

## **POSUDEK EXTERNÍHO OPONENTA DOKTORSKÉ DIZERTAČNÍ PRÁCE:**

**“Interakce TRP kanálů s Ca<sup>2+</sup> vazebnými proteiny a PIP<sub>2</sub>” vypracované**

**Mgr. Blankou Holendovou**

---

Předložená dizertační práce Mgr. Blanky Holendové byla vypracována v oddělení proteinových struktur Fyziologického ústavu AV ČR pod vedením Ing. Jana Teisingera, CSc.

Práce se zabývá určením a charakterizací vazebných domén vybraných podtypů TRP receptorů, u kterých na základě primární aminokyselinové sekvence byl předpovězen konsensuální vazebný motiv pro cytoplazmatické proteiny kalmodulin a S100A1 (TRPV2, TRPV5, TRPM3, TRPC6) a pro membránový fosfolipid fosfatidyl-inositol-4,5- bisfosfát (PIP<sub>2</sub>; TRPV1).

Studium molekulárních mechanismů modulace aktivity TRP iontových kanálů prostřednictvím vazby membránových fosfolipidů a vápenatých iontů na univerzální nitrobuněčné proteiny obsahující konsensuální vazebné motivy, včetně tzv. EF-hand motivu, představuje jeden z aktuálních směrů výzkumu iontových kanálů. Biochemické a biofyzikální přístupy v tomto studiu představují nezbytný krok k identifikaci funkčně významných domén, které mohou nabýt potenciálně důležitý význam při hledání míst, kterými lze aktivitu TRP kanálů účinně regulovat. Není proto pochyby, že zvolené téma dizertační práce je aktuální a závažné a předložená práce přináší nové poznatky.

### **Struktura a formální úroveň práce a splnění cílů práce**

Práce je přehledně uspořádaná, relevantně dokumentována obrázky, logicky promyšlená a psána přesným a stylisticky přímočarým stylem. Cíle práce jsou formulovány na str. 18 v pěti bodech zahrnujících identifikaci a charakterizaci vazebných domén pro CaM na karboxylových koncích receptorů TRPV2, TRPV5 a TRPC6, na aminovém konci receptoru TRPM3 a studium vazby fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na TRPV1 receptor.

Podkladem experimentální části předložené práce jsou čtyři primární publikace v respektovaných mezinárodních časopisech (Amino Acids, IF 3.65, J. Biol. Chem., IF 4.6, Neurochem. Intl., IF 2.65, Plos One 3.53) souhrnně uvedené textem, jenž má včetně seznamu literatury a bez příložených publikací celkově 32 stran. V kapitole 5 je na třech stranách uveden souhrn výsledků předložených primárních publikací v hlavních souvislostech a v kontextu se současnou literaturou. Výsledky práce byly podrobeny odbornému recenznímu řízení a po technické stránce k nim nemám žádné zásadní připomínky.

Měla jsem příležitost přečíst a oponovat první dvě verze této dizertace v rámci interního oponentního řízení ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Všechny mé připomínky a náměty k vylepšení formální i obsahové stránky práce autorka velmi pozorně zapracovala. Stávající předložená verze dizertace podle mého názoru neobsahuje věcné ani formální nedostatky.

## **Vlastní vědecký přínos práce**

Předložená dizertace je uceleným souborem originálních výsledků publikovaných v impaktovaných mezinárodních časopisech (čtyři primární publikace o celkovém IF ~15). Výsledková část proto bezesporu svědčí o vědecké kvalitě a aktuálnosti řešené problematiky a z publikací uvedených v příloze je zřejmé, že autorka v průběhu postgraduálního studia získala bohaté zkušenosti samostatné a tvůrčí vědecké práce. Vysoce hodnotím systematickosti autorky a přímočarost při řešení experimentálních otázek.

Zejména bych chtěla ocenit skutečnost, že dizertační práce ve svém celku představuje metodicky ucelenou studii specificky zaměřenou na odhalení domén, které s vysokou pravděpodobností interagují s funkčně důležitými vazebnými proteiny a mohou určovat citlivost některých TRP receptorů k vápenatým iontům. Práce přináší zcela nové výsledky, které mohou v budoucnu přispět k rozpoznání klíčových domén a mechanismů, které se uplatňují v aktivaci řady TRP iontových kanálů. Výsledky dizertační práce jsou součástí aktuálního a velmi důležitého směru fyziologického výzkumu.

## **Závěr:**

V souhrnu konstatuji, že předložená práce Mgr. Blanky Holendové prokazuje zvládnutí náročné odborné tematiky a splňuje obsahové náležitosti doktorské dizertační práce. Autorka práce prokázala schopnost kritického posouzení formulovaných hypotéz a schopnost samostatné a tvůrčí vědecké práce. Proto doporučuji udělení titulu Ph.D.

V Praze, 11. května 2015

RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.  
Fyziologický ústav AV ČR  
Vídeňská 1083  
142 20 Praha 4 – Krč

## **Námět pro rozpravu:**

1. Autorce se podařilo prokázat vazbu kalmodulinu u TRPV2, TRPV5, TRPM3 a TRPC6 receptorů. Byla již pro některá vazebná místa jednoznačně prokázána funkční úloha v aktivaci, případně v regulaci vápenatými ionty? Mohla by autorka komentovat své výsledky v porovnání s nejnovějšími relevantními studii, ve kterých byla u stejných nebo blízkých příbuzných TRP receptorů identifikována vazebná místa pro kalmodulin?
2. Může vazba kalmodulinu modulovat funkci iontových kanálů nezávisle na vápenatých iontech?
3. Je známo, že PIP<sub>2</sub> na TRPV1 receptoru kompetuje s kalmodulinem o vazebné místo (Kwon, 2007). Do jaké míry jde o obecný mechanismus a u kterých TRP receptorů se tento mechanismus uplatňuje funkčně, tj. jaký má fyziologický význam?