

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Jana Bílého : Charakterizace vazebných míst na intracelulárních koncích TRPC6 receptoru pro kalmodulin a S100A1.

Předkládaná práce je napsána v plné formě. Je založena na jedné ze tří autorových publikací, která je součástí práce jako příloha. Autor studoval interakce intracelulárního C konce TRPC6 iontových kanálů s regulačními proteiny kalmodulinem a proteinem S100A1. Oba proteiny vážou ionty vápníku a zprostředkovávají regulaci kanálu z vnitrobuněčné strany. Studované přirozené nebo mutované části receptorů autor expimoval v bakteriích E.coli a připravil a purifikoval je jako rozpustné proteiny. Interakci takto získaných fragmentů proteinů s ligandy experimentálně studoval řadou pokročilých biochemických a biofyzikálních metod. Strukturní aspekty interakce mezi molekulami také ověřoval pomocí molekulárního modelování.

Vlastní práce má 99 stran + přílohu s kopií publikace. Text práce má standardní členění. Úvod se podrobně zabývá vlastnostmi a tříděním rodiny TRP receptorů. Detailněji jsou pak rozebrány vlastnosti receptoru TRPC6 který je vlastním předmětem práce. Zvláštní kapitoly jsou věnovány vazebným partnerům TRPC6 kanálu - vápník vázajícím proteinům S100A1 a kalmodulinu. Jsou rozebrány i strukturní údaje o obou regulačních proteinech S100A1 a kalmodulinu.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a realisticky. Část Materiál a metody shrnuje metody izolace, purifikace a ověření sekvence všech použitých proteinů. Dále pak jsou popsány metody používané k detekci mezimolekulových interakcí, jako je fluorescenční značení molekul, měření interakce molekul pomocí anizotropie fluorescence, určování struktury proteinů pomocí cirkulárního dichroismu, měření změn elektroforetické pohyblivosti a homologní modelování struktury proteinů a jejich komplexů.

V rámci práce byl metodami molekulární biologie připraven vybraný rozpustný fragment intracelulární části C-konce TRPC6 receptoru 801-878 a řada jeho mutovaných variant. Stejnými metodami byl připraven i kalmodulin a protein S100A1. Byla ověřena identita proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie a jejich struktura pomocí cirkulárního dichroismu. Interakce části TRPC6 proteinu s vazebnými partnery byla prokazována a kvantifikována pomocí změn elektroforetické pohyblivosti, gelové permeační chromatografie a pomocí změn anizotropie fluorescence.

Porovnáním vazby s fragmentem intracelulární části C-konce TRPC6 s bodovými mutacemi na různých místech bylo prokázáno, že oba regulační proteiny interagují s receptorem v překrývající se, ale ne identické oblasti. Metodami homologního modelování byly vytvořeny počítačové modely komplexu C-konce TRPC6 receptoru s kalmodulinem a s proteinem S100A1.

Cíle práce byly splněny a výsledky přiměřeně diskutovány.

Seznam citované literatury obsahuje 196 položek.

Je škoda, že autor nezařadil do práce i výsledky některé z dalších publikací.

Autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce a splnil požadavky pro udělení titulu PhD.

V Praze 12. 9. 2016

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

K práci mám několik otázek:

Bylo by možné využít měření změn elektroforetické pohyblivosti nebo gelové permeační chromatografie ke kvantitativnímu stanovení interakce třeba ve formě určení disociační konstanty?

K lokalizaci interakce C- konce TRPC6 proteinu s calmodulinem a proteinem S100A1 bylo využito proteinů s bodovými mutacemi. Proč byly mutace využité v obou případech odlišné? Bylo by možné hledat mezi mutacemi aditivnost účinků (spíše tedy v logaritmické škále)?