

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky vedoucího:

Posuzovaná diplomová práce sestává ze 72 stran anglicky psaného textu a asi 120 stran grafů. Textová část se skládá ze čtyř kapitol. V úvodní kapitole autor postupně pojednává o struktuře nukleových kyselin a proteinů, o tzv. RNAi vedoucí k útlumu exprese genetické informace prostřednictvím krátkých fragmentů nukleových kyselin a buněčných enzymů (zejména tzv. Argonautu) atd. Ve druhé kapitole se věnuje popisu metod homologního modelování a molekulárně-dynamických simulací. Třetí kapitola obsahuje podrobné vyhodnocení dvanácti provedených molekulárně-dynamických simulací, kde ve většině z nich byl zkoumán komplex proteinu Argonaute a dvojšroubovicové struktury nukleové kyseliny. Ve čtvrté kapitole jsou formulovány závěry.

Klasická chemoterapeutika inhibují činnost proteinů navázáním do jejich aktivního místa. Potenciálně efektivnější strategii představují tzv. antisense a antigene oligonukleotidy. Ty by měly zasáhnout již do procesu exprese genetické informace prostřednictvím tvorby šroubovicovitých komplexů s mRNA či DNA s cílem zamezit již samotné syntéze nežádoucích proteinů. Nedávno (v roce 1998) byla objevena jistá varianta tohoto mechanismu (tzv. RNAi), která se v buňce přirozeně vyskytuje, slouží k obraně proti virové nákaze či v určitých fázích vývoje buňky k regulaci až 1/3 genů atd. Tzv. siRNA molekuly vytvoří komplex s proteinem Argonaute a na základě komplementarity bazí posléze dochází k degradaci nežádoucí mRNA či virové RNA. Pro případné terapeutické využití siRNA molekul je nezbytné provést chemické modifikace jejich struktury. Chemické modifikace by měly zajistit stabilitu siRNA vůči buněčným nukleázám. Přitom by měla zůstat zachována schopnost hybridizace s komplementárním přirozeným vláknem mRNA, jakož i kompatibilita dvoušroubovicovitého komplexu s aktivním místem enzymu Argonaute. Ve Fyzikálním Ústavu MFF UK jsou již řadu let zkoumány vlastnosti fosfonátových analog nukleových kyselin, které jsou syntetizovány v ÚOCHB AV ČR. Pro jejich případné racionální využití v oblasti RNAi je potřeba důkladně poznat vlastnosti komplexu enzymu Argonaute a nukleových kyselin. To bylo motivací této diplomové práce.

Klasické molekulárně-dynamické simulace (numerické řešení pohybových rovnic s použitím empirického silového pole) slouží ke zkoumání struktury a dynamiky biomolekul – nukleových kyselin a proteinů. V tomto případě byly použity pro zkoumání modelového systému komplexu Argonaute proteinu a dvou vláken nukleové kyseliny. Na základě krystalových struktur Argonautu (z organismu *A. aeolicus*), popř. jeho domén (lidská PAZ doména) bylo vytvořeno několik modelových systémů. Pomocí softwarového balíku NAMD bylo provedeno celkem 12 hlavních simulací, které posloužily k rafinaci simulovaného systému. V první fázi byly odstraněny sterické konflikty s postraními řetězci residuí enzymu. Dále byla provedena rafinace struktury aktivního místa - kritériem byl soulad se známými krystalovými strukturami polymerát a nukleáz, zejména enzymu RNase H z organismu *Bacillus Halodurans*. Všechny simulace byly detailně vyhodnoceny pomocí modulu PTRAJ ze softwarového balíku AMBER. Sledovanými veličinami byly zejména konformace internukleotidových spojek a ribos, vodíkové vazby poutající obě vlákna nukleové kyseliny, nukleovou kyselinu a enzym popř. ionty v aktivním místě enzymu.

Prvé dvě molekulárně-dynamické simulace posloužily k prozkoumání modelu Aa-Ago s různými substráty: buď s DNA/RNA nebo RNA/RNA duplexem. Hlavní rozdíl byl pozorován při interakci PAZ domény (resp. jejích argininových residuí), která tolerovala guide DNA, nikoli však guide RNA vlákno. To naznačilo možnou funkci PAZ domény při rozpoznávání RNA/RNA a hybridních DNA/RNA duplexů. V dalších simulacích (3-9) byla využita krystalová struktura Hs-PAZ domény, která byla implantována do struktury Aa-Ago. V tomto případě nebyly pozorovány žádné konflikty s guide DNA vláknem. Byla otestována různá uspořádání aktivního místa, počet hořčičkových iontů v něm umístěných a jejich parametrizace. DD-katalytický motiv s D683 (ekviv. lidskému H807 z Ago2) koordinoval (jeden, popř. dva) ionty Mg^{2+} . MD simulace ukázaly, že konzervovaná residua R570 a E578 stabilizují aktivní místo prostřednictvím vzájemných vodíkových vazeb. Z

hlediska nevratnosti procesu přeštipnutí mRNA by mohl hrát důležitou úlohu první nukleotid z 5'-konce guide DNA. Molekulárně-dynamické simulace ukázaly, že za určitých okolností dochází k tvorbě vodíkového můstku mezi 5'-konce guide DNA a vláknem RNA poblíž aktivního místa. Po přeštipnutí RNA vlákna by takováto interakce měla vést k destabilizaci jednoho ze dvou vzniklých fragmentů RNA. Simulace (10-12) s homologními modely lidské varianty enzymu Ago2 se ukázaly jako málo věrohodné především díky nedostatečné sekvenční shodě s templátovou strukturou. Dostupné krystalové struktury neumožňují v tuto chvíli postavit dostatečně kvalitní model lidské varianty enzymu Ago2 a jako maximum možného se v tuto chvíli jeví cesta použitá v simulacích 3-9, kdy byla jedna z domén AaAga nahrazena krystalovou strukturou lidské PAZ domény.

Jiří Hammer si ke znalostem biofyziky, které získal v průběhu magisterského studia, doplnil vědomosti potřebné pro zdárné vypracování diplomové práce. Jednalo se zejména o proniknutí do základů numerické matematiky a počítačového modelování biomolekul pomocí homologního modelování a molekulárně-dynamických simulací. Jiří Hammer prokázal schopnost osvojit si nové znalosti studiem cizojazyčné literatury. Kromě toho dokázal převést získané poznatky do praxe. V rámci diplomové práce realizoval velký objem časově náročných výpočtů, které posléze velmi pečlivě vyhodnotil a zpracoval (diplomovou práci tvoří 72 stran textu + 120 stran grafů). Práce působí kompaktním dojmem, kvalita formálního zpracování je vysoká. Po prostudování diplomové práce Jiřího Hammera mohu konstatovat, že jde o práci velice kvalitní, která vedla k získání originálních poznatků. Domnívám se proto, že Jiří Hammer má všechny předpoklady pro samostatnou vědeckou činnost, jeho diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její ohodnocení známkou „výborně“.

Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

Práci

doporučuji

nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm:

výborně velmi dobře dobře neprospěl/a

Místo, datum a podpis vedoucího/oponenta: **Praha, 15. 5. 2008, RNDr. Ivan Barvík Ph.D.**