

## Posudek vedoucího diserta ní práce

V diserta ní práci se Kamil Malá zabýval počítačovými simulacemi komplexu medicínsky zajímavých enzymů s chemicky modifikovanými nukleovými kyselinami – potenciálními chemoterapeutiky. Jednalo se o numerické simulace dynamického vývoje molekulárních systémů, které díky zahrnutí vodní obálky sestávaly z desítek tisíc atomů. Použití výkonných grafických karet umožnilo získat až mikrosekundové trajektorie, které umožnily interpretovat experimentální výsledky z literatury – zejména odlišit aktivní analoga nukleových kyselin od neaktivních.

Teoretickou část práce v novanou strukturu, funkci a medicínskému významu studovaných enzymů se nám jistě popud Kamil Malá snažil uchopit tak, aby byla užitečná například pro studenty, kteří budou na jeho práci navazovat a pro organické chemiky, kteří budou mít zájem spolupracovat na racionálním designu potenciálních chemoterapeutik. Jedná se o rešerši z cca. 75 odkazů. Nejde tedy o minimalistickou variantu, kdy by byly poskytnuty pouze základní informace nutné k tomu, aby oponent porozuměl výsledkové části práce. Zřejmě to nebylo šťastné rozhodnutí. Na druhou stranu prostě opravdu neznám jinou prioritizaci pro zachycení v domostí, které student v toku času prací naakumuloval, než je okamžik sepsování jeho práce.

tyto kapitoly jsou tedy v novány popisu struktury, funkce a medicínského významu enzymů virové RNA-dependentní RNA polymerázy a lidských variant enzymů RNáza H, Argonaute a RNáza L, které jsou v rámci této práce studovány. Dvě zbývající kapitoly jsou v novány například u buzným enzymem - mnohapanodjednotkové DNA-dependentní RNA polymeráze a HIV reverzní transkriptáze. Pro tyto dva enzymy též provádíme MD simulace, ve kterých nyní máme přímou zkušenost získanou v průběhu řešení této diserta ní práce. Bakteriální variantu DNA-dependentní RNA polymerázy efektivně inhibuje jediné klinicky používané antibiotikum Rifampicin (více než 40 let se používá k léčbě tuberkulózy), jenž se však váže relativně daleko od aktivního místa a navíc je poměrně rozměrný. Baktérie jsou tak díky bodovým mutacím ve struktuře DNA-dependentní-RNA polymerázy schopné získat v ní relativně rychle rezistenci. Aktuálním tématem proto je možnost inhibice bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy prostřednictvím chemicky modifikovaných nukleosidtrifosfátů (analogicky jako u virové RNA-dependentní RNA polymerázy) i krátkých chemicky modifikovaných oligonukleotidů (analogických tzv. antisense oligonukleotidů i chemicky modifikovaným siRNA molekulám interagujícím s enzymy RNáza H a Argonaute). HIV reverzní transkriptáza pak z hlediska struktury představuje pojitko mezi enzymy studovanými ve výsledkové části této práce. Obsahuje totiž dvě aktivní místa, z nichž jedno je strukturně homologní s aktivním místem virové RNA-dependentní RNA polymerázy a druhé s aktivními místy lidské RNázy H a enzymu Argonaute. HIV reverzní transkriptáza je cílem mnoha klinicky používaných antivirotik. Představuje proto nesporně cenný a neopominutelný zdroj inspirace při tvorbě potenciálních chemoterapeutik interagujících s enzymy, jimž je v novaná výsledková část této práce.

Strukturu teoretické části práce popisující metodiku ovlivnila moje zkušenost s tím, že s výjimkou oponentů jsou hlavními tématy i to, čeho pasáží mladší studenti. Realizace molekulárně-dynamických simulací i kvantově-mechanických výpočtů má totiž charakter počítačového experimentu prováděného prostřednictvím komplexních softwarových balíčků. Plné pochopení teoretických základů metod a algoritmů, které jsou v těchto balíčcích

implementované vyžaduje absolvování p ednášek z termodynamiky a statistické fyziky, kvantové teorie, numerické matematiky, speciálních kurs atd., kterými zejména bakalá ští studenti nemohou sta it projít. P i spoušt ní molekulárn -dynamických simulací p itom musí volit mezi adou alternativ a specifikovat množství vstupních parametr , což bez alespo letného vhledu do podstaty metod a algoritm není možné. Student m navazujícím na Kamila Malá e teoretická ást jeho práce popisující metodiku umožní, že pro n používané softwarové balíky od po átku nebudou p edstavovat zcela erné sk í ky. Že m že být toto pojetí pro erudovaného oponenta zna n iritující jsem si nev domil.

Hlavní metodou použitou v rámci této práce byly tzv. molekulárn -dynamické simulace. Jde o numerické ešení klasických pohybových rovnic, kde silové p sobení mezi atomy je popsáno analytickou funkcí - tzv. silovým polem. Jednotlivé parametry - tzv. silové konstanty - se dnes již ur ují a rafinují p evážn prost ednictvím kvantov -mechanických výpo t . Vzhledem k tomu, že standardní silová pole neobsahují silové konstanty pro modifikované ásti nukleových kyselin, byly významnou sou ástí ešení práce i kvantov -mechanické výpo ty pro malé modelové systémy. Princip t chto výpo t je v teoretické ásti práce na rtnut na p íkladu molekuly vodíku a tzv. Hartreeho metod . Dále je nastín no, jak kvantov -mechanické výpo ty v rámci p edkládané práce posloužily p i ur ování bodových náboj na atomech a výpo tu silových konstant pro takzvané torzní úhly. Klasické molekulárn -dynamické simulace ve výsledkové ásti této práce umožnily extenzivní navzorkování konforma ního prostoru simulovaných systém , p i emž nastolily n které otázky, které bude možné zodpov d t pouze prost ednictvím tzv. QM-MM výpo t a ab initio MD simulací provád ných pro modelové systémy reprezentující aktivní místa enzym , které budou natolik malé, že umožní alespo áste n opustit klasický popis. T i stránky textu jsou proto v novány aproximacím, které vedou od asové Schrödingerovy rovnice k Newtonovým pohybovým rovnicím. Dalších p t stran textu Kamil (p vodem matematik) v noval obhajob použití tzv. Verletova algoritmu pro numerické ešení pohybových rovnic. Jeden ze zápis tohoto algoritmu je totiž formáln tém identický s tzv. Eulerovým algoritmem, který se ale v u ebnicích numerické matematiky obvykle používá pouze jako výchozí bod k odvození složit jších metod prediktor-korektor i Runge-Kutta, které umož ůjí získat výrazn p esn jší ešení. Nicmén Verlet v algoritmus je v kontextu molekulárn -dynamických simulací biomolekul jednozna n preferován zejména proto, že umož ůje získání stabilních trajektorií i p i relativn velkém asovém kroku (kdy složit jší algoritmy již selhávají). Dále je v nována pozornost algoritm m, které se v rámci molekulárn -dynamických simulací uplat ují pro kontrolu teploty a tlaku simulovaného systému a zp sobu jakým se provádí sumace pomalu vyhasínajících dalekodosaových interakcí. Na konci teoretické ásti práce autor zd vodnil výb r konkrétních program , které použil p i ešení své práce.

Kamil Malá se diserta ní práci v noval zejména v prvních a posledních dvou letech svého studia. V mezidobí se v oboru mnohé m nilo. Na po átku ešení práce pro nás byly dosažitelné trajektorie o délce jednotek nanosekund – na konci jednotek mikrosekund. Na samém po átku byly výpo ty realizovány prost ednictvím multiprocessorového SMP po íta e MAT s procesory RISC a softwarového balíku AMBER. Poté se prosadily linuxové klastry, pro n ž byl optimální softwarový balík NAMD. V posledních letech se osv d ily prosté stolní po íta e revitalizované osazením výkonnými grafickými kartami, které v kombinaci se softwarovým balíkem ACEMD nahradí n kolik desítek jader klasických procesor . Dále došlo k n kolika zásadním revizím silových polí zejména pro nukleové kyseliny atd. N kolikrát se proto musel Kamil Malá vracet na za átek, takže nezanedbatelná ást jeho práce „spadla pod st l“.

Základním cílem výpočtu bylo získat informace užitečné pro organické chemiky na spolupracujícím pracovišti v UOCHB AV ČR. Prvotní představa byla, že simulovanými systémy budou zejména dvoušroubovicovité komplexy chemicky modifikovaných a přirozených nukleových kyselin. Krystalové struktury komplexů nukleových kyselin a proteinů experimentálně studovaných v UOCHB AV ČR v proteinové databázi na počátku nebyly, objevily se až v průběhu řešení této práce. Stejně tak se postupně v literatuře objevily experimentální studie souboru různých chemicky modifikovaných nukleových kyselin vykazujících při interakci s pro nás zajímavými enzymy rozdíly v aktivitě dostatečně velké k tomu, aby byla naděje, že se určité rozdíly projeví i během MD simulací. Zda se tak opravdu stane na atomové škále, která je aktuálně usimulovatelná, nebylo nikdy dopředu zřejmé. Realizované MD simulace ukázaly, že v případě RNA-dependentní RNA polymerázy, kde se nukleová kyselina nachází v nitru proteinové struktury je potřeba získat alespoň mikrosekundové trajektorie. V případě enzymů RNázy H a RNázy L, kde se nukleové kyseliny vážou k jejich povrchu, postačí trajektorie o délce 100-200 ns. Pilotní studie z výsledkové části této práce tedy prorazily cestu a nyní je možné prostřednictvím analogických výpočtů napomoci organickým chemikům v designu struktury potenciálních chemoterapeutik. Další možností je pokračovat dále do hloubky. Pojítkem mezi studovanými enzymy, které buď syntetizují nebo degradují nukleovou kyselinu je jejich aktivní místo, které obsahuje dva hořčíkové ionty. V rámci práce bylo uplatněno několik přístupů, jak taková aktivní místo reprezentovat a stabilizovat. V tomto ohledu se nyní nabízí pokračovat aplikací polarizovatelných silových polí. Dalším směrem je aplikace QM-MM metod, které umožní postihnout například vliv alternativních konformerů postranních eteryc aminokyselin zaznamenaných v průběhu dlouhých MD simulací na průběh reakce.

Práci doporučuji k obhajobě.

RNDr. Ivan Barvík, PhD.