

**Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Kristýny Boušové : Lokalizace a charakterizace vazebných míst pro Ca<sup>2+</sup> vázající proteiny a fosfatidylinositol fosfáty na intracelulárních koncích TRP kanálů.**

Předkládaná práce je napsána ve zkrácené formě v anglickém jazyce. Je založena na čtyřech publikacích v mezinárodních časopisech (z toho jedna je prvoautorská), které jsou součástí práce jako přílohy. Autorka studovala interakce obou intracelulárních konců vybraných iontových kanálů z rodiny TRP s různými ligandy ( proteiny calmodulin a S100A1, fosfatidylinositol fosfáty PIP2 a PIP3). Studované části receptorů expimovala v bakteriích E.coli a pak je izolovala a purifikovala. Konstrukty byly upravené pro snazší purifikaci a k zajištění rozpustnosti proteinů. Byly připraveny fragmenty s přirozenou sekvencí a s vybranými záměnami aminokyselin. Identita proteinů byla kontrolována hmotnostní spektrometrií a to, že fragmenty zaujímají konformaci blízkou přirozené bylo ověřováno CD spektroskopii. Interakci takto získaných rozpustných fragmentů proteinů s ligandy autorka experimentálně studovala celou řadou pokročilých biochemických a biofyzikálních metod. Strukturní aspekty interakce mezi molekulami také ověřovala pomocí molekulárního modelování.

Vlastní práce má 59 stran + 4 přílohy s publikacemi. Text má standardní členění. Úvod se zabývá v první části rodinou TRP receptorů z hlediska příbuznosti, struktury a funkcí. Ve druhé části jsou podrobněji rozebrány interakce TRP receptorů s několika rodinami důležitých intracelulárních ligandů, kteří se podílejí na regulaci receptorů. Jsou to vápník vázající proteiny kalmodulin a protein S100A1 a fosfatidylinositol fosfáty PIP2 a PIP3. Část Materiál a metody shrnuje stručně metody izolace, purifikace a ověření sekvence všech použitých proteinů. Podrobněji jsou pak rozebrány metody používané k detekci mezimolekulových interakcí, jako je rezonance povrchových plasmonů, fluorescenční značení molekul, měření anizotropie fluorescence a cirkulárního dichroismu.

Část Výsledky ukazuje jen malou část výsledků z receptoru TRPM4, ostatní výsledky jsou v příložených publikacích. Části Diskuse a Závěry se věnují rovnoměrně všem čtyřem publikacím. Jsou zde stručně rozebrány, komentovány a shrnuty výsledky ze všech studovaných typů receptorů. Seznam citované literatury obsahuje 152 položek.

Celá práce je provedena velmi pečlivě s minimem překlepů. Obrázky a grafy jsou bez technických nedostatků a chyb. Experimentální metody velmi dobře odpovídají položeným otázkám a jsou na velmi vysoké technické úrovni. Cíle práce byly splněny.

Témata publikovaných prací autorky pokrývají vlastnosti čtyř reprezentantů rodiny TRP receptorů, byla získána řada nových poznatků, které ukazují komplexnost procesů, kterými jsou tyto receptory

z intracelulární strany regulovány. Výsledky všech čtyř prací jsou na vynikající úrovni, což dokazuje i to, že práce úspěšně prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech.

Autorka prokázala schopnost samostatné tvořivé vědecké práce a splnila požadavky pro udělení titulu PhD.

V Praze dne 6.9. 2016

RNDr. Jan Krůšek CSc.

K práci mám jen několik otázek, které nijak nesnižují její vysokou úroveň:

- 1) Interakce částí TRP receptorů s calmodulinem, proteinem S100A, PIP2 a PIP3 do určité míry souvisí s elektrickou interakcí kladně nabitě části TRP receptoru a záporně nabitým partnerem. Snižování kladného náboje mutacemi se projevuje narušením interakce, naopak snížení záporného náboje calmodulinu vazbou vápníku je nutnou podmínkou pro interakci. Je možné pro to najít nějaké vysvětlení například molekulárním modelováním?
- 2) Výsledky studie ukazují, že vazební místa pro calmodulin, S100A1 a PIP2 na TRPV1 receptoru se překrývají. Přesto fyziologické účinky interakce s těmito ligandy jsou odlišné. Jak je možné tuto odlišnost vysvětlit?