

Posudek oponenta dizertační práce

Student: Mgr. Martin Volek

Název dizertační práce: Vývoj and využití deoxyriboenzymů, které produkují barvu a fluorescenci.

Oponent: doc. Mgr. Lukáš Trantírek, Ph.D.

Pracoviště oponenta: Středoevropský technologický institut, Masarykova Univerzita

Téma a aktuálnost práce: Doktorská dizertační práce Mgr. Martina Volka se zabývá vývojem deoxyriboenzymů, které jsou schopny produkce silného fluorogenního nebo chromogenního signálu. Řešená problematika je důležitá a aktuální pro diagnostiku celé řady onemocnění, včetně virových infekcí.

Zpracování, cíle, a výsledky práce: Předložená dizertační práce je vypracována v anglickém jazyce v rozsahu zhruba 120-ti stran. Text práce je rozčleněn do pěti hlavních bloků: Úvod, Výsledky, Diskuse, Závěr a Materiál a metody.

Úvod originálním a čtivým způsobem podává historický přehled vývoje pole nukleových kyselin – od jejich objevu, přes objev jejich katalytické aktivity až po zavedení metod vývoje oligonukleotidů s definovanou funkcí, tzv. *aptamerů*. Na poslední uvedené část, která má přímou spojitost s prací Mgr. Volka, pak navazuje zevrubný popis principů metody *in vitro* selekce oligonukleotidů a popis vybraných praktických aplikací takto připravených aptamerů.

Cílem práce Mgr. Volka bylo vyvinout a biofyzikálně charakterizovat aptamery DNA schopné konverze vybraných substrátů na barevné/fluorescenční produkty a vyhodnocení možnosti jejich použití pro biotechnologické aplikace, především jako biosenzorů.

Výsledková (stěžejní) část práce překládá rozsáhlý a komentovaný soubor experimentálních dat. Tato část dokumentuje vývoj dvou aptamerů, Appolon a Aurora, a jejich možné biotechnologické aplikace. Kromě vlastních dat dokumentujících proces *in vitro* selekce, jsou prezentována data týkající se identifikace faktorů důležitých pro funkci aptamerů a jejich biofyzikální charakterizace. Diskuse a Závěr pak adekvátním způsobem shrnují získaná data a poznatky a diskutují jejich význam v kontextu oboru a praktických aplikací. Experimentální data jsou prezentována v souladu s oborovými standardy, popis v sekci Materiál a metody je napsán způsobem umožňujícím reprodukci jednotlivých experimentů. Text práce je vhodným způsobem procitován; je citováno celkem 148 prací. Celkově lze konstatovat, že práce je zpracována na velmi vysoké odborné, grafické i jazykové úrovni.

Práce jako celek je podložena dvěma publikacemi zveřejněnými v jednom z oborově nejvýznamnějších periodik, *Nucleic Acids Research*. U obou publikací je Mgr. Volek prvoautorem.

Poznámky a otázky:

- A) Jedním z cílů práce bylo pochopení mechanismu, jakým vyvinuté aptamery fungují. Předpokladem pro pochopení mechanismu je ovšem znalost jejich struktury. Za tímto účelem student (spoluautoři) použili bio-informatický přístup, konkrétně analýzu sekvenčních variant aptamerů. Tento přístup se ukázal být vhodným pro definování minimálního sekvenčního motivu spojeného s funkcí aptamerů. Nicméně tento přístup poskytl pouze velmi neurčité informace o (sekundární) struktuře aptamerů. Existoval nějaký důvod, proč student/autoři nevyužili možnosti (jim dostupné) NMR spektroskopie pro vyřešení 3D struktury aptamerů?
- B) Velmi zajímavým pozorováním, ale do jisté míry omezujícím aplikace vyvinutých aptamerů, je silná závislost jejich aktivity na hodnotě pH - oba aptamery operují pouze ve velmi úzkém rozsahu pH hodnot. Existuje možnost, jak buď racionálním způsobem nebo úpravou podmínek selekčního experimentu získat aptamer využívající stejný substrát ale operující ve větším rozsahu pH?

Závěr: Předložená dizertační práce přináší originální a oborově významné poznatky. Práce je zpracována na velmi vysoké odborné, grafické i jazykové úrovni. Mgr. Martin Volek jednoznačně prokázal předpoklady k samostatné tvůrčí vědecké práci. Jeho dizertační práci doporučuji k obhajobě.

V Brně, 31.8. 2024

doc. Mgr. Lukáš Trantírek, Ph.D.

Lukas Trantirek