

**Posudek oponenta na disertační práci RNDr. Miroslavy Dékány Fraňové:
„Molecular modeling of lipid membranes with fluorescent probes“**

Disertační práce je věnována aktuálnímu tématu - interakci fluorescenčních sond (difenylhexatrienové a pyrenové) s buněčnými membránami. V úvodu práce autorka uvádí základní fakta o struktuře buněčných membrán, parametrech charakterizujících jejich vlastnosti a hlavní metodě použité při řešení této práce - klasických molekulárně-dynamických simulacích.

V MD simulacích provedených prostřednictvím softwarového balíku GROMACS byly buněčné membrány reprezentované prostřednictvím modelových fosfolipidických dvojvrstev sestávajících ze 128 lipidů (typu DPPC či DOPE) a obklopených cca. 3.500 molekulami vody. Prostřednictvím výkonné výpočetní techniky byly získány velmi dlouhé trajektorie (60-500 ns při časovém kroku 2 fs). Pečlivá analýza nasimulovaných dat umožnila postihnout řadu zajímavých jevů na atomární úrovni.

a) V případě simulovaného systému sestávajícího z fosfolipidické dvojvrstvy DPPC, do ní vnořených molekul cholesterolu a volných DPH sond bylo zjištěno, že pohyblivost sondy výrazně klesá se vzrůstajícím zastoupením cholesterolu, který činí acylové řetězce fosfolipidů více uspořádanými. Vliv samotné DPH sondy na acylové řetězce je pak krátkodosahový (cca. 1 nm). Plocha na lipid a tloušťka membrány jsou přítomností DPH sond ovlivněny pouze nepatrně. MD simulace tedy dokládají, že experimenty s DPH sondami poskytují výpověď o skutečných vlastnostech buněčných membrán, nikoliv o jevech, které vyvolá přítomnost sond v nich. Dále bylo přesvědčivě demonstrováno, že pokud je v membráně přítomen cholesterol, pak měření fluorescenční anisotropie poskytují nedostatečnou vstupní informaci pro určení orientační distribuční funkce sondy.

b) V případě pyrenové sondy ukotvené k DOPC lipidům na různých pozicích podél acylových řetězců bylo prostřednictvím MD simulací odlišeno, kdy dochází k dimerizaci sond pouze v rámci jedné z vrstev membrány a kdy naopak dochází k jejich dimerizaci mezi vrstvami. Sondy tohoto typu mohou poskytnout výpověď např. o interakci domén situovaných v různých vrstvách buněčné membrány.

c) V poslední studii byla zkoumána potenciální závislost četnosti dimerizace pyrenových sond ukotvených v různých pozicích k acylovým řetězcům DOPC lipidů na profilu laterálního tlaku, který ovlivňuje konformační preference medicínsky významných membránových proteinů. MD simulace nicméně ukázaly, že četnost dimerizace sond v závislosti na délce acylového řetězce má obdobný trend v buněčné membráně i ve vakuu. Sondy s fixní délkou řetězce však mohou být použity alespoň pro měření rozdílů laterálního tlaku v buněčných membránách o různém složení.

Náměty pro diskusi:

1. Z obrázku 17 a 21 je zřejmé, že v MD simulacích s nižším obsahem cholesterolu dochází k pronikání DPH sond až do centrální oblasti simulovaného systému (tj. do prostoru mezi oběma vrstvami fosfolipidické dvojvrstvy). Byly v prezentovaných trajektoriiích zaznamenány přechody DPH sond z jedné vrstvy do druhé? Byla v MD simulacích zaznamenána vzájemná interakce DPH sond lokalizovaných v různých vrstvách tak, jako to bylo následně zaznamenáno pro pyrenové sondy (viz. obrázek 27)?

2. Z obrázku 17 a 21 se zdá, že DPH sonda naopak nemá tendenci pronikat směrem z membrány ven (do okolního vodného roztoku). Existují pro zde zkoumané sondy výpočty velikosti bariéry volné energie na rozhraní voda–membrána (tj. výpočty obdobné těm, které jsou prezentované např. v Tieleman, Proceedings of the Australian Physiological Society 37, 2006, 15-27)? Byly autorkou práce provedeny či v literatuře prezentovány MD simulace zachycující spontánní proniknutí DPH či pyrenové sondy do membrány?

3. Vzhledem k tomu, že zde prezentované MD simulace provedené prostřednictvím v tomto kontextu tradičně užívaného „united atom“ silového pole predikují v některých případech příliš nízkou a v jiných zase příliš vysokou četnost dimerizace pyrenových sond a dle přiložené publikace č. 3 v tomto ohledu hlavní podezření padá na způsob, jakým jsou v silovém poli naparametrizované glycerolové partie lipidů, tak se zdá, že by v budoucnu bylo vhodné provést srovnávací MD simulace prostřednictvím „all atom“ silového pole CHARMM c36 (Klauda et al., J. Phys. Chem. B 114, 2010, 7830-7843), kde silové konstanty pro příslušné torzní úhly byly naparametrizované velmi pečlivě prostřednictvím ab initio výpočtů. Program VMD přitom nově obsahuje tzv. „Force Field Toolkit“ (Mayne et al., Journal of Computational Chemistry 34, 2013, 2757-2770), který umožňuje silové pole CHARMM konzistentně rozšiřovat (což by se zde dalo uplatnit pro pyrenové sondy).

Výsledky předkládané práce posloužily jako základ pro tři publikace v impaktovaných časopisech, kde Miroslava Fraňová je vždy první autorkou. Předkládaná práce nepochybně prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé práci. Doporučuji proto její přijetí k obhajobě a následné udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 4. 6. 2014

RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.