



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Oddělení Proteinových struktur
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.
Václavská 1083
14220 Praha 4
Tel.: +420 241062191
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na práci

Functional and structural study of thermally activated TRP ion channels: The role of evolutionarily conserved motifs in the TRPA1 modulation

Autor práce: Mgr. Anna Kádková (roz. Hynková)

Předkládaná disertační práce Mgr. Anny Kádkové (roz. Hynkové) se zabývá úlohou mezidruhově konzervovaných strukturních a sekvenčních motivů v napěťové a chemické citlivosti iontového kanálu TRPA1. Studované oblasti se nacházejí v cytoplasmatických koncích a v S4-S5 oblasti TRPA1. Disertační práce vznikla na oddělení Buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AVČR, v.v.i. pod vedením RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc.

Práce je členěna do obvyklých částí zahrnující Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky a diskuze a Závěr. Kopie čtyř publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Anny Kádkové (roz. Hynkové) jsou uvedené formou přílohy. První tři práce jsou experimentální, čtvrtá práce je pak přehledový článek. Všechny tři experimentální práce byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Zvláště bych vyzdvihla publikaci v časopise *Scientific Reports* s IF 5.2, kde je Mgr. Anna Kádková (roz. Hynková) první autorkou. Na další publikaci v časopise *Neuropharmacology* (IF = 4.9) je pak sdílenou první autorkou. U třetí a čtvrté publikace je pak Mgr. Anna Kádková (roz. Hynková) součástí kolektivu autorů.

Práce je psána anglicky, formální úroveň a grafické zpracování je vynikající. Autorka v literárním přehledu detailně popisuje úlohu iontových kanálů se zaměřením na ankyrinový receptor TRPA1 a jeho možné modulace pomocí posttranslačních modifikací. V úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata, která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. V metodách je podrobně popsána metoda terčíkového zámku ("patch clamp"), jako nástroj pro studium iontových kanálů. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány.

V předkládané práci je vytčeno několik cílů. První část výsledků zahrnuje studium efektů mutací vysoce konzervovaného S/TPLH motivu na stabilitu TRPA1 receptoru a mapování fosforylačních míst pro Cdk5 v S/TPLH motivech. Z této části práce vyplývá, že konzervované N-koncové ankyrinové domény definují energetiku funkce brány kanálu TRPA1 a přispívají k chemické, vápníkové a

napětíové závislosti. Dále byl identifikován T673 jako fosforylační místo pro proteinkinasy Cdk5 lokalizované na flexibilní smyčce mimo ankyrinové domény. Výsledky jsou shrnuty v nedávno přijaté publikaci v *Scientific Reports*. V další publikaci v *Neuropharmacology* je navržena hypotéza vysvětlující molekulární podstatu dědičného onemocnění „familiálního epizodického bolestivého syndromu“ způsobeného mutací N855S v S4-S5 oblasti receptoru TRPA1. Poslední část práce je zaměřena na význam C-koncového segmentu ve vápníkem indukované modulaci TRPA1 a byla publikována v *Journal of Biological Chemistry*.

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Anny Kádkové (roz. Hynkové) představuje cenný přínos pro lepší pochopení regulace a funkce TRPA1 receptoru. Je zřejmé, že kandidátka si při řešení vytčených cílů osvojila řadu velmi sofistikovaných elektrofyziologických technik, především metodu terčíkového zámku ("patch clamp"), metody molekulární biologie, imunohistochemie a mikrofluorometrie (Ca^{2+} imaging). Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech. Výsledky práce jsou dobře diskutovány a dávány do souvislostí. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Předložená práce Mgr. Anny Kádkové (roz. Hynkové) více než vyhovuje všem požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji plně doporučuji k přijetí.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Jaké predikční servery byly použity pro predikci fosforylačních míst a proč byl T673 identifikován až následně? Jaká je spolehlivost (úspěšnost) těchto predikcí.
- 2) Z literatury a Vašich dat se předpokládá, že T673 je fosforylován Cdk5 a T1078 pomocí kaseinkinasy CK2. Jaký je konsensus sekvencí, který rozpoznávají tyto dvě proteinkinasy a jak se shodují se sekvencí kolem T673 a T1078?
- 3) Existuje řada proteinů a proteinových domén, které specificky rozpoznávají sekvence obsahující pSer či pThr. Jsou známy nějaké interakční partneři TRPA1 receptoru rozpoznávající příslušné motivy obsahující pThr (673 či 1078)? Mohli by se tyto partneři podílet na modulaci funkce TRPA1?
- 4) Jaký je význam mutací M131G/A133T v ankyrinové doméně č. 3? Proč jste mutovali methionin, tedy aminokyselinu objemným postranním řetězcem, právě na glycin, který nemá žádný postranní řetězec? Glycin navíc může významně ovlivnit konformační chování polypeptidového řetězce. Jak jste ověřili, že mutace neovlivnila strukturu (sbalení) TRPA1 receptoru?

- 5) Jak si vysvětlujete, že ve studii zabývající se familiálním epizodickým bolestivým syndromem, kde jste vnesli negativní náboj na pozici 852 mutací R852E došlo sice ke znovuobnovení funkce kanálu, avšak vápníková sensitivita byla pozměněná a Ca^{2+} ionty naopak inaktivovaly odezvy indukované skořicovým aldehydem?

V Praze dne 6. 7. 2016

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.