

**Externí posudek dizertační práce Mgr. Venduly Tvrdoňové:  
“Úloha variabilních řetězců na rozhraní podjednotek ve formování ATP-  
vazebné kapsy a funkci P2X4 receptoru”**

---

Dizertační práce Mgr. Venduly Tvrdoňové je zaměřena na charakterizaci úlohy aminokyselinových zbytků specifických oblastí purinergního P2X4 receptoru, které jsou důležité pro aktivaci iontového kanálu.

Za využití heterologní exprese, elektrofyziologické techniky whole-cell a systematické záměny aminokyselinových zbytků za alanin, nebo cystein autorka přispívá nejen k objasnění aktivačního mechanismu ionotropních purinergních receptorů, ale rovněž vyslovuje hypotézu o možné úloze charakterizovaných oblastí v konformačních změnách spojených s desenzitizací P2X4 receptoru. Autorka se soustředí zejména na funkčně významné domény v oblastech rozhraní mezi receptorovými podjednotkami (14 a 12 reziduí v dané oblasti) a v oblasti vnějšího vestibulu kanálu (vždy 15 reziduí v transmembránové oblasti TM1 a TM2).

Předložená dizertační práce obsahuje velké množství originálních dat a přispívá k pochopení konformačních změn spojených s aktivací, desenzitizací a alosterickou modulací P2X4 receptoru. Kromě rozsáhlého objemu nových experimentálních výsledků oceňuji, že data jsou popsána objektivně, v jednoznačném kontextu se současnou světovou literaturou a současnými znalostmi o struktuře a funkci P2X receptorů. Výsledky prezentované v dizertační práci přinášejí řadu nových výsledků v aktuální oblasti výzkumu a jsou podkladem tří primárních publikací v respektovaných mezinárodních časopisech (dva v PlosOne, IF 3.5 (2014) and jeden Pflugers Arch. IF 3.1 (2014)). Kromě toho se autorka podílela na tématicky souvisejících článcích, dvou publikovaných ve Physiological Research (2014, IF 1.5) a jedné primární publikaci v časopisu Biochemistry.

Cíle práce jsou formulovány na str. 33 ve třech specifických bodech zahrnujících 1) objasnění úlohy specifické oblasti mezi dvěma podjednotkami, 2) určení funkční úlohy 30 reziduí v oblasti extracelulárního vestibulu kanálu a 3) interpretaci získaných dat pomocí kinetického modelu. Výsledková část v rozsahu 30 stran jednoznačně prokazuje splnění cílů.

Po formální stránce je práce velmi přehledně uspořádaná, logicky promyšlená, psána přesným a stylisticky přímočarým stylem a relevantně dokumentována 22 obrázky.

Měla jsem příležitost přečíst a oponovat první verzi této dizertace v rámci interního oponentního řízení ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Drobné překlepy označené přímo v textu jsem předala autorce.

Jistě by předložené práci prospělo několik drobných stylistických a gramatických oprav, zejména:

- sjednotit pravopis slova desensitizace (s versus z),
- slovo "spjetí" na str. 14
- méně používat anglicismy typu: "..variující mezi adeninem a guaninem" (str. 15), "..možné ovlivňování skrze...", "Skrze převod signálu ...", "..vztahy byly testovány skrze ...." (str. 14, 29, 33, 44 atd....), "esenciální AMK" (str. 24), "Fiktivní trasa ukazuje..." (str. 43)
- Jak byla vypočtena vážená časová konstanta  $\tau_{des}$ . Uvedená definice není správně (strana 44)?

- Nejsem přesvědčená o vhodnosti obrázku 3, který uvádí příklady membránové topologie a homo- či hetero-merizace některých vybraných iontových kanálů. Snad by bylo vhodnější porovnat rodinu P2X kanálů jen s ASIC kanály, nebo se zaměřit na rozdíly v rámci P2X.
- Není příliš zřejmé, proč jsou v (pod)kapitole 1.3.1.1 uvedeny postupně vazebné motivy pro ATP na obecné úrovni - je-li ve vztahu k P2X vazebné místo známé. Trochu mě jako čtenáře činila nervózní 5. úroveň podkapitol v této části (je to nutné?).
- Kvalita obrázku 4 je nedostačující, navíc se jen nepřímě vztahuje k řešené problematice.

### **Závěr:**

Studium aktivačních mechanismů iontových kanálů představuje jeden ze závažných směrů neurofyziologického výzkumu. Není proto pochyby, že zvolené téma dizertační práce je aktuální a závažné. Kandidátka prokázala vysokou odbornou kvalifikaci a zvládnutí náročných elektrofyziologických, molekulárně biologických a biochemických technik.

V souhrnu konstatuji, že předložená práce Mgr. Venduly Tvrdoňové prokazuje zvládnutí náročné odborné tematiky a splňuje jak formální, tak obsahové náležitosti doktorské dizertační práce. Autorka práce prokázala schopnost samostatné vědecké práce a kritického posouzení formulovaných hypotéz. S ohledem na všechny skutečnosti uvedené v textu posudku doporučuji, aby Mgr. Vendule Tvrdoňové byl udělen titul Ph.D..

Praha, 13.11.2014

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

### **Námět pro rozpravu a otázky:**

1. Krystalová struktura P2X<sub>4</sub> receptoru byla vyřešena s navázaným ATP. Proč se tedy domníváte, že přesná poloha ATP kontaktu s molekulou receptoru není známa? Jaké indicie tomu nasvědčují ve Vaší práci?
2. Kinetický model P2X<sub>4</sub>R je prezentován pouze ve zkratce a v práci nejsou uvedeny hodnoty rychlostních kinetických konstant, které byly pro modelování použity. Jaká měření byla prováděna k získání těchto konstant a byly tyto hodnoty získány pro P2X<sub>4</sub>R?
3. Autorka ukázala, že zatímco oblast nacházející se v horní části obou řetězců LF a DF se podílí na přesné organizaci ATP-vazebné kapsy a iniciaci převodu signálu směrem ke spodní části řetězců, aminokyseliny R203 a N204 mohou integrovat informaci přicházející z obou řetězců a směřovat ji k bráně receptorového kanálu. Lze něco říci o úloze náboje/polarity těchto aminokyselin v převodu signálu?