predložená doktorská dizertačná práca je na vysokej úrovni a je len málo toho, čo v tejto práci možno vytknúť, dovoľm si vo svojom posudku byť viac kritický a poukázať skôr na to, čo by pomohlo autorovi túto prácu ešte vylepšiť.

Obsah práce je skutočne rozsiahly, kde autor preukázal svoje teoretické a praktické znalosti. V práci je odkaz na viac ako 400 literárnych zdrojov. V súčasnosti existuje viac ako 2500 rôznych vedeckých publikácií s odkazmi na G-kvadruplexy, a J. Palacký sa v tejto spleti vedeckých informácií nestratil. Vysoko oceňujem výskyt malého počtu preklepov a technických chýb aj napriek písaniu celej práce v anglickom jazyku.

Úvodná kap. 1.1 na str. 10-17 síce nie je na škodu, ale osobne nepovažujem za potrebné popisovať v danom kontexte v takomto rozsahu A, B a Z štruktúru ako aj torzné uhly v rámci DNA molekúl. V teoretickej časti sa autor ďalej sústreďuje na popis nekanonických štruktúr, tzv. G-kvadruplexy. Autor analyzuje štruktúrne vlastnosti G-kvadruplexov, štruktúrny polymorfizmus v závislosti od sekvencie a typu iónov, ich stabilitu, kinetiku ich tvorby a biologický význam takýchto štruktúrnych motívov v živých systémoch, kapitoly 1.2.-1.5. Práve v týchto častiach je vidieť aj vyzretý biofyzikálny náhľad autora na študovanú problematiku. Dokázal spojiť i zdanlivo kontradiktívne informácie a vyvodiť z nich správne závery. Autor napríklad poukazuje nato, že tvorba G-kvadruplexov do značnej miery závisí od vonkajších a vnútorných parametrov, ako sú napríklad samotná sekvencia, jej koncentrácia, prítomnosť iónov, voľba tlmivého roztoku (buffer) rýchlosť ohrevu a ochladzovania a súčasne poukazuje na faktory, ktoré významne vplyvajú na správnu interpretáciu dát.

V kapitole 1.5.2 autor poukazuje na fakt, že aj repetície, z ktorých je možná tvorba iných nekanonických, tzv. „non-B“ DNA štruktúrnych elementov, odlišných od G-kvadruplexov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri regulácii DNA asociujúcich procesoch, výsledkom čoho je pozmenený celkový osud buniek. Zvyčajne sa sleduje úzky súvis medzi neurologickými ochoreniami a expanziou určitých typov repetícií v DNA. V konečnom dôsledku dochádza aj k zvýšenej predispozícii tvorby takýchto „non-B“ štruktúr, kde sa môžu vyskytnúť okrem Watson-Crickovho aj Hoogsteenove párovanie jednotlivých báz.

Autor sa sústredil na popis práve tých ligandov, ktoré naďalej využil v experimentálnej časti. Kap. 1.5.1, ale podľa môjho názoru by bolo vhodné uviesť aspoň krátku zmienku o ich afinite k DNA a porovnanie týchto afinít medzi sebou a inými ligandmi.

Osobne by som kapitolu 1.5.3 venujúcu sa G-kvadruplexovým aptamérom nezaradil ako podkapitolu ku kap. 1.5., ale ako samostatnú kapitolu 1.6. alebo až za kapitolou 1.5.4. Kapitola 1.5.4 logicky „sedí“ viac ku kapitole 1.5.1., kde už autor načrtol vplyv špecificky sa viažucich ligandov na telomérne repetície.

Popis experimentálnych techník, ktoré sa využívajú pri štúdiu nekanonických štruktúr je popísaný jasne a zrozumiteľne, kap. 1.6. UV absorpčná spektroskopia sa opiera o ťažiskové práce pochádzajúcich z „dielne“ Jean-Louis Mergnyho.

Na str. 54- 57 autor poukazuje na to, že CD signál nemusí odzrkadľovať len orientáciu jednotlivých reťazcov v G-kvadruplexe, ale to, či je pozitívny signál buď pri 265 alebo 295 nm závisí predovšetkým od vzájomného usporiadania G-kvartetov, stacking.

Kapitola č.2 „Materiál a metódy“ je popísaná prehľadne bez nejakých vážnejších nedostatkov, obzvlášť oceňujem časť 2.2. venovanú výpočtovej analýze SVD. Aplikácia SVD metódy a správna interpretácia výsledkov z takejto analýzy vyžaduje určitý cit pre daný problém. Je len málo laboratórií vo svete, kde sa práve takéto analýzy prevádzajú. Možno by uvedenie jednoduchého príkladu s dosadením konkrétnych hodnôt pomohlo k pochopeniu celej analýzy a jej potenciálu podobne ako to robí J.B.Chaires.

Čo sa týka výsledkov v Kap. 3.0, tak niektoré z nich už prešli oponentským konaním nakoľko ide o sumarizáciu už publikovaných výsledkov v renomovaných časopisoch. Kvalita publikovaných výstupov je nespochybniteľná. Okrem toho, že výsledky boli publikované v kvalitných vedeckých časopisoch, autor spolupracoval s ľuďmi s vysokým kreditom v danej oblasti štúdia a nemôžem nespomenúť i to, že J. Palacký je/bol vedený školiteľom, ktorý ho nasmeroval a viedol tak, že nepochybujem o tom, že v blízkej budúcnosti bude o neho veľký záujem na trhu práce. V súčasnosti je len veľmi málo prác, dajú sa spočítať na prstoch jednej ruky, ktoré využívajú Ramanovu spektroskopiu v spojitosti SVD v oblasti štúdia G-kvadruplexov. Tým je v podstate determinovaná aj originalita vedeckého prístupu v predloženej práci J. Palackého.

Metodológia Ramanovej spektroskopie v spojitosti SVD bola odladená a dokonca bola aplikovaná priamo na vakuolách v bunkách, tieto výsledky boli opublikované v dvoch časopisoch, *J. Raman Spectroscopy* 2011, zv. 42 a *Spectroscopy: An International Journal* 2012 zv. 27. Potenciál SVD metódy v spojení s Ramanovou spektroskopiou naplno aplikoval v poslednom vedeckom článku v *Nucleic Acids Research* na modelovom systéme intramolekulového G-kvadruplexu odvodeného od ľudskej telomérnej sekvencie, kap. 3.2 a príloha na str. 195-220. Oceňujem i doplňujúce metodiky, ktoré často využíva i dr. Vorlíčková z Biofyzikálneho ústavu v Brne. Trochu by som bol opatrný pri porovnávaní spektier s elektroforetickými záznamami pri koncentračnej závislosti študovaného oligonukleotidu, pretože tu nastáva menší problém hlavne s nerovnovážnymi podmienkami počas elektroforetickej separácie. Dovolím si poznámku aj ku práci v *NAR*. Krivkám v grafoch chýbajú doplňujúce informácie, ktoré výrazne uľahčujú orientovať sa vo výsledkoch, napr. obr. 39. V podobných prácach od iných autorov je to vždy jasne determinované. Napr. popis pod legendou, kde sa jasne deklaruje, ktoré krivky reprezentujú ohrev a ochladzovanie, čitateľ sa môže len domnievať, že červená krivka reprezentuje ohrev a modrá ochladzovanie. Vôbec nie je jasné, ktoré spektrum odpovedá konkrétnym subspektrám S_i a čo bolo kritériom ich výberu. Absencia týchto informácií je pre nezainteresovaného čitateľa veľkým hendikepom a hlavne ju badať v kap. 3.3.

Pomerne veľký priestor vo výsledkovej časti je venovaný ďalším dvom problémom:

a) interakcii G-kvadruplexov s porfyrínmi, kap. 3.3 a b) derivátom odvodených od TBA aptaméru, kap. 3.4.

V kapitole 3.3 je ešte cítiť, že výsledky sú relatívne čerstvé a autor z nich ešte nevyextrahoval tzv. najrelevantnejšie informácie. Okrem už uvedeného vyššie, v obr. 41 chýba popis y-ovej osi, obr. 42-48, nie je jasné, čo reprezentujú S_1 - S_4 subspektra. Čitateľ sa len môže

domnievať, že tieto subspektra sú prevedené za prítomnosti rôznych iónov. Interakcia CuTMPyP4 s KRAS a TBA je rozdielna, ale neprístupoval by som k takémuto záveru hlavne na základe rozličného stupňa hysterézie, pretože aj pôvodné spektra bez toho ligandu vykazujú rôznu stupeň hysterézie.

Podľa môjho názoru práve úvodné strany v kap. 3.4 venované TBA by sa skôr hodili do úvodných kapitol a tejto časti by som ponechal len časti s experimentálnymi výsledkami a ich diskusiu. Ničmenej výsledky tejto časti poukazujú na fakt, že doteraz publikované výsledky rôznych autorov s TBA a inými kvadruplex-tvoriacimi sekvenciami zanedbávali do značnej miery existenciu napríklad dimérnych foriem tohto kvadruplexu, ktorý je priamo závislý od koncentrácie DNA, a tým pádom vysvetľujú aj príliš veľký rozptyl termodynamických parametrov získaných v rôznych zdrojoch. Navyše autor uvádza, že aj výsledky, získané NMR, podporujú toto tvrdenie. Veľmi kriticky postoj k získavaniu termodynamických údajov z nepriamych spektrálnych meraní bol v poslednom čase mnohokrát prezentovaný aj J.B. Chairom. Preto oceňujem, aj keď sú to toho času tieto výsledky ešte nepublikované, že takáto práca bude čoskoro aj opublikovaná. Osobne by som pri vysokých koncentráciách DNA a vyšších ionových silách nevytlúčil tvorbu intermolekulových štruktúr ako sú okrem duplexov, DNA triplexy, tetramolekulové štruktúry, atď., a navyše keď už má autor zvládnutú techniku analýzy dát pomocou SVD, napr. str. 123 a 131 obr. 57, určite by to nebol problém zahrnúť tento fakt do svojich výpočtov. V záverečnom zhrnutí autor viacmenej vylučuje tvorbu tzv. hairpin-like TBA dimérov na základe výsledkov s reverzibilitou, tu by som bol tiež opatrný, tieto štruktúry by mali byť podľa niektorých simulácií veľmi stabilné a ich úplné vylúčenie by som podporil aj napríklad chemickým alebo enzymatickým štiepením.

Menšiu poznámku mám ku chronológii výsledkov a radeniu obrázkov, napr. interakciu TBA s porfyrínmi by som neuvádzal už na str. 128, do tejto časti, ale určite by som ju zaradil až za elektroforetické merania, zahmlieva sa tým hlavná myšlienka podstaty študovaného deja a hlavne ľahkosť čítania a pochopenia pre menej zainteresovaného čitateľa.

Záverečné zhrnutie podáva ucelený nadhľad, ale postrádam tam určitú víziu, odkaz do budúcnosti, akým smerom sa bude autor uberať.

Ďalšie odporúčania:

Str.58. Pod skratkou FRET sa často myslí aj Fluorescence resonance energy transfer, avšak často sa označuje vzdialenosť, kde ešte dochádza k účinnému FRET, ako Försterova vzdialenosť.

Str. 62. Podľa môjho názoru mohol autor v práci okrem veľmi stručného popisu metódy SERS dodať aspoň schematický náčrt podstaty tejto metódy, nakoľko je práve táto metóda v poslednom období využívaná čoraz častejšie.

Str. 70. Okrem spomínaných metód by som spomenul ešte do značnej miery rozšírenú metódu AFM.

Autor tvrdí v práci na dvoch miestach, že trimérne kvadruplexy neboli pozorované, avšak to nie je úplná pravda.. vid' napr. prácu: Rosu F. et al. Nucleic Acids Res. 2010 Aug;38(15):5217-25. doi: 10.1093/nar/gkq208. Nie je jediný dôvod, prečo by takéto troj-molekulové systémy nemali existovať.

Pripomienky:

Menšiu pripomienku mám k písaniu latinských rodových a druhových mien živočíchov a rastlín, obyčajne sa uvádzajú aj v anglosaskej literatúre kurzívou. Podobe to platí i latinské spojenia „*in vitro*“, „*in vivo*“ atď. V publikáciách je to uvedené v správnom formáte.

Str. 55. Určite je citácia pod obr. 20 správna, nie je to sekundárna citácia?

Str. 77..pk konštanta, má byť pK.

Str.87-88. Súbor rovníc 2.21-2.24, za predpokladu, že $A=B$, potom by mal byť ekvivalentný rovniciam 2.19-2.24, nezávisle na tom, aký štruktúrny motív reprezentujú, čo nie je pravda. Otázkou je, kde je chyba v predpokladoch týchto dvoch procesov reprezentujúcich

rovnícami uvedených na str. 87 a str. 88? Výsledná rovnica na str. 90 zahŕňajúca všetky tri formy DNA foriem by mala byť v poriadku.

Str. 95. Rozsah PTC-423S/L zariadenia je od -10 do 110 °C.

Str. 126, tab. 8 a 9, TBA I a II reprezentujú výsledky z dvoch nezávislých meraní... toto pomenovanie a definovanie je dosť nešťastné až zmätočné.

Na obr. 62, ktorý je až niekoľko strán ďalej, sa odkazuje už na str. 129.

Obrázok na str. 123, akoby sa ani nehodil ku štýlu autora.

Zvážil by som použitie iného tlmivého roztoku, ktorý neobsahuje iné jednomocné ióny základných zložiek, napr. lítium-kakodylátový roztok obsahuje aj disociované ióny lítia a tie môžu interferovať s draselnými iónmi.

10000 meraní, aj teplotných, na spektrometri typu Varian? Ak jedno reverzibilné spektrum zaberie asi 1-2 hodiny, plus príprava vzoriek a nastavenie aparatury, tak i pri paralelnom spustení 6 vzoriek to zaberie okolo 2000 hodín nepretržitého merania. To sa mi zdá priveľa času. Viac ako jeden rok by človek nepretržite strávil svoj čas len pri UV spektrometri.

Otázky:

1. Autor podáva výstižný popis telomerických sekvencií v kap. 1.5.1. V prehľadnej tabuľke č. 4 uvádza rôzne typy telomerických repetícií nachádzajúcich sa v rôznych organizmoch. Niektoré jednoduchšie eukaryotické systémy, ako sú napríklad huby (rod *Candida*) a nestavovce (*Parascaris*) majú tieto telomerne repetície s nižším obsahom guanínov, nemožno teda povedať, že ide o G- bohaté úseky. Zaujímalo by ma, či aj tieto teloméry majú ešte schopnosť vytvárať G- kvadruplexy.

2. Čím si vysvetľujete fakt, že nádorové línie majú oproti embryonálnym bunkám kratšie teloméry, aj keď je v nich expresia telomeráz?

3. Cisplatinové deriváty majú zvláštne postavenie oproti iným špecificky nekovalentne sa viažucim ligandom. Ako si vysvetľuje autor tvrdenie, že napríklad cisplatina môže interferovať s telomerázou?

4. Ako si autor vysvetľuje nasledujúce tvrdenie: „A low selectivity for G-quadruplexes over duplexes is associated with DNA topoisomerase I/II (enzymes helping to unwind double-helical DNA during transcription and replication) inhibition resulting in non-specific acute cell death“ ?

5. Autor popisuje indukovaný CD prechod na str. 52 a pokračuje na str. 55. Ako si tento nenulový CD signál vo viditeľnej oblasti vysvetľuje?

6. Tab.7, str. 123... prečo ste nepoužili aj sekvenciu s modifikáciou na 3'-konci, ale len na 5'- konci?

Prácu J. Palackého s názvom „Studium biologicky významných nekanonických struktur nukleových kyselín v komplexech s kationickými porfyrinami“ hodnotím ako prácu, ktorá je napísaná na vysokej úrovni, jedna z najlepších, aké som hodnotil. Predložená práca spĺňa všetky požiadavky, ktoré sú kladené na takýto typ práce.

V Košiciach dňa 18.1.2013

Viktor Víglaský