

## **Posudek oponenta na diplomovou práci:**

Jiří Hammer

studijní program Biofyzika, MFF UK v Praze

### **„Molekulárně-dynamické simulace komplexů sestávajících z nukleových kyselin a proteinů“.**

Diplomová práce Jiřího Hammera se zabývá studiem interakcí proteinů z rodiny Argonaut s nukleovými kyselinami pomocí molekulárně-dynamických simulací. Zástupci proteinové rodiny Argonaut jsou katalytické komponenty RNA-induced silencing komplexů (RISC), které způsobují deaktivaci genů známou pod názvem RNA interference (RNAi). Tento způsob deaktivace genů je dnes velmi intenzivně studován a má obrovské praktické využití jak v medicíně, tak v základním výzkumu. Proteiny Argonaut váží fragmenty malých interferujících RNA (siRNA) nebo DNA a vykazují endonukleasovou aktivitu vůči mediátorové RNA (mRNA) v oblasti, která je komplementární se sekvencí navázaného fragmentu siRNA (nebo DNA).


Jiří Hammer se ve své práci zaměřil na detailní studium struktury komplexu Ago/NK, který se vytváří bezprostředně před štěpením řetězce mRNA. V tomto komplexu je na protein Ago navázán duplex siRNA (nebo DNA) a mRNA a PAZ doména Ago proteinu již neváže 3'-konec řetězce siRNA a je odkloněna od N-terminální domény. Diplomant realizoval celkem 12 molekulárně-dynamických simulací různých komplexů v přítomnosti explicitního rozpouštědla. Jednotlivé simulace se lišily strukturou proteinové části (bakteriální vs lidská verze PAZ domény), typem duplexu nukleové kyseliny (heteroduplex DNA-RNA vs homoduplex RNA-RNA), nebo počtem či polohou přítomných hořčnatých kationtů. Vypočtené trajektorie byly důkladně analyzovány a prezentovány pomocí značného množství obrázků a grafů. Hlavním výsledkem diplomové práce Jiřího Hammera je strukturní model komplexu Ago/NK, který reprezentuje klíčový stav v enzymatickém cyklu RISC komplexu.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autor získal řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládl metodiku molekulárně-dynamických simulací komplexů proteinů s nukleovými kyselinami. K formální podobě práce nemám žádné připomínky, práce je napsána přehledně, pečlivě, s minimálním výskytem překlepů a výsledky jsou názorně prezentovány. Práce má standardní členění, rozsah jednotlivých kapitol je vyvážený. Kvalita angličtiny, kterou je práce psána, je na velmi dobré úrovni. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury jsou adekvátní.

K předkládané diplomové práci mám několik drobných otázek:

1. Jakým způsobem byly vybírány reprezentativní konformace z jednotlivých trajektorií pro následné hodnocení či grafické znázornění?
2. Proč byl v simulaci č. 1 nahrazen ion  $\text{Ca}^{2+}$ , který byl přítomen v použitém startovním modelu komplexu AaAgo/DNA-RNA, iontem  $\text{Mg}^{2+}$ ? Který kationt je přítomen v aktivním centru Ago *in vivo*?
3. Ve všech simulacích byla pozorována určitá nestabilita N-koncové domény Ago. Existuje pro tuto nestabilitu nějaké vysvětlení?
4. Jednotlivé simulace se liší počtem molekul vody koordinujících ion  $\text{Mg}^{2+}$  v aktivním centru PIWI domény. Můžete tyto rozdíly vysvětlit? Proč byl ve všech simulacích použit model TIP3P pro popis explicitního rozpouštědla?
5. Jaký je důvod umístění iontu  $\text{Mg}^{2+}$  do vazebného místa Mid domény? Existuje nějaký experimentální důkaz o přítomnosti dvojmocného kationtu v této pozici?
6. Která simulace podle vašeho názoru poskytuje nejrealističtější model aktivního centra Ago/NK komplexu?

Závěrem konstatuji, že předložená práce Jiřího Hammera splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě a klasifikovat známkou výborně.



Doc. RNDr. Tomáš Obšil, PhD.  
Přírodovědecká fakulta UK  
17. května 2008