

## Oponentský posudek disertační práce

### Jan Bílý: Charakterizace vazebných míst na intracelulárních koncích TRPC receptoru pro kalmodulin a S100A1

Cílem disertační práce Mgr. Jana Bílého bylo studovat interakci neselektivního kationtového kanálu TRPC6 s vazebnými partnery, kterými jsou vápník vážící proteiny kalmodulin a S100A1. Pro tento účel byl navržen a vytvořen plasmidový konstrukt kódující C-koncové intracelulární oblasti TRPC6 kanálu. Stejně tak byly vytvořeny jeho mutantní varianty, u nichž byly některé hydrofobní a základní aminokyseliny nahrazeny alaninem. Všechny tyto proteinové konstrukty byly exprimovány, purifikovány a dále využity pro studium interakcí s kalmodulinem a S100A1 pomocí biofyzikálně chemických metod.

Předložená práce má 99 stran, 17 obrázků, 4 tabulky, 5 grafů a je členěna klasickým způsobem. Seznam literatury obsahuje 196 citací. Jako přílohu obsahuje práce kopii článku, na kterém je kandidát uveden jako první autor. K práci je přiloženo i CD médium s její elektronickou verzí. V úvodu seznamuje autor čtenáře s problematikou TRP kanálů, jejich strukturou a funkcí, stejně jako s jejich potencionálními vazebnými partnery. Následuje metodická část s popisem použitých technik a pracovních postupů, dále část předkládající získané výsledky a diskuse. Práci zakončuje souhrn získaných výsledků a seznam citované literatury.

Domnívám se, že práce je dobrým příkladem fyzikálně chemického výzkumu proteinových interakcí. Za její nejhodnotnější část považuji zjištění, že vazebná místa pro kalmodulin a pro protein S100A1 se na C-konci kanálu TRPC6 překrývají, ale nejsou identická. Významný je rovněž i objev, že interakce s S100A1 proteinem je závislá na přítomnosti vápenatých kationtů. Na druhou stranu je nutno dodat, že spektrum použitých metod bylo omezené a uvedená zjištění je dle mého názoru třeba považovat za předběžná a ověřit je dalším výzkumem.

K práci mám několik poznámek:

- 1) Práce je psána vcelku srozumitelně. Přesto jsou některá místa formulována neobratně, nebo je použit slangový výraz (např. str. 30, druhý odstavec, věta začínající slovy: „Nýbrž delece druhé oblasti zvýšila SOCE odpověď...“, str. 35, třetí odstavec, věta začínající slovy: „Ní méně stále zůstává debatou interakce TRPC kanálů...“, str. 39, konec druhého odstavce: „Nakonec funkce TRPC6 je esenciální pro epiteliální buňky...“, str. 84, třetí odstavec: „histagová kotva“, atd.
- 2) Stejně tak jako je přílohou prvoautorská publikace kandidáta, mohly by být přiloženy i ostatní dvě neprvoautorské publikace. Postrádám rovněž specifikaci autorského podílu na uvedených třech publikacích.
- 3) Za vlastní jádro práce pokládám stanovení disociačních konstant pro jednotlivé studované komplexy pomocí měření anizotropie fluorescence. Proto bych byl uvítal, kdyby byl celý tento experiment mnohem lépe popsán. V Grafech 3 a 5 se ale nacházejí data jen pro 3 ze 6 studovaných komplexů; kompletní data jsou dostupná až jako finální vypočtené hodnoty v tabulkách 3 a 4.

- 4) Chybí rovněž mnohé detaily ohledně toho, kolikrát bylo měření anizotropie fluorescence opakováno, jaké byly použity koncentrace kalmodulinu, resp. S100A1 apod. Některé z těchto údajů lze najít v originální publikaci (příloze), ale to pokládám za nedostatečné.

K práci mám tyto dotazy:

1. Při výzkumu interakce TRPC6 proteinu s kalmodulinem byl použit i mutant TRPC6<sup>(801-878)K859A/R860A</sup>. Proč nebyl tento mutant použit rovněž pro studium interakce s proteinem S100A1?
2. Jak si vysvětľujete že při výzkumu interakce s proteinem S100A1 měl mutant TRPC6<sup>(801-878)K859A/R860A/R864A</sup> hodnotu  $K_d$  tak blízkou hodnotě pro WT?
3. Jakým způsobem byly při měření anizotropie fluorescence měřeny jednotlivé replikanty? Vycházely z nezávislých příprav vzorku, nebo alespoň z nezávislých měření koncentrace proteinů?

Přes uvedené drobné komentáře se domnívám, že předložená práce splňuje všechny podmínky, které jsou na ni kladeny. Doporučuji proto přijmout ji proto k další obhajobě.

V Praze 8. 9. 2016

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.