

Oponentský posudek doktorské dizertační práce

Blanka Holendová : Interakce TRP kanálů s Ca²⁺ vazebnými proteiny a PIP₂.

Cílem doktorské dizertační práce Mgr. Blanky Holendové bylo identifikovat a charakterizovat vazebné domény pro kalmodulin, S100A1 protein a fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na N- a C-koncích některých proteinů z rodiny TRP kanálů. Dále bylo úkolem kandidátky studovat vazbu těchto domén (připravených rekombinantně ve formě krátkých peptidů) na zmíněné vazebné partnery pomocí biofyzikálních metod a zjistit, zda je tato vazba ovlivňovaná přítomností vápenatých kationtů. Zároveň bylo cílem práce prostudovat význam jednotlivých aminokyselin v uvedených vazebných doménách.

Celá práce má 33 stran, obsahuje 8 obrázků a její důležitou část představuje 34 stran příloh, obsahujících 4 původní vědecké články, na kterých je celá dizertace založena. Ve dvou případech je kandidátka uvedena na prvním autorském místě. V úvodu práce je velmi přehledně popsána problematika výzkumu TRP kanálů, jejich dělení na jednotlivé skupiny a jsou zde také uvedeny některé molekuly, které s těmito kanály interagují. Tento úsek je zakončen vyčlením vlastních cílů práce. V metodické části je předložen podrobný popis použitých technik a pracovních postupů. Následuje část Souhrn, která je vlastně určitou diskusí získaných výsledků, které jsou navíc uvedeny do širších souvislostí výzkumu v oblasti TRP kanálů. Grafická úroveň celé práce je velice dobrá.

Podle mého mínění se jedná o kvalitní dizertaci, týkající je neobyčejně důležité problematiky, kterou představuje regulace a signalizace TRP kanálů. Čtyři publikace, na kterých je celá práce založena mají jasné společné téma a představují jednotný celek. Úroveň těchto publikací je velice dobrá, zvláště bych chtěl poukázat na publikaci v J. Biol. Chem. z roku 2012, kde je kandidátka prvním autorem. Šíře použitých metod je přitom poměrně úctyhodná a zahrnuje jak bioinformatické přístupy, tak expresi a purifikaci rekombinantních proteinů a použití několika pokročilých biofyzikálních metod. Publikace navíc jasně naznačují možné postupy a cíle dalšího výzkumu dané oblasti, což je neobyčejně cenné.

K práci mám tyto poznámky:

1. Z autoreferátu dizertační práce vůbec nevyplývá, že je práce podávána jako soubor 4 publikací. To je myslím chyba. Jinak je ovšem autoreferát psaný velmi informativně.
2. Překvapilo mě, když jsem zjistil, že kandidátka na dané téma publikovala více prací, které nejsou do dizertace zařazeny, byť by tam tematicky naprosto zapadaly; např. práce „Bílý J. et al., Characterization of the S100A1 protein binding site on TRPC6 C-terminus“, publikovaná roku 2013 v PloS One.
3. Všechny předkládané práce mají řadu spoluautorů. Bývá vhodné nějakým způsobem upřesnit podíl kandidátky na jejich přípravě (např. které experimenty skutečně vlastníma rukama prováděla).

Rád bych kandidátku poprosil o zodpovězení následujících dotazů:

- A. Počátečním stadiem práce byla identifikace potenciálních vazebných motivů na N- a C- koncích TRP kanálů. Bylo by možné podrobněji vysvětlit, jak taková identifikace pomocí CaM target databáze probíhá? Existuje nějaká podobná S100A1 target databáze?
- B. Jaká je příbuznost kalmodulinu a S100A1 proteinu? Je možné prakticky rozlišit, jestli např. identifikovaná CaM vazebná místa nejsou ve skutečnosti místy pro S100A1?
- C. V práci je několikrát uvedeno, že bez přítomnosti vápenatých iontů nebyla vazba CaM, případně S100A1 proteinu na studované peptidy pozorována. Na str. 14 Vaší práce citujete publikaci, uvádějící, že afinita CaM k vápenatým kationtům se v přítomnosti iontového kanálu zvyšuje. Pozorovala jste, zda k takovému zvýšení afinity stačí i přítomnost N- nebo C-koncového peptidu TRP kanálu?

Na závěr bych rád uvedl, že zmiňované připomínky naprosto nemají za cíl snižovat kvalitu této dizertační práce. Kandidátka svojí předkládanou dizertací velmi dobře prokázala své předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a plně souhlasím s tím, aby jí byl udělen titul Ph. D.

V Sušici, 8. května 2015

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.