

Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě
Univerzity Karlovy v Praze

posudek vedoucího

posudek oponenta

bakalářské práce

diplomové práce

Autor/ka: **Tomáš Bartek**

Název práce: **Molekulárně-dynamické simulace komplexů nukleových kyselin
a enzymu RNase H**

Studijní program a obor: **Biofyzika a chemická fyzika**

Rok odevzdání: **2009**

Jméno a tituly vedoucího/opponenta: **RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.**

Pracoviště: **Fyzikální Ústav MFF UK, Ke Karlovu 5, Praha 2, 121 16**

Odborná úroveň práce:

vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Věcné chyby:

téměř žádné vzhledem k rozsahu přiměřený počet méně podstatné četné závažné

Výsledky:

originální původní i převzaté netriviální kompilace citované z literatury opsané

Použité metody:

nestandardní standardní obojí

Aplikovatelnost:

přínos pro teorii přínos pro praxi bez přínosu nedovedu posoudit

Rozsah práce:

veliký standardní dostatečný nedostatečný

Grafická, jazyková a formální úroveň:

vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Tiskové chyby:

téměř žádné vzhledem k rozsahu a tématu přiměřený počet četné

Celková úroveň práce:

vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky vedoucího/oponenta:

Posuzovaná diplomová práce sestává ze 78 stran textu a cca. 50 stran grafů. Textová část se skládá ze tří kapitol. V úvodní kapitole autor postupně pojednává o struktuře a funkci nukleových kyselin, proteinů, enzymu RNase H a o tzv. antisense oligonukleotidech. Ve druhé kapitole se věnuje metodice molekulárně-dynamických simulací. Třetí kapitola obsahuje podrobné vyhodnocení devíti provedených molekulárně-dynamických simulací a jsou zde formulovány závěry.

Klasické molekulárně-dynamické simulace (numerické řešení pohybových rovnic s použitím empirického silového pole) slouží ke zkoumání struktury a dynamiky biomolekul – nukleových kyselin a proteinů. Motivací pro takové výpočty je často snaha přispět k racionálnímu návrhu struktury účinných léků. 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. U antisense oligonukleotidů je nezbytné provést chemické modifikace jejich struktury zajišťující jejich stabilitu vůči buněčným nukleázám při zachování schopnosti hybridizace s komplementárním přirozeným vláknem a schopnosti pronikat do buněk. Ve Fyzikálním Ústavu MFF UK jsou již řadu let zkoumány vlastnosti fosfonátových analog nukleových kyselin, které jsou syntetizovány v ÚOCHB AV ČR.

Impulsem pro tuto diplomovou práci bylo experimentální zjištění, že určité strukturní varianty fosfonátových antisense oligonukleotidů jsou schopné po navázání k mRNA vyvolat aktivitu enzymu RNase H, který selektivně odbourá vlákno nežádoucí mRNA. Uvolněný antisense oligonukleotid může posléze vytvořit komplex s další kopií mRNA a celý cyklus se opakuje. Cílem diplomové práce bylo posoudit dopady fosfonátových modifikací antisense oligonukleotidů na aktivitu lidské varianty enzymu RNase H.

Lidská varianta enzymu RNase H sestává ze tří domén - katalytické, spojovací a vazebné. Katalytická doména je přitom aktivní sama o sobě (zbylé dvě domény mají vliv zejména na poziční specificitu při degradaci mRNA). V proteinové databance jsou dostupné krystalové struktury katalytické a vazebné části (krystalová struktura spojovací části zatím dostupná není). Molekulárně-dynamické simulace byly proto prováděny pouze pro katalytickou doménu.

Pomocí softwarového balíku NAMD bylo provedeno 7 simulací, které umožnily určit aminoskupiny nejvýrazněji se podílející na vazbě nukleové kyseliny. Molekulárně-dynamické simulace dále posloužily k posouzení vlivu použitého silového pole na konformační preference cukrfosfátové páteře nukleové kyseliny. Porovnání simulací s jednou/dvěma kopiemi enzymu RNase H v simulovaném systému ukázalo difference ve stabilitě vazby molekuly vody atakující štípanou internukleotidovou spojku do aktivního místa enzymu.

Další dvě molekulárně-dynamické simulace posloužily k posouzení vlivu chemické modifikace v páteři nukleové kyseliny na vazbu dvoušroubovice DNA/RNA k enzymu. Silové pole použité pro modelování chemicky modifikovaných internukleotidových spojek bylo rafinováno prostřednictvím kvantově-chemických výpočtů tak, aby rozdíl v relativních energiích určených prostřednictvím klasického popř. kvantově-mechanického výpočtu nečinil více než 1kcal/mol. Zajímavé bylo zejména zjištění, že biologicky aktivní varianta fosfonátové internukleotidové spojky interaguje optimálně s Arg47 v Thr-DNA vazebném místě. Naproti tomu biologicky neaktivní (a strukturně velmi blízká) varianta fosfonátové spojky s tímto residuem brzy ztratila kontakt.

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.

Tomáš Bartek 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 molekulárně-dynamických simulací a kvantově-chemických výpočtů. Tomáš Bartek 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. Práce působí kompaktním dojmem, kvalita formálního zpracování je vysoká. Po prostudování diplomové práce Tomáše Barteka mohu konstatovat, že jde o práci velice kvalitní, která vedla k získání originálních poznatků. 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, 20. 5. 2009, RNDr. Ivan Barvík Ph.D.**