

Oponentský posudek na disertační práci:

Název práce: **Computer simulations of Na/K-ATPase its interactions with small molecules**

Autor práce: **Petra Čechová**

Disertační práce Petry Čechové je zaměřena na výzkum interakcí malých molekul se sodno-draselnou pumpou. Pomocí homologního modelování, molekulární dynamiky a dokování malých molekul, autorka zkoumala iontové dráhy, vazbu nukleotidů a vazby potenciálních terapeutických činidel na tento transmembránový protein. Mezi hlavní výsledky práce patří objevení dvou nových iontových drah, detailní popsání ATP-vazebné kapsy a interakce mezi nukleotidy a touto kapsou a popsání několika možných mechanismů inhibice sodno-draselné pumpy.

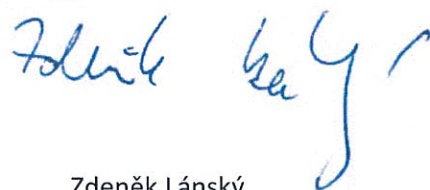
Práce je přehledně členěna do čtyř hlavních kapitol. Úvodní kapitola ukazuje, že autorka se orientuje v dané problematice, a že zvládla veškeré používané metody. Výsledky jsou přehledně prezentovány a diskutovány v kontextu předchozích experimentálních prací. Ve většině případů jsou již tyto výsledky publikovány v odborných časopisech. Práce se zdá být dobře zvládnutá, text je formulován jasně a členěn přehledně a grafická část práce je většinou zpracována pečlivě. Mám jen několik drobných připomínek. U několika obrázků by bylo dobré mít legendu barev, což je nejvíce patrné v obr.5, kde je barevné schéma popsané slovy dosti nesrozumitelné (která zelená je "forest green" a která je "dark green"?). Práce obsahuje několik drobných překlepů (např. "P-N grove" - Fig.24, "ligandss" - Tab.3) a zkomolených referencí (např. [95]).

V souhrnu předložená práce spolu s publikacemi ukazují na to, že autorka dobře zvládla studovanou problematiku a je schopna vlastní vědecké práce a tvorby odborného textu.

Otázky:

- 1) V diskuzi na straně 70 uvádíte dvě možnosti, jak mohou flavonolignany inhibovat sodno-draselnou pumpu. Jedna možnost je, že zabrání průchodu iontů a druhá, že zabrání vzájemnému pohybu P- a N- domén. Bylo by možné výpočetně určit, která z těchto možností nastává? Případně, jak byste tuto otázku ověřovala experimentálně?
- 2) Na str. 62 uvádíte, že dráhou TM3-TM7 procházely molekuly vody a v jednom případě iont Na^+ . Znamená to, že byl iont pozorován jen v jedné simulaci? Z kolika? Jak je toto pozorování signifikantní? Podobně je tomu v případě dráhy TM6-TM9. Můžete tyto výsledky kvantitativně porovnat s drahami, které jsou známe?
- 3) V úvodu práce zmiňujete, že sodno-draselná pumpa může tvořit vyšší oligomery, až do $(\alpha\beta)_4$ (str. 12), avšak v simulacích pracujete pouze s monomermem. Jaká je struktura a funkce těchto vyšších oligomerů? Je možné provádět MD simulace s těmito oligomery?
- 4) Kromě zdroje energie, se ATP zdá být velmi potentní solubilizační činidlo (Patel et al. (2017). ATP as a biological hydrotrope. Science, 356(6339), 753–756). Pozorovala jste interakce ATP s proteinem (mimo ATP vazebné místo), které by tomuto nasvědčovaly v případě sodno-draselné pumpy?

V Praze, dne 3.8. 2018



Zdeněk Lánský

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Petry Čechové nazvanou: „Computer Simulations of Na⁺/K⁺-ATPase its Interactions with Small Molecules“

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce Mgr. Petry Čechové bylo studium konformační dynamiky integrálního membránového proteinu Na⁺/K⁺-ATPasy metodami molekulové dynamiky. Dále pomocí metod molekulového dokování byly studovány interakce Na⁺/K⁺-ATPasy s vybranými skupinami malých organických sloučenin. Na⁺/K⁺-ATPasa patří mezi klíčové enzymy buněčné fyziologie a jejím hlavním úkolem je aktivní transport Na⁺ a K⁺ iontů přes buněčnou membránu. Koncentrační gradienty těchto iontů jsou důležité pro udržování membránového potenciálu, buněčného objemu či zabezpečení sekundárního aktivního transportu různých látek. Strukturní studie publikované během posledních deseti let umožnily detailní objasnění struktury různých konformačních stavů Na⁺/K⁺-ATPasy. Nicméně řada detailů týkajících se mechanismu funkce, např. kdy dochází k otevření a zavření přístupu k vazebným místům pro kationty v rámci transportního cyklu či jak přesně dochází k pohybu iontů v rámci struktury proteinu je stále nejasná a metody výpočetní chemie jsou vhodnými nástroji pro jejich studium.

Výsledky disertační práce Mgr. Petry Čechové lze rozdělit na tři větší části. V první se autorka věnuje studiu pohybu iontů v rámci struktury Na⁺/K⁺-ATPasy, v druhé části studuje interakce nukleotidů s enzymem a ve třetí jsou studovány interakce Na⁺/K⁺-ATPasy s inhibitory na bázi flavonoidů a quinolinonů.

Disertační práce má bez příloh 100 stran, je psána anglicky zkrácenou formou, tedy jako komentovaný soubor publikací doktorandky. Komentáře jednotlivých publikací zahrnují stručný popis klíčových výsledků. V teoretickém úvodu autorka sumarizuje současné znalosti o struktuře a mechanismu funkce Na⁺/K⁺-ATPasy a dále principy výpočetních metod, které byly v práci použity. Následují souhrn výsledků založený na čtyřech publikacích (tři z nich již byly publikovány), závěr a přehled citované literatury čítající 225 citovaných prací. Jako přílohy práce obsahuje kopie publikací autorky.

První publikace se týká studia přístupnosti vazebných míst pro kationty ve struktuře enzymu pomocí molekulové dynamiky. Na této práci je Mgr. Petra Čechová první autorkou.

Druhá publikace se věnuje inhibici Na^+/K^+ -ATPasy derivátem quinolinonu. Třetí publikace se týká inhibice Na^+/K^+ -ATPasy flavonoidy a čtvrtá interakcím enzymu s nukleotidy. Na této publikaci je Mgr. Petra Čechová také prvním autorem. Předložená disertační práce tak jasně ukazuje, že Mgr. Petra Čechová získala značné zkušenosti v celé šíři metod molekulové dynamiky a molekulového dokování a jejich využití při studiu struktury a funkce proteinů.

Práce je psána srozumitelnou angličtinou s nízkým výskytem překlepů. Nicméně v názvu práce jeden překlep zůstal (chybějící „and“). Z formálního hlediska bych dále autorce vytknul absenci kapitoly, kde by byl stručný přehled hlavních cílů práce. Takto musí čtenář cíle jednotlivých studií dedukovat přímo z textů publikací. Dále by práce měla obsahovat přesné vymezení podílu autorky na jednotlivých publikacích.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

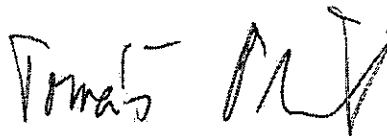
1. V rámci studia přístupnosti vazebných míst pro kationty ve struktuře Na^+/K^+ -ATPasy jste identifikovala dvě nové cesty: TM3/TM7 a TM6/TM9. Lze odhadnout do jaké míry (jak často) jsou tyto cesty otevřeny v porovnání s cestami identifikovanými v dřívějších studiích? Jakým způsobem by šlo tyto nové cesty experimentálně ověřit?
2. Podle Tabulky 1 na str. 26 bylo publikováno několik krystalových struktur Na^+/K^+ -ATPasy s navázaným ADP. Jak se liší konformace ADP v těchto strukturách s konformací pozorovanou v MD simulacích? Dále jak si mechanisticky vysvětlujete vliv protonizace aminokyselinových zbytků CBS na konformaci ATP/ADP pozorovanou ve vašich simulacích? Existuje pro tuto souvislost nějaké experimentální ověření?
3. V rámci dokování pomocí programu Autodock Vina byl parametr „exhaustiveness“ nastaven na hodnotu 400. Tento parametr určuje kolikrát je opakován výpočet v rámci jednoho spuštění programu. Běžně se však používají mnohem nižší hodnoty (např. 10-40). Můžete vysvětlit, proč byla použita hodnota 400? Souviselo to nějak s velikostí simulačního boxu? Vzhledem k tomu, že délka výpočtu je lineárně závislá na hodnotě exhaustiveness, nebylo by z hlediska nalezení korektního výsledku vhodnější spustit výpočet vícekrát s nižší hodnotou tohoto parametru? Celková délka výpočtu by byla stejná, ale díky větší randomizaci počátečních konformací by byla větší šance na nalezení konfigurace s minimem vazebné energie.
4. Jaký byl autorský podíl autorky na jednotlivých publikacích?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Petry Čechové představuje cenný přínos ke studiu mechanismu funkce Na^+/K^+ -ATPasy a jejích interakcí s malými organickými sloučeninami. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, většina výsledků již byla publikována. Autorka ve své

disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Petry Čechové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.



V Praze 10. Srpna 2018

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyz. a makromol. chemie
Přírodovědecká fakulta UK, Praha