

# OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE

nazvané

## Mechanismy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů

Autorka dizertační práce: **Mgr. Štěpána Boukalová**

### Hodnocení:

Dizertační práce Štěpány Boukalové se zabývá studiem struktury a funkce rekombinantních TRPV1 kanálů, které se vyskytují především v nociceptorech, a fyziologickou modulací přirozeně se vyskytujících TRPV3 receptorů v lidských keratinocytech. Ke studiu TRP kanálů použila metody molekulární biologie a elektrofyziologické techniky patch clamp. Divoký typ a mutace TRPV1 receptorů studovala v transfekovaných HEK buňkách a TRPV3 receptor v linii lidských keratinocytů HaCaT.

Výsledky práce jsou rozděleny do dvou částí. V první části dizertační práce se autorka zabývala významem transmembránové oblasti, označené S1, ve funkci TRPV1 iontového kanálu. Studovala elý S1 úsek složený ze 17 aminokyselin pomocí skenovací mutagenese, především záměnou za tryptofan, a našla šest nových nefunkčních mutací. Detailně popsala mutaci kladně nabitého argininu v konzervované pozici 455 (R455K), která byla necitlivá ke stimulačnímu účinku nízkého pH a měla pomalejší nástup odpovědi při stimulaci agonistou než divoký typ receptoru. Zjistila, že protony mají naopak inhibiční účinek na klidový proud buněk transfekovaných touto mutací a jako první popsala tento jev také u jiných mutací s podobným fenotypem, které byly již dříve popsány, a které se nacházejí v různých částech receptoru. Dále zjistila, že klidový proud byl u všech těchto receptorů zvýšený již před aplikací agonisty, odmyváání kapsaicinu bylo pomalejší, potenciační účinek protonů na kapsaicinové odpovědi chyběl, teplotní citlivost byla snížena a napěťová citlivost byla naopak zvýšena. Studovala také nekonzervovaná rezidua v blízkosti konzervovaného argininu 455, a u některých mutací také pozorovala pomalý nástup a pomalou deaktivaci. Vyslovila hypotézu, že všechny tyto mutace narušují rovnováhu mezi otevřeným a zavřeným stavem iontového kanálu, že zavřený stav mutací je stabilizován snížením pH extracelulárního prostředí, a že tento jev se vyskytuje i u divokého typu TRPV1 receptoru, kde je inhibiční působení protonů maskováno jejich aktivačním účinkem.

Ve druhé části práce studovala přirozeně se vyskytující i transfekovaný TRPV3 receptor v linii lidských keratinocytů. Nalezla, že stimulace HaCaT buněk epidermálním růstovým faktorem (EGF) vede k senzitivaci endogenních TRPV3 receptorů. Zjistila, že tato modulace je závislá na aktivitě MAPK a ERK dráhy, protože senzitivace TRPV3 receptorů zprostředkovaná EGF byla inhibována látkami blokujícími funkci proteinů MEK1 a MEK2, jejichž hlavní úlohou je fosforylovat ERK.

Experimentální výsledky této práce byly publikovány ve dvou prvoautorských publikacích autorky otištěných v mezinárodních časopisech s IF=5,328 (2010) a 4,808 (2012), a jedna práce kde je spoluautorkou je přijata do tisku v časopise s IF=6.908 (2012).

### Forma práce:

Práce je předložena ve formě, která odpovídá klasické formě dizertační práce. Má standardní členění na „Teoretický úvod“ a „Cíle práce“, (20 stran), „Metody“ (9 stran), „Výsledky“ (25 stran) „Diskuse“ a „Závěr“ (10 stran), celkem má práce 87 stran včetně obrázků a 125 literárních odkazů. Je po formální stránce zpracovaná přehledně a na vysoké úrovni.

### Drobné poznámky:

Drobné poznámky byly již dříve autorce předány a jsou v konečné verzi opraveny.

### Otázky:

1. V práci bylo uvedeno, že TRPV3 receptory jsou senzitivizovány při opakované či prodloužené stimulaci agonisty a tento jev není závislý na buněčném prostředí. Může senzitivizace TRPV3 souviset s dilatací póru iontového kanálu, podobně jako bylo popsáno u TRPV1 a P2X receptorů? Mohl by pomalý nástup první odpovědi být způsoben postupnou dilatací póru iontového kanálu a rychlá kinetika nástupu druhé odpovědi TRPV1 receptoru na kapsaicin rychlou aktivací již dilatovaného kanálu?
2. Mohlo by pomalé odmyváání při deaktivaci být způsobeno změnou citlivosti receptoru? Byla citlivost R455K, R557K, G563S a T633A k agonistům vyšší než u WT receptoru?
3. Protony interagují se záporně nabitými aminokyselinovými zbytky TRPV1 receptoru vystavenými extracelulárnímu prostředí. Je známo, zda protonace iontového kanálu vede ke změně citlivosti TRPV1 ke kapsaicinu?

### Závěr:

Závěrem lze shrnout, že autorka ve své dizertační práci prezentuje výsledky, které zásadním způsobem přispěly k porozumění vztahu mezi strukturou a funkcí TRPV1 kanálů, především mechanismu jeho otevírání a zavírání. Jako první popsala stabilizaci uzavřeného stavu TRPV1 iontového kanálu extracelulárními protony a senzitivizaci přirozeně se vyskytujících TRPV3 receptorů v keratinocytech. Není pochyb o tom, že autorka svými původními nálezy významně přispěla k lepšímu porozumění mechanismů aktivace a modulace TRPV receptorů, které hrají důležitou roli ve vnímání bolesti i mnoha jiných fyziologických procesech. Předložená dizertační práce přináší nové vědecké poznatky a odpovídá tak požadavkům kladeným na dizertační práci tohoto druhu.

V Praze dne 10.12.2013

RNDr. Hana Zemková, CSc.  
Fyziologický ústav AVČR  
Víteňská 1083  
142 20 Praha 4  
Tel.: +420-2 4106 2574  
Fax: +420 2 4106 2488  
e-mail: [zemkova@biomed.cas.cz](mailto:zemkova@biomed.cas.cz)