

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Studium vazebných partnerů a modulace funkčních vlastností
kalmodulinu a jeho fúzních proteinových variant**

**Study of binding partners and modulation of calmodulin functional
properties and its fusion protein variants**

Monika Zouharová

Praha, 2024

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Biochemie a patobiochemie na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy a Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky

Školitel: RNDr. Kristýna Boušová, Ph.D.

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Biochemie a patobiochemie dne v od hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D., Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
1. LF UK a VFN

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Studium vazebných partnerů a modulace funkčních vlastností kalmodulinu a jeho fúzních proteinových variant

Abstrakt

Disertační práce se zabývá studiem kalmodulin (CaM) - dependentní modulace podrodiny iontových kanálů TRPM, zapojených do patogeneze kardiovaskulárních, neurodegenerativních či nádorových chorob. Celkem bylo na iontových kanálech TRPM4, TRPM5, TRPM6 a TRPM7 detailně charakterizováno pět nových vazebných epitopů pro CaM. Výsledky molekulového modelování a dokování prokázaly dobrou přístupnost vazebných epitopů pro interakci s CaM. Formace komplexů s CaM byla podmíněna přítomností bazických reziduí, typických pro nekovalentní interakce CaM s iontovými kanály rodiny TRP. V případě TRPM5, TRPM6 a TRPM7 se jedná o první studie poukazující na potencionální modulaci kanálů prostřednictvím CaM. CaM byl dále studován s ohledem na možnou optimalizaci vlastností molekuly v rámci fúzních proteinových konstruktů. Spojením CaM s vnitřně neuspořádanou C-koncovou doménou proteinu ameloblastinu (AMBN-Ct) byla získána inovativní fúzní molekula CaM/AMBN-Ct. Spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD) a vazebné studie prokázali zachování požadovaných strukturně-funkčních vlastností CaM v CaM/AMBN-Ct. Výsledky sedimentačních analýz i spektroskopie CD poukázaly na komunikaci fúzních partnerů. Vzájemné kontakty mezi CaM a AMBN-Ct ve fúzní molekule vedly k signifikantnímu navýšení teplotní stability CaM. Fúzní konstrukt CaM/AMBN-Ct tak může být základem designu stabilnějších biomedicínsky/biotechnologicky využitelných molekul založených na unikátních vlastnostech molekuly CaM.

Klíčová slova: Ameloblastin, fúzní proteiny, iontové kanály TRPM, kalmodulin, proteinové inženýrství, vnitřně neuspořádané proteiny

Study of binding partners and modulation of calmodulin functional properties and its fusion protein variants

Abstract

The thesis studies calmodulin (CaM)-dependent modulation of the TRPM ion channel subfamily involved in the pathogenesis of cardiovascular, neurodegenerative diseases or cancer. In total, 5 new CaM-binding epitopes were characterized in detail in TRPM4, TRPM5, TRPM6, and TRPM7. The results of molecular modeling and docking showed good accessibility of the binding epitopes for an interaction with CaM. The presence of basic residues, typical for non-covalent CaM interactions with TRP, was required for the formation of complexes with CaM. As regards TRPM5, TRPM6, and TRPM7, this is the first study that indicates their potential modulation by CaM. Furthermore, CaM was studied in terms of possible optimization of the properties of the molecule in fusion protein constructs. The innovative fusion molecule CaM/AMBN-Ct was obtained by fusing CaM and an intrinsically disordered C-terminal domain of ameloblastin (AMBN-Ct). As shown by circular dichroism (CD) spectroscopy and binding studies, the required structural and functional properties of CaM are preserved in CaM/AMBN-Ct. The results of sedimentation analyses and CD spectroscopy indicated communication between the fusion partners. Mutual contacts between CaM and AMBN-Ct in the fusion molecule resulted in a significant increase in thermal stability of CaM. The CaM/AMBN-Ct fusion construct thus may be used for the design of more stable molecules based on unique CaM properties, for biomedical and biotechnological applications.

Key words: Ameloblastin, calmodulin, fusion proteins, intrinsically disordered proteins, protein engineering, TRPM ion channels

Obsah

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
1.1. Kalmodulin	8
1.1.1. Struktura a vazebné vlastnosti CaM.....	8
1.2. TRP kanály	9
1.2.1. Podrodina TRPM	9
1.3. Proteinové inženýrství	11
1.3.1. Fúzní proteiny a jejich využití v biomedicíně	11
1.4. Vnitřně neuspořádané proteiny a ameloblastin	13
2. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	14
3. MATERIÁL A METODY	16
3.1. Purifikace proteinů	16
3.1.1. Nativní purifikace CaM a CaM/AMBN-Ct	16
3.1.2. Denaturační purifikace AMBN-Ct.....	16
3.2. Fluorescenční spektroskopie	17
3.3. Analytická ultracentrifugace	18
3.4. Spektroskopie cirkulárního dichroismu	18
3.5. Molekulové modelování a molekulová dynamika	18
4. VÝSLEDKY	20
4.1. Identifikace a charakterizace vazebných míst pro CaM u podrodiny iontových kanálů TRPM	20
4.1.1. Identifikace vazebných míst pro CaM	20
4.1.2. Role bazických aminokyselin při formování komplexů CaM/TRPM.....	20
4.1.3. Lokalizace vazebných epitopů na kanálech TRPM a molekulové dokování .	22
4.2. Modulace vlastností CaM ve fúzních konstruktech	22
4.2.1. Design a strukturní charakteristiky fúzní molekuly	22
4.2.2. Vazebné funkce CaM/AMBN-Ct	24

4.2.3. Teplotní stabilita CaM/AMBN-Ct	24
4.2.4. Simulace dynamického chování fúzní molekuly	24
5. DISKUZE	26
6. ZÁVĚR.....	30
7. SOUHRN.....	32
8. SUMMARY.....	33
9. LITERATURA	34
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI.....	40

1. Úvod do problematiky

1.1. Kalmodulin

Kalmodulin (CaM) je evolučně konzervovaný intracelulární protein všech eukaryotických buněk. CaM monitoruje změny intracelulární koncentrace vápenatých iontů a následně reguluje aktivitu esenciálních signalizačních kaskád řídících buněčnou proliferaci, diferenciaci, apoptózu či autofágii (Berchtold and Villalobo, 2014).

1.1.1. Struktura a vazebné vlastnosti CaM

CaM je malý (16,7 kDa) α -helikální protein, jehož N- i C-koncová globulární doména obsahuje vždy 2 motivy tzv. EF-ruky zajišťující interakci s ionty Ca^{2+} (Barbato et al., 1992, Kuboniwa et al., 1995). V důsledku vazby Ca^{2+} dochází k reorientaci α -helixů CaM a zpřístupnění hydrofobních vazebných motivů pro cílové proteiny. Formace prvních popsaných komplexů CaM s cílovými proteiny probíhala právě při navýšení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} . Nové vazebné epitopy pro CaM/ Ca^{2+} jsou identifikovány na základě typických biochemických a biofyzikálních charakteristik, jako je amfipatický charakter sekvence s alespoň 2 hydrofobními aminokyselinovými rezidui a vmezeřenými zbytky bazických aminokyselin či tendence k tvorbě α -helikálních struktur (Bahler and Rhoads, 2002). Dle pozice klíčových hydrofobních aminokyselin jsou vazebné motivy pro CaM řazeny do 2 hlavních (1-10, 1-14) a 4 minoritních (1-3, 1-16, 1-17, 1-18) skupin (Grant et al., 2020).

CaM disponuje enormní konformační plasticitou danou jednak přítomností flexibilního linkeru mezi jeho N- a C-koncovou doménou a dále odlišnou vazebnou afinitou jednotlivých motivů EF-ruky k iontům Ca^{2+} (Liu et al., 2017, Liu et al., 2019). Výsledkem je široké spektrum možných vazebných módů CaM (od vysoce kompaktních až po natažené) a schopnost interakce s více než 300 cílovými proteiny

včetně řady zástupců nejpočetnější rodiny iontových kanálů – transient receptor potential (TRP) kanálů (Fallon and Quirocho, 2003, Johnson et al., 2018, Zhu, 2005).

1.2. TRP kanály

Rodinu TRP kanálů tvoří polymodálně aktivované kationtové kanály, jejichž dysfunkce souvisí s rozvojem nádorových, kardiovaskulárních, neurodegenerativních, či metabolických onemocnění (Nilius, 2007). Lidské TRP kanály jsou dle sekvenční homologie členěny do 6 podrodin: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPML (mucolipin), TRPPP (polycystin) a TRPA (ankyrin) (Samanta et al., 2018). Nejpočetnější podrodinou, spojenou s řadou patologických stavů, je podrodina TRPM.

1.2.1. Podrodina TRPM

Podrodina TRPM zahrnuje 8 iontových kanálů členěných na základě sekvenční homologie do 4 podskupin: TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM4/TRPM5 a TRPM6/TRPM7 (Harteneck, 2005). Iontové kanály podrodiny TRPM typicky disponují homotetramerní strukturou, kdy každou podjednotku tvoří 6 transmembránových segmentů a intracelulární N-konec končí se 4 melastatinovými homologními oblastmi (Huang et al., 2020). Cytoplazmatický C-konec TRPM kanálu obsahuje TRP doménu a doménu typu coiled-coil. Unikátní charakteristikou C-konce TRPM2, TRPM6 a TRPM7 je navíc přítomnost domény s enzymatickou aktivitou. (Perraud et al., 2001, Ryazanova et al., 2001) Kanály podrodiny TRPM jsou přítomny v širokém spektru tkání a jejich dysregulace má enormní patofyziologický dopad (Jimenez et al., 2020). Mezi nejrozšířenější modulatory jejich aktivity patří oscilace intracelulární hladiny iontů Ca^{2+} (Hasan and Zhang, 2018). Ty mohou TRPM kanály regulovat buď přímou interakcí, nebo je efekt změny hladiny Ca^{2+} zprostředkován proteiny navazujících signálních drah (Vangeel and Voets, 2019).

1.2.3.1. CaM-dependentní regulace podrodiny TRPM

V rámci rodiny TRP kanálů představuje CaM rozšířený pozitivní i negativní regulátor (Hasan and Zhang, 2018). U podrodiny TRPM byla prokázána přímá regulace prostřednictvím CaM v případě TRPM4 a TRPM2, avšak u většiny členů této podrodiny byly identifikovány vazebné epitopy pro CaM, jejichž funkční význam zbývá ověřit, nebo jejich popis dosud chybí (Nilius et al., 2005, Tong et al., 2006).

U podskupiny TRPM1/TRPM3 bylo identifikováno 5 vazebných epitopů pro CaM na TRPM3, poukazujících na zapojení CaM do jeho negativní zpětnovazebné regulace (Przibilla et al., 2018, Holakovska et al., 2012, Holendova et al., 2012).

Regulace prostřednictvím CaM probíhá u obou zástupců podskupiny TRPM2/TRPM8. CaM/Ca²⁺ funguje jako pozitivní zpětnovazebný modulátor kanálu TRPM2, který disponuje 2 fyziologicky významnými vazebnými epitopy pro CaM (Tong et al., 2006, Gattkowski et al., 2019). U TRPM8 dochází k negativní zpětnovazebné regulaci aktivovaným CaM (Sarria et al., 2011). Ten pravděpodobně moduluje TRPM8 buď přímou vazbu nebo prostřednictvím PIRT, kdy CaM/Ca²⁺ disociuje z klidového komplexu CaM/PIRT a volný PIRT snižuje dostupnost aktivačních molekul PIP2 (Sisco et al., 2020).

Aktivace členů podskupiny TRPM4/TRPM5 je podmíněna nárůstem intracelulární hladiny Ca²⁺ a v případě TRPM4 je spjata s molekulou CaM (Hofmann et al., 2003, Nilius et al., 2005). U 3 vazebných epitopů TRPM4 bylo detailně popsáno vazebné rozhraní s CaM, přičemž vazebné místo na C-konci TRPM4 se překrývá s fragmentem TRPM4 nezbytným pro jeho pozitivní zpětnovazebnou regulaci závislou na CaM (Bousova et al., 2018, Bousova et al., 2020). (Nilius et al., 2005). U TRPM5 byl identifikován jediný vazebný epitop pro CaM poukazující na potenciální zapojení CaM do Ca²⁺-dependentní regulace TRPM5 (Bousova et al., 2022).

V rámci podskupiny TRPM6/TRPM7 bylo u TRPM6 i TRPM7 popsáno 1 vazebné místo pro CaM, indikující možnost CaM-dependentní regulace členů podskupiny TRPM6/TRPM7 (Zouharova et al., 2019, Bousova et al., 2021b).

Navzdory širokému patofyziologickému dopadu dysregulace TRPM zůstávají poznatky ohledně CaM-dependentní modulace této podrodiny velmi omezené. Objasnění jejich regulace přitom představuje klíčový krok pro vývoj nových terapeutik.

1.3. Proteinové inženýrství

Rozvoj proteinového inženýrství umožňuje cílenou modifikaci stávajících nebo vytvoření nových funkcí proteinů a jejich následné biomedicínské/biotechnologické využití. Mezi atraktivní metody proteinového inženýrství patří technologie proteinových fúzí, umožňující přípravu bi/multi-funkčních proteinů nebo modulaci stávajících vlastností fúzních partnerů.

1.3.1. Fúzní proteiny a jejich využití v biomedicině

Úspěšný design fúzních proteinů je podmíněn vzájemnou kompatibilitou vlastností jednotlivých molekul, volbou vhodných peptidových linkerů nebo delecí neesenciálních částí molekul pro zlepšení prostupnosti zejména nádorových tkání. Mimo jiné je třeba zhodnotit i vliv vzájemné orientace fúzních partnerů na ustavení mezi-doménové komunikace a výslednou strukturu/stabilitu nových molekul (Bousova et al., 2021a).

Prvním schváleným léčivem z kategorie fúzních terapeutik byl Enbrel. Enbrel náleží mezi tzv. decoy receptory a je tvořen vazebnou doménou receptoru p75 pro tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a konstantní částí (fragment Fc) lidského imunoglobulinu G1 (Goffe and Cather, 2003). Enbrel funguje jako kompetitivní inhibitor TNF- α , který je spojen s rozvojem chronických zánětlivých onemocnění. Klíčovou vlastností fúzních terapeutik je možnost cílení do místa určení *in vivo*. Fragменты protilátek fúzované s cytokiny nachází uplatnění zejména při léčbě

nádorových nebo chronických zánětlivých onemocněních (Mansurov et al., 2021). Na přesném cílení terapeutik jsou dále založeny imunotoxiny s cytotoxickou složkou pro terapii nádorových či infekčních onemocnění (Mathew and Verma, 2009, Spiess et al., 2016). Prostřednictvím konstruktů protilátka/enzym lze cílit substituční enzymatickou terapii v případě Pompeho choroby nebo mukopolysacharidóz (Yi et al., 2017, Fecarotta et al., 2018). Konstrukty typu protilátka/enzym mohou také aktivovat následně podané proléčivo a minimalizovat systémové efekty zejména nádorové terapie (Mishra et al., 2018). Design řady fúzních terapeutik byl dále optimalizován pro zajištění průchodnosti hematoencefalickou bariérou prostřednictvím cílení na inzulinové nebo transferinové receptory (Pardridge and Boado, 2012).

1.3.1.1. Fúzní proteiny založené na CaM

Design fúzních konstruktů odvozených od CaM využívá zejména konformačních změn molekuly CaM při vazebných interakcích. Typickým příkladem jsou kalciové biosenzory založené na fúzi CaM a fluorescenčních proteinů, reagujících na konformační změny v CaM změnou svých fluorescenčních vlastností. Kalciové biosenzory nachází využití při studiu gastrulace či neurální okruhů v motorickém a somato-senzorickém kortexu (Shindo et al., 2010, Tian et al., 2009).

Biosenzory založené na CaM lze dále využít jako high-throughput technologii pro detekci farmakologicky atraktivních ligandů CaM. Při aktivaci těchto biosenzorů ionty Ca^{2+} dochází např. k vazbě fenothiazinových derivátů a příbuzných tricyklických antidepresiv k molekule CaM a změně fluorescenční emise fúzovaných fluorescenčních proteinů (Dikici et al., 2003). Kromě antidepresiv mohou inhibitory CaM nacházet využití také při léčbě bolesti či neurodegenerativních a nádorových onemocnění (Olah et al., 2007, O'Day, 2020, Jung et al., 2010).

Vlastnosti CaM lze kromě designu biosenzorů uplatnit při optimalizaci rekombinantní produkce terapeuticky významných proteinů. Fúze s CaM umožňuje v buňkách *E. coli* dostatečnou expresi solubilních antimikrobiálních peptidů (AMPs),

ačkoli samostatné peptidové sekvence vykazují značnou cytotoxicitu (Ishida et al., 2016). AMPs sdílí vysoký stupeň podobnosti s vazebnými motivy pro CaM a v rámci fúzního konstruktů dochází k jejich maskování prostřednictvím interakcí s molekulou CaM. Fúzní expresní systémy mohou CaM využívat rovněž jako univerzální purifikační kotvu pro hydrofobní interakční chromatografii.

Vlastnosti aplikačně významných molekul jsou často optimalizovány pro použití v suboptimálních podmínkách. Vysoký modulační potenciál nabízí fúze s vnitřně neuspořádanými proteinovými sekvencemi, kdy na podkladě jejich enormní konformační flexibility dochází ke komunikaci mezi fúzními partnery (Zouharova et al., 2021).

1.4. Vnitřně neuspořádané proteiny a ameloblastin

Vnitřně neuspořádané proteiny (IDPs) zaujímají široký soubor vzájemně přecházejících konformačních stavů bez stabilní 3D struktury (Uversky and Dunker, 2010). Do podskupiny IDPs interagujících s ionty Ca^{2+} patří extracelulární protein zubní skloviny ameloblastin (AMBN). AMBN se podílí na tvorbě matrice pro růst hydroxyapatitových krystalů, přičemž sestavování supramolekulárních struktur AMBN řídí oligomerizační motiv v N-koncové doméně AMBN (Wald et al., 2017, Wald et al., 2013). K vazbě iontů Ca^{2+} dochází pravděpodobně v jeho acidické C-koncové doméně (AMBN-Ct), která sama o sobě nemá oligomerizační potenciál a vazbu Ca^{2+} zajišťuje pouze ve spojení s oligomerizační vlastností AMBN (Vetyskova et al., 2020). Monomerní charakter samostatné AMBN-Ct a její kompletní vnitřní neuspořádanost z ní činí vhodného kandidáta pro modulaci proteinových molekul v rámci fúzních konstruktů.

2. Hypotézy a cíle disertační práce

Část 1: Identifikace a charakterizace vazebných míst pro CaM u podrodiny iontových kanálů TRPM

CaM reguluje aktivitu stovek cílových proteinů zapojených do klíčových fyziologických procesů. Mezi důležité cíle molekuly CaM patří iontové kanály rodiny TRP. Jelikož CaM představuje rozšířenou modulační molekulu v rámci rodiny TRP kanálů, předpokládáme existenci podobných vazebných míst pro CaM také u podrodiny TRPM, kde zůstávaly poznatky ohledně CaM-dependentní regulace limitované.

Cílem práce je:

- Lokalizace a charakterizace nových vazebných epitopů pro CaM na intracelulárních koncích vybraných členů podrodiny TRPM (TRPM4, TRPM5, TRPM6 a TRPM7)
- Ověření charakteristické role bazických aminokyselinových zbytků v zajištění vazby molekuly CaM
- Konstrukce modelu CaM v interakci s nově identifikovanými vazebnými epitopy podrodiny TRPM

Část 2: Modulace vlastností CaM prostřednictvím proteinových fúzí

Vlastnosti aplikačně významných molekul mohou být optimalizovány prostřednictvím metod proteinového inženýrství. Mezi účinné přístupy patří např. design fúzních proteinových konstruktů za účelem vylepšení stávajících nebo zisku nových vlastností fúzovaných molekul. Univerzálními modulátory fúzních partnerů jsou zejména flexibilní vnitřně neuspořádané proteinové domény, schopné dynamicky reagovat na změny ve svém okolí. Fúzním partnerem CaM byla zvolena proteinová doména tvořící C-konec ameloblastinu (AMBN-Ct). Vzhledem ke kompletně vnitřně

neuspořádanému charakteru AMBN-Ct předpokládáme vznik mezi-doménové komunikace mezi fúzovanými molekulami CaM a AMBN-Ct, která může pozitivně ovlivnit např. teplotní stabilitu struktury CaM.

Cílem práce je:

- Design a příprava fúzní molekuly založené na CaM a kompletně vnitřně neuspořádané doméně AMBN-Ct
- Potvrzení nativní struktury CaM v molekule CaM/AMBN-Ct
- Ověření zachovaných vazebných funkcí CaM v CaM/AMBN-Ct prostřednictvím interakce s dříve popsáním vazebným epitopem pro CaM odvozeným z iontového kanálu podrodiny TRPM
- Studium vlivu mezi-doménové komunikace na teplotní stabilitu CaM v CaM/AMBN-Ct

3. Materiál a metody

3.1. Purifikace proteinů

3.1.1. Nativní purifikace CaM a CaM/AMBN-Ct

CaM ve vektoru pET3a byl exprimován a purifikován dle standardního protokolu (Bousova et al., 2018) a převeden do finálního pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (studium komplexů CaM s vazebnými epitopy odvozenými od TRPM) nebo 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, ± 10 mM CaCl₂ (studium fúzního konstruktů CaM/AMBN-Ct). CaM/AMBN-Ct byl exprimován v buňkách *E. coli* Bl-21 z vektoru pET28b při 15 °C/18 hod. Následně byly buňky resuspendovány v lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM 2-Merkapto-EtOH, 2 mM EDTA) a po jejich sonikaci byl CaM/AMBN-Ct purifikován prostřednictvím hydrofobní chromatografie dle totožného protokolu jako molekula CaM. CaM/AMBN-Ct byl dialyzován do 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl a proteázou TEV odštěpena sekvence 6xHis při 4 °C/24 hod. Po přidavku EDTA do koncentrace 10 mM byl CaM/AMBN-Ct převeden do finálního pufru (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, ± 10 mM CaCl₂) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

3.1.2. Denaturační purifikace AMBN-Ct

Podmínky pro expresi AMBN-Ct byly totožné jako u CaM/AMBN-Ct. Po resuspendaci buněk v lyzačním pufru (50 mM Na₂HPO₄ pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM 2-Merkapto-EtOH) a jejich sonikaci byla k solubilní frakci přidána močovina do koncentrace 8M. AMBN-Ct byl nanesen na Chelating Sepharose Fast Flow s navázanými ionty Ni²⁺ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) a vyvázan elučním pufrům (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 600 mM NaCl, 8 M močovina, 600 mM imidazol). Po převedení do 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl byla sekvence 6xHis odštěpena

proteázou TEV při 4 °C/24 hod. a štěpná směs nanese na Chelating Sepharose Fast Flow s vázanými ionty Ni²⁺ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Slabě navázaný AMBN-Ct byl eluován pomocí 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 100 mM imidazol a po přidavku EDTA do koncentrace 10 mM byl AMBN-Ct převeden do finálního pufru (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, ± 10 mM CaCl₂) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

3.2. Fluorescenční spektroskopie

Vazebné epitopy pro CaM označené fluoresceinem byly titrovány přidavky studovaných proteinů. Fluorescence byla excitována při 490 nm a hodnoty časově ustálené anizotropie fluorescence (*r*) zaznamenány při 530 nm. Měření probíhalo na spektrofluorimetru K2 (ISS Inc., Champaign, IL, USA) při teplotě 25 °C. Podíl vazebných epitopů v interakci (fraction bound, *F_B*) byl stanoven dle rovnice (1):

$$F_B = (r - r_{\min}) / [(r_{\max} - r) Q + (r - r_{\min})],$$

kde *r* je jednotlivá hodnota anizotropie, *r_{min}* anizotropie samotného vazebného epitopu, *r_{max}* anizotropie při saturační koncentraci ligandu a *Q* je korekční faktor (poměr kvantového výtěžku vázané/volné formy značeného vazebného epitopu). Hodnota rovnovážné disociační konstanty komplexu (*K_D*) byla získána z proložení závislosti *F_B* na koncentraci ligandu rovnicí (2):

$$F_B = \frac{K_D + [P1] + [P2] - \sqrt{(K_D + [P1] + [P2])^2 - 4[P1][P2]}}{2[P1]},$$

kde [P1] označuje koncentraci vazebného epitopu a [P2] koncentraci ligandu. Experimentální data byla vyhodnocena v softwaru Sigmaplot 11.0 (Systat software, San Jose, CA, USA).

3.3. Analytická ultracentrifugace

Sedimentační rychlost molekul byla měřena na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) s využitím rotoru An50-Ti. Experimenty byly provedeny při 48 000 rpm/20 °C s proteiny o koncentracích: 2,8 mg.ml⁻¹ (CaM), 1,1 mg.ml⁻¹ (AMBN-Ct) a 1,3 mg.ml⁻¹ (CaM/AMBN-Ct). Absorbance vzorků byla detekována při 280 nm v intervalu 3-6 minut. Pro vyhodnocení dat byly použity softwary Sednterp a Sedfit (Philo, 2023, Schuck, 2000).

3.4. Spektroskopie cirkulárního dichroismu

Spektra cirkulárního dichroismu (CD) byla měřena s využitím spektropolarimetru Jasco-1500 a Peltierova termostatu PTC-517 (JASCO, Easton, MD, USA). Spektra CD v blízké UV oblasti (240–350 nm) byla u molekul CaM (160 μM), CaM/AMBN-Ct (65 μM) a AMBN-Ct (47 μM) měřena v 1 mm křemenné kyvetě v teplotním gradientu 10-90 °C s přírůstkem 10 °C. Pro měření ve vzdálené UV oblasti (195–280 nm) byla použita 0,5 mm křemenná kyveta, teplotní přírůstek 5 °C a koncentrace proteinů 10x nižší než v případě experimentů v blízké UV oblasti. Finální data byla vyhodnocena v softwaru Sigmaplot 12.5 (Systat software, San Jose, CA, USA) a vyjádřena v jednotkách molární elipticity (θ).

3.5. Molekulové modelování a molekulová dynamika

Pro molekulové modelování byla použita struktura CaM bez Ca²⁺ (PDBID: 1CFD) i CaM v interakci s ionty Ca²⁺ (PDBID: 1PRW) (Kuboniwa et al., 1995, Fallon and Quioco, 2003). N-koncová (A5-T79) i C-koncová (S81-K148) doména CaM byly stabilizovány potenciálem omezujícím vzdálenost extrahovaným z experimentálních modelů. Vzdálenosti všech vazeb v rozmezí 1-2 nm byly limitovány harmonickým potenciálem se silovou konstantou 240 kJ·mol⁻¹·nm⁻². Jednotlivé domény CaM byly

kalkulovány nezávisle a jejich vzájemná orientace tak zůstala neomezená. K molekule CaM byly připojeny extendované konformace flexibilního linkeru (GGGGSS) a C-koncové domény AMBN (L223-P447, číslované podle sekvence AMBN). Minimalizace energií byla provedena v softwaru GROMACS (Abraham et al., 2015).

Dynamické chování molekul bylo simulováno v GROMACS (Abraham et al., 2015) s použitím stochastického dynamického integrátoru s časovým krokem 20 fs a inverzní konstantou tření 20 ps při 300 K. Molekulární dynamika byla propagována na 100 milionů kroků a kalkulovala v 5 nezávislých simulacích.

4. Výsledky

4.1. Identifikace a charakterizace vazebných míst pro CaM u podrodiny iontových kanálů TRPM

4.1.1. Identifikace vazebných míst pro CaM

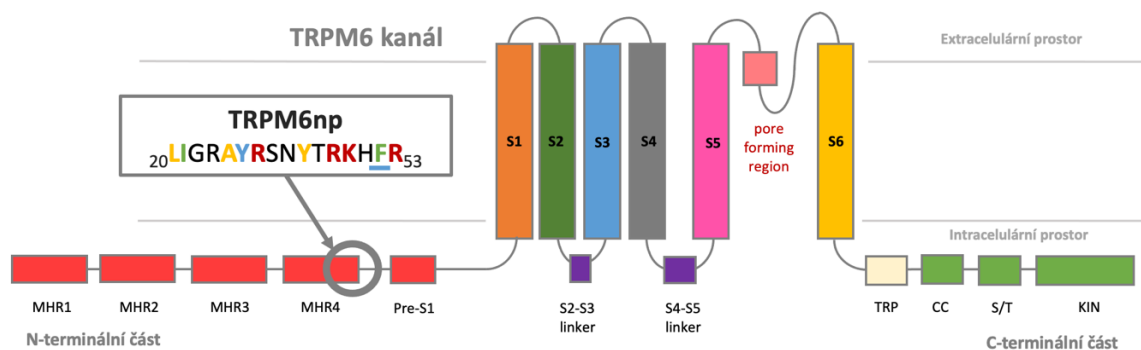
Vazebné motivy pro CaM byly predikovány *in silico* s využitím softwaru „Calmodulin target database“ (Yap et al., 2000). Pro další studium byly vybrány sekvence s typickými motivy hydrofobních a bazických aminokyselin odvozené z lidských iontových kanálů TRPM4 (F₆₂₇-L₆₄₈: TRPM4np, P₁₀₇₈-S₁₀₉₈: TRPM4cp), TRPM5 (W₈₃-K₉₄: TRPM5np), TRPM6 (L₅₂₀-R₅₃₅:TRPM6np) a TRPM7 (T₅₂₃-L₅₃₅: TRPM7np). Uvedené sekvence byly syntetizovány jako fluorescenčně značené peptidy a titrovány přídatky CaM. Detailní data z identifikace vazebných epitopů jsou ukázána na příkladu iontového kanálu TRPM6 (**Obr. 1 A, B**). Ze změn anizotropie při ustálené fluorescenci byly následně stanoveny hodnoty K_D jednotlivých komplexů (TRPM4np/CaM: $1,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$, TRPM4cp/CaM: $2,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$, TRPM5np/CaM: $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$, TRPM6np/CaM: $14,87 \pm 0,7 \mu\text{M}$ a TRPM7np/CaM: $6,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$).

4.1.2. Role bazických aminokyselin při formování komplexů CaM/TRPM

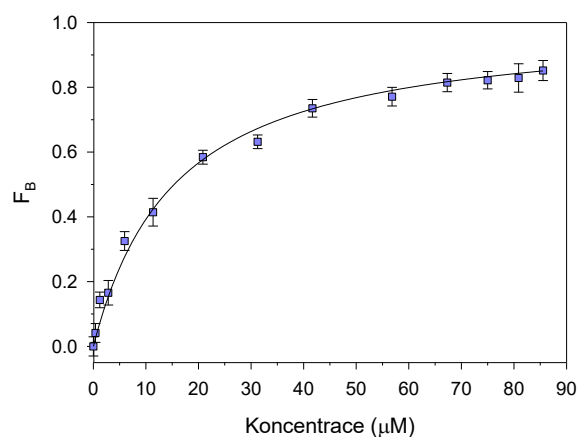
Formace komplexů CaM/TRP probíhá na základě vzájemných hydrofobních interakcí a vzniku solných můstků mezi bazickými zbytky vazebných epitopů pro CaM a negativně nabitými aminokyselinami CaM. Studované vazebné epitopy byly syntetizovány v mutované formě s postupnou záměnou bazických reziduí za alanin. Měření anizotropie při ustálené fluorescenci potvrdilo výrazný pokles vazebné afinity mezi CaM a mutovanými epitopy odvozenými z TRPM4, TRPM5 i TRPM6. Závislost podílu mutovaných vazebných epitopů v interakci (fraction bound, F_B) na koncentraci CaM je zobrazena na příkladu TRPM6np (**Obr. 1 C**). Vazebné studie s mutovanými

formami TRPM6np odhalily postupný pokles K_D komplexu s CaM z $14,87 \pm 0,7 \mu\text{M}$ na $179,04 \pm 9,44 \mu\text{M}$.

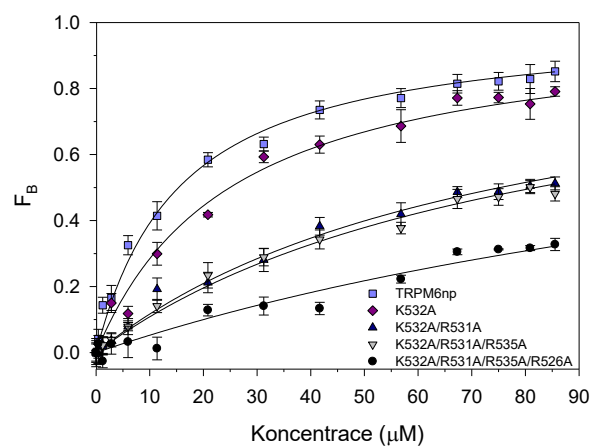
A



B



C



Obrázek 1: Charakterizace vazebného epitopu TRPM6np. **(A)** Lokalizace TRPM6np na iontové kanálu TRPM6. Intracelulární N-konec TRPM6 obsahuje 4 melastatinové homologní oblasti (MHR 1-4) a pre-S1 doménu. Transmembránovou část tvoří 6 α -helikálních segmentů (S1-S6), přičemž pór iontového kanálu je formován mezi S5 a S6. Součástí C-konce TRPM6 je TRP doména, doména typu coiled-coil, doména bohatá na serin/threonina a α -kinázová doména. Lokalizace TRPM6np je vyznačena kružnicí v N-terminální části proteinu. **(B)** Podíl molekul vazebného epitopu TRPM6np v interakci s CaM. **(C)** Podíl mutovaných forem TRPM6np vázajících CaM.

4.1.3. Lokalizace vazebných epitopů na kanálech TRPM a molekulové dokování

Konstrukce homologního modelu iontového kanálu TRPM a dokování odvozeného vazebného epitopu do molekuly CaM je ukázáno na příkladu TRPM6. Příprava homologního modelu TRPM6 podle známé struktury příbuzného iontového kanálu TRPM7 (PDB: 5ZX5) probíhala v softwaru SWISS-MODEL (Duan et al., 2018). Studovaný vazebný epitop TRPM6np byl lokalizován v cytoplazmatické části získané struktury iontového kanálu, kde byl dobře dostupný pro interakce s CaM. Následně byla struktura TRPM6np dokována do molekuly CaM v softwaru ClusPro2.0 (Kozakov et al., 2017). *In silico* analýza vazebného rozhraní získaného komplexu ukázala vhodnou orientaci vytipovaných bazických aminokyselin pro interakci s CaM. Analogickým způsobem bylo studování vazebné rozhraní komplexu CaM s TRPM4np, TRPM4cp, TRPM5np i TRPM7np a podpořena role bazických aminokyselin při interakci s CaM.

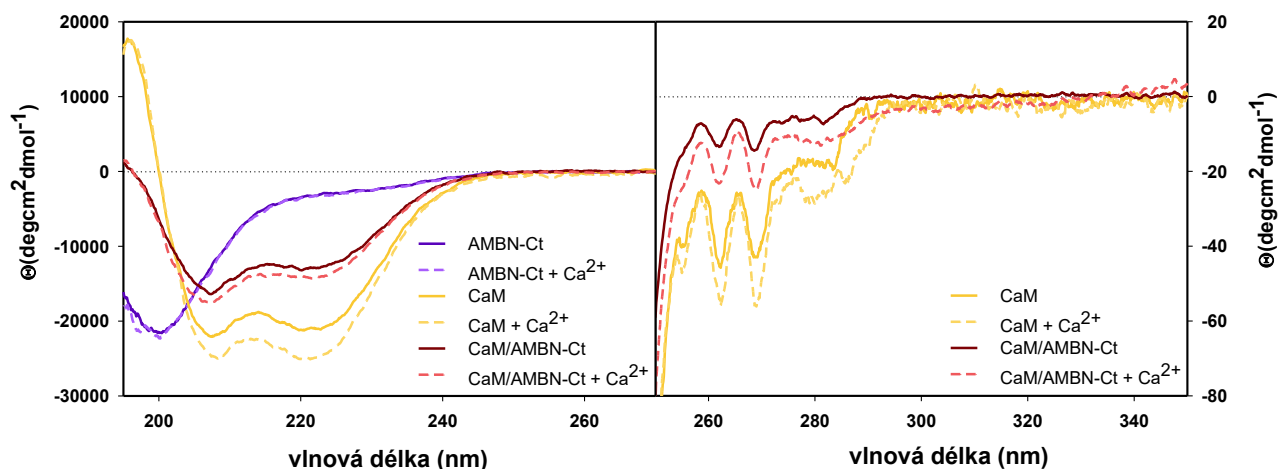
4.2. Modulace vlastností CaM ve fúzních konstruktech

4.2.1. Design a strukturní charakteristiky fúzní molekuly

CaM byl fúzován prostřednictvím flexibilního linkeru GGGGSS s původně nezávislou vnitřně neuspořádanou proteinovou doménou AMBN-Ct. Získaný proteinový konstrukt byl označen jako CaM/AMBN-Ct. Sedimentační experimenty zachytily v případě CaM i CaM/AMBN-Ct nárůst sedimentačního koeficientu v přítomnosti iontů Ca^{2+} . Pozorovaný trend byl výraznější u CaM/AMBN-Ct a zahrnoval i konformační změny domény AMBN-Ct, která sama o sobě na přítomnost Ca^{2+} nereagovala.

Obsah sekundárních struktur proteinů byl studován spektroskopií cirkulárního dichroismu (CD) ve vzdálené UV oblasti. Průběh spektra CD u AMBN-Ct odpovídal

vnitřně neuspořádanému (tzv. IDP) charakteru proteinové domény, zatímco v případě CaM vysoce α -helikálnímu proteinu (dva podobně intenzivní negativní píky při 208 a 222 nm) (**Obr. 2**). U CaM/AMBN-Ct reflektoval průběh spektra CD s minimy při 208 a 222 nm a výrazně vyšší spektrální intenzitou při 208 nm kombinaci α -helikálních (CaM) a IDP (AMBN-Ct) oblastí. V případě CaM i CaM/AMBN-Ct došlo v prostředí s ionty Ca^{2+} k navýšení spektrální intenzity negativních píků. Z experimentálních spekter CaM a AMBN-Ct byla kalkulována modelová spektra pro nezávislé chování CaM a AMBN-Ct v rámci CaM/AMBN-Ct. Modelové spektrum CaM/AMBN-Ct vykazovalo oproti experimentálnímu spektru mírný posun prvního negativního píku (z 208 na 203 nm) a odlišný poměr intenzit obou minim. Tyto změny indikují mírné navýšení helicity v konstruktu CaM/AMBN-Ct a vzájemné interakce mezi CaM a AMBN-Ct, které však zásadně nemění základní strukturní vlastnosti fúzovaných molekul.



Obrázek 2: Spektra CD studovaných molekul ve vzdálené (vlevo) a blízké (vpravo) spektrální oblasti.

Terciální struktura CaM a CaM/AMBN-Ct byla studována spektroskopií CD v blízké UV oblasti. V spektru CD molekul CaM a CaM/AMBN-Ct byly pozorovány negativní pásy v totožných oblastech (**Obr. 2**). Přítomnost iontů Ca^{2+} indukovala nárůst spektrální intenzity těchto pásů, který je typicky daný vazbou Ca^{2+} k molekule CaM.

4.2.2. Vazebné funkce CaM/AMBN-Ct

Zachování vazebné funkce CaM v rámci CaM/AMBN-Ct bylo ověřeno prostřednictvím interakce s dříve popsáním vazebným epitopem iontového kanálu TRPM4 (Bousova et al., 2018). Fluorescenčně značený vazebný epitop odvozený z TRPM4 byl titrován studovanými proteiny (CaM/AMBN-Ct, CaM – pozitivní kontrola a AMBN-Ct – negativní kontrola) a ze změn anizotropie při ustálené fluorescenci byly stanoveny hodnoty K_D komplexu s CaM ($0,25 \pm 0,05 \mu\text{M}$), a CaM/AMBN-Ct ($1,10 \pm 0,10 \mu\text{M}$).

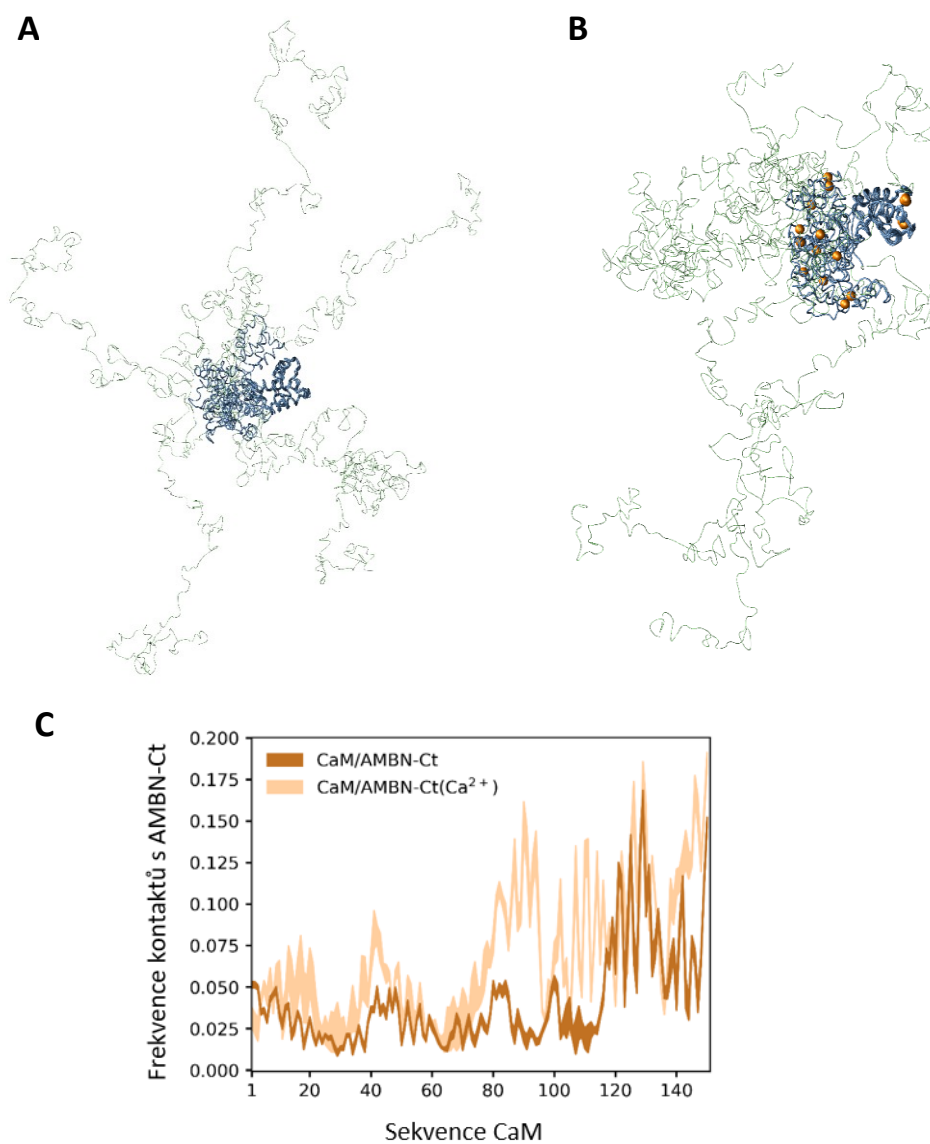
4.2.3. Teplotní stabilita CaM/AMBN-Ct

Teplotní stabilita CaM a CaM v rámci CaM/AMBN-Ct byla studována spektroskopií CD prostřednictvím sledování teplotně závislého snížení spektrální intenzity při 222 nm. Pro vyhodnocení dat byl aplikován model dvoustavového přechodu. Získaná hodnota teploty tání byla $52,0 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ v případě CaM a $56,7 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ u CaM/AMBN-Ct. Teplotní stabilita CaM i CaM/AMBN-Ct byla výrazně navýšena v prostředí s ionty Ca^{2+} a hodnotu T_m zde nebylo možné stanovit.

4.2.4. Simulace dynamického chování fúzní molekuly

Prostřednictvím metod molekulové dynamiky bylo simulováno chování CaM/AMBN-Ct v prostředí bez iontů Ca^{2+} a v přítomnosti Ca^{2+} . Výsledky molekulární dynamiky korelují s výstupy sedimentačních analýz i výsledky spektroskopie CD studovaných molekul a potvrzují zachování vysoce flexibilních IDP charakteristik domény AMBN-Ct v rámci CaM/AMBN-Ct (**Obr. 3 A, B**). Frekvence kontaktů mezi

CaM a fúzovanou doménou AMBN-Ct se v prostředí bez a s ionty Ca^{2+} lišila, přičemž doména AMBN-Ct vykazovala v přítomnosti iontů Ca^{2+} vyšší afinitu k CaM (**Obr. 3 C**). Tento trend je dán vystavením hydrofobních zbytků na povrch CaM/ Ca^{2+} a následnými transientními interakcemi s hydrofobními zbytky domény AMBN-Ct.



Obrázek 3: Molekulární dynamika struktur (A) CaM/AMBN-Ct bez Ca^{2+} a (B) CaM/AMBN-Ct s Ca^{2+} (oranžově). Zobrazeno je vždy 5 molekul superponovaných na N-koncovou doménu CaM. (C) Frekvence kontaktů mezi CaM a fúzovanou doménou AMBN-Ct.

5. Diskuze

Molekula CaM působí jako intracelulární kalciový senzor regulující stovky cílových proteinů včetně zástupců podrodiny iontových kanálů TRPM. V rámci podrodiny TRPM funguje CaM pravděpodobně jako univerzální regulační molekula (Hasan and Zhang, 2018). Na strukturní úrovni byla u rodiny TRP kanálů popsána CaM-dependentní inhibice TRPV6 (Singh et al., 2018). Jedná se o komplexní proces, kdy vazbu CaM zajišťuje 6 oblastí TRPV6. V rámci podrodiny TRPM poukazuje přítomnost více vazebných epitopů pro CaM u TRPM2, TRPM3 a TRPM4 na podobnou komplexitu interakce (Gattkowski et al., 2019, Tong et al., 2006, Bousova et al., 2018, Bousova et al., 2020, Holakovska et al., 2012, Holendova et al., 2012, Przibilla et al., 2018). Pro detailní porozumění CaM-dependentní regulaci podrodiny TRPM je třeba identifikovat jednotlivé vazebné epitopy pro CaM a ověřit jejich fyziologický význam.

V rámci podskupiny TRPM6/TRPM7 byly charakterizovány 2 nové vysoce homologní vazebné epitopy pro CaM odvozené z cytoplazmatického N-konce iontového kanálu TRPM6 a TRPM7. TRPM6np i TRPM7np obsahují charakteristický motiv hydrofobních aminokyselin s vmezeřenými bazickými rezidui (Rhoads and Friedberg, 1997). Typické hodnoty K_D se v případě komplexů CaM/TRP pohybují v řádu jednotek mikromolů (Grycova et al., 2015, Bousova et al., 2018, Holakovska et al., 2012). V případě komplexu TRPM6np/CaM dosahovala stanovená K_D hodnoty 14,87 μM a odpovídala slabší vazebné afinitě v porovnání s popsány komplexu CaM/TRP. Hodnota K_D komplexu CaM/TRPM7np se naopak pohybovala v typickém řádu jednotek μM . Obecně vysoká vazebná afinita mezi CaM a vazebnými epitopy TRP kanálů je dána synergickým efektem jednotlivých interagujících aminokyselin. Nižší hodnota K_D komplexu CaM/TRPM7np tak může být dána přítomností další bazické aminokyseliny R532, která se u vazebného epitopu TRPM6np navzdory vysoké

sekvenční homologii s TRPM7np nevyskytuje. TRPM6np a TRPM7np představují první identifikované vazebné epitopy pro CaM u TRPM6 a TRPM7 a pokládají základy pro studium CaM-dependentní regulace podskupiny TRPM6/TRPM7.

Komplexy CaM/TRP jsou formovány na základě vzájemného kontaktu hydrofobních aminokyselinových zbytků vazebných epitopů a hydrofobních reziduí CaM, které jsou vystaveny na povrch molekuly v průběhu aktivace ionty Ca^{2+} (Bousova et al., 2018). V dalším kroku nastává formace solných můstků mezi bazickými rezidui vazebného motivu pro CaM a negativně nabitými aminokyselinovými zbytky CaM. Vazebné studie s mutovanými formami TRPM6np potvrdily klíčovou roli bazických aminokyselin TRPM6np při formaci komplexu CaM/TRPM6np. Zatímco substituce K532A vedla k mírnému poklesu vazebné afinity, další mutace R531A způsobila výrazný pokles hodnoty K_D a potvrdila funkční význam tandemu bazických zbytků. Nepatrný pokles vazebné afinity byl výsledkem následné mutace R535A. K dalšímu výraznému poklesu vazebné afinity vedla substituce R526A. Molekulární dokování TRPM6np do struktury CaM vizualizovalo vazebné rozhraní CaM/TRPM6np a podpořilo zapojení bazických zbytků TRPM6np do tvorby komplexu. Vzhledem k vysoké sekvenční homologii mezi TRPM6np a TRPM7np lze u TRPM7np/CaM předpokládat podobné vazebné rozhraní jako v případě TRPM6np/CaM.

Analogickým způsobem byly charakterizovány 3 nové vazebné epitopy pro CaM v rámci podskupiny TRPM4/TRPM5. Hodnoty K_D studovaných komplexů TRPM4np, TRPM4cp i TRPM5np s CaM se pohybovaly v typickém rozmezí pro interakce CaM/TRP. V případě TRPM4 byla dříve prokázána pozitivní CaM-dependentní regulace podmíněná pravděpodobně interakcí CaM/ Ca^{2+} s cytoplazmatickým C-koncem TRPM4 (Nilius et al., 2005). Přítomnost několika vazebných míst pro CaM na N- i C-konci TRPM4 poukazuje na podobnou komplexitu interakce jako v případě TRPV6/CaM (Singh et al., 2018). U TRPM5 dosud nebyla prokázána regulace

prostřednictvím CaM a TRPM5np představuje první identifikovaný vazebný epitop pro CaM na iontovém kanálu TRPM5.

U molekuly CaM byla následně studována možnost modulace vlastností prostřednictvím fúze s IDP doménou AMBN-Ct. Enormní flexibilita a konformační dynamika umožňuje IDP doménám dynamicky reagovat na změny v prostředí a činí z nich vhodné kandidáty pro modulátory svých fúzních partnerů (Grzybowska, 2018).

Spektroskopie CD ve vzdálené UV oblasti potvrdila u molekuly CaM/AMBN-Ct přítomnost α -helikálních i IDP oblastí. Získané experimentální spektrum CD konstruktů CaM/AMBN-Ct vykazuje oproti modelovému spektru pro nezávislé chování fúzních partnerů nárůst helicity, který je daný pravděpodobně změnami v doméně AMBN-Ct v důsledku mezi-doménové komunikace s molekulou CaM. Zachování α -helikálního charakteru společně s absencí nově vznikajících β -struktur poukazuje na udržení nativní sekundární struktury CaM v rámci CaM/AMBN-Ct. Porovnání průběhu spekter CD molekul CaM/AMBN-Ct a CaM v blízké UV oblasti indikuje zachování terciální struktury CaM v konstruktu CaM/AMBN-Ct. Po přidavku iontů Ca^{2+} byly navíc ve vzdálené i blízké UV detekovány strukturní změny molekuly CaM/AMBN-Ct typické pro interakci CaM s Ca^{2+} (Martin and Bayley, 1986). CaM v rámci CaM/AMBN-Ct má tedy zachovanou nativní strukturu a pravděpodobně i schopnost interakce s ionty Ca^{2+} .

Zachování vazebných vlastností CaM v konstruktu CaM/AMBN bylo ověřeno prostřednictvím interakce s vazebným epitopem pro CaM odvozeným z iontového kanálu TRPM4 (Bousova et al., 2018). V případě CaM i CaM/AMBN-Ct docházelo k Ca^{2+} -dependentní vazbě uvedeného vazebného epitopu. Ačkoli byla hodnota K_D jeho komplexu s CaM/AMBN-Ct asi 4x vyšší, stále se pohybovala v typických hodnotách pro vysokoafinitní interakci CaM s vazebným epitopem odvozeným z iontového

kanálu TRP. Zvýšení hodnoty K_D je dáno mezi-doménovou komunikací mezi CaM a AMBN-Ct, kterou indikoval průběh spektra CD ve vzdálené UV oblasti i simulace molekulové dynamiky. Efekt mezi-doménové komunikace v rámci CaM/AMBN-Ct podporují také výsledky sedimentačních analýz. V případě CaM i CaM/AMBN-Ct ukázaly zvýšení kompaktnosti molekul v prostředí s ionty Ca^{2+} . Konformační změny byly přitom nejvýraznější u molekuly CaM/AMBN-Ct a zahrnovaly také podjednotku AMBN-Ct, která sama o sobě na přítomnost iontů Ca^{2+} nereagovala. Ca^{2+} -dependentní změny konformace podjednotky CaM tedy vedou ke změnám ve vzájemné komunikaci fúzovaných molekul, které se projeví kompaktnější molekulou CaM/AMBN-Ct.

Ačkoli podjednotky CaM a AMBN-Ct nefungují v rámci CaM/AMBN-Ct zcela nezávisle, zůstávají základní strukturní i vazebné charakteristiky CaM v molekule CaM/AMBN-Ct zachovány. Vzhledem k vzájemné komunikaci fúzních podjednotek mohlo u konstruktu CaM/AMBN-Ct dojít ke změně teplotní stability CaM. Rozvolnění struktury CaM v rámci CaM/AMBN-Ct bylo sledováno prostřednictvím spektroskopie CD. Získaná hodnota T_m byla v případě CaM/AMBN-Ct asi o 5 °C vyšší v porovnání se samotnou molekulou CaM. Teplotní denaturace CaM je komplexní proces spojený se vznikem přechodových mezi-stavů (Protasevich et al., 1997). Z porovnání křivek tání CaM a CaM/AMBN-Ct je zřejmé snížení sklonu křivky v oblasti nižších teplot v důsledku fúze CaM s doménou AMBN-Ct. U molekuly CaM/AMBN-Ct tedy dochází k potlačení vzniku raných přechodových mezi-stavů CaM. Prostředí s ionty Ca^{2+} indukuje enormní teplotní stabilizaci CaM i CaM/AMBN-Ct, která je typická pro komplexy CaM/ Ca^{2+} (Minnes et al., 2017). Ačkoli výrazná teplotní stabilizace neumožnila odečet konkrétních hodnot T_m obou molekul, z průběhu křivek tání je patrná vyšší teplotní stabilita opět v případě CaM/AMBN-Ct. Fúzí CaM s IDP doménou AMBN-Ct jsme získali novou molekulu CaM/AMBN-Ct se zachovanými nativními vlastnostmi a vylepšenou teplotní stabilitou podjednotky CaM.

6. Závěr

Náplní disertační práce bylo studium molekuly CaM s ohledem na potenciální zapojení do regulace medicínsky atraktivní podrodiny iontových kanálů TRPM. Nové vazebné epitopy pro CaM byly odvozeny z iontových kanálů TRPM4, TRPM5, TRPM6 a TRPM7. Vazebné studie potvrdily interakci mezi studovanými vazebnými epitopy a molekulou CaM, přičemž vazebná afinita komplexů se pohybovala v hodnotách typických pro interakce CaM/TRP. Identifikované vazebné epitopy pro CaM byly syntetizovány v mutovaných formách s postupnou záměnou bazických reziduí zapojených do typické interakce CaM/TRP. Výsledný pokles vazebné afinity až úplné narušení tvorby komplexů poukazují na specifitu interakcí mezi identifikovanými vazebnými epitopy a molekulou CaM. Publikované struktury iontových kanálů nebo jejich homologní modely ukázaly dobrou přístupnost studovaných vazebných epitopů pro molekulu CaM. Následné molekulové dokování těchto epitopů do struktury CaM dále potvrzuje vazebné rozhraní typické pro interakce CaM/TRP.

Cílem druhé části disertační práce byla optimalizace vlastností CaM metodami proteinového inženýrství. Fúzí CaM a IDP domény AMBN-Ct byla získána nová molekula CaM/AMBN-Ct. Spektroskopie CD ukázala zachování sekundárních i terciálních strukturních charakteristik CaM v rámci CaM/AMBN-Ct. Navýšení helicity i teplotní stability CaM/AMBN-Ct v prostředí s ionty Ca^{2+} indikuje strukturní změny typické pro interakce CaM s Ca^{2+} . Vazebné studie prokázaly zachování vazebných vlastností CaM (Ca^{2+} -dependentní aktivace a interakce s cílovým vazebným epitopem) v molekule CaM/AMBN-Ct. Studium teplotní denaturace ukázalo potlačení tvorby raných přechodových mezi-stavů CaM v rámci CaM/AMBN-Ct a navýšení celkové hodnoty T_m proteinu. Spektroskopie CD i sedimentační analýzy studovaných molekul indikují mezi-doménovou komunikaci mezi CaM a AMBN-Ct v konstruktu

CaM/AMBN-Ct. Ačkoli základní strukturní i funkční charakteristiky jednotlivých fúzních partnerů zůstaly zachovány, dochází k ustavení vzájemné komunikace mezi CaM a AMBN-Ct. Efekt mezi-doménové komunikace pak přináší navýšení teplotní stability CaM v rámci nové molekuly CaM/AMBN-Ct.

Výstup řešení disertační práce představují jednak nové vazebné epitopy pro CaM odvozené z iontových kanálů podrodiny TRPM a dále design inovativní fúzní molekuly CaM/AMBN-Ct. Identifikované vazebné epitopy mohou být zapojené do CaM-dependentní regulace iontových kanálů TRPM4, TRPM5, TRPM6 a TRPM7. Detailní objasnění regulace těchto kanálů představuje prerekvizitu pro vývoj moderních terapeutik širokého spektra civilizačních onemocnění. Molekula CaM navíc tvoří základ řady biotechnologicky / biomedicínsky významných fúzních molekul. Optimalizace teplotní stability CaM usnadňuje využití těchto molekul v suboptimálních podmínkách. Poznatky získané při studiu CaM/AMBN-Ct mohou nacházet uplatnění při designu teplotně stabilnějších proteinových konstruktů. Samotný konstrukt CaM/AMBN-Ct má navíc potenciál tvořit základ dalších inovativních molekul.

7. Souhrn

CaM monitoruje cytoplazmatickou hladinu iontů Ca^{2+} a zapojuje se do regulace stovek cílových proteinů včetně zástupců podrodiny iontových kanálů TRPM. Ačkoli dysregulace TRPM souvisí s rozvojem závažných kardiovaskulárních, metabolických či nádorových onemocnění, zůstávají informace ohledně CaM-dependentní regulace TRPM stále velmi limitované.

Cílem disertační práce bylo rozšíření spektra vazebných epitopů pro CaM u podrodiny TRPM. Celkem bylo popsáno pět nových vazebných epitopů pro CaM (dva odvozené z iontového kanálu TRPM4 a tři z TRPM5, TRPM6 a TRPM7). Studium vazebného rozhraní komplexů odhalilo charakteristiky typické pro interakce CaM s TRP kanály. V případě TRPM4 nové vazebné epitopy rozšiřují spektrum dříve popsaných epitopů, které se mohou spolupodílet na CaM-dependentní regulaci TRPM4. U TRPM5, TRPM6 a TRPM7 se jedná první popsané vazebné epitopy pro CaM, které mohou být základem dalšího studia jejich regulace prostřednictvím CaM.

Unikátní vlastnosti CaM, zejména konformační plasticita a strukturní změny v prostředí s ionty Ca^{2+} , jsou využívány při designu biotechnologicky / biomedicínsky významných molekul. Optimalizace stability CaM pro využití v suboptimálních podmínkách tak představuje atraktivní cíl proteinového inženýrství. Prostřednictvím fúze CaM s IDP doménou AMBN-Ct byla získána nová molekula CaM/AMBN-Ct. CaM má v rámci konstruktů CaM/AMBN-Ct zachovanou nativní strukturu i základní vazebné vlastnosti, tj. schopnost interakce s ionty Ca^{2+} nebo vazebným epitopem odvozeným z iontového kanálu rodiny TRP. Výsledkem vzájemné komunikace mezi CaM a AMBN-Ct je navýšení teplotní stability CaM. Fúzní konstrukt CaM/AMBN-Ct tak může sloužit jako základ nových stabilnějších molekul, využívajících charakteristické strukturně-funkčních vlastnosti CaM.

8. Summary

CaM monitors cytoplasmic Ca^{2+} levels and is engaged in the regulation of hundreds of target proteins including those of the TRPM ion channel subfamily. Although TRPM dysregulation is associated with the development of serious cardiovascular, metabolic and cancerous diseases, information on CaM-dependent TRPM regulation still remains very limited.

The aim of the thesis was to expand the spectrum of binding epitopes for CaM in TRPM members. In total, 5 new CaM-binding epitopes were described (2 are derived from TRPM4 and the other 3 are derived from TRPM5, TRPM6, and TRPM7). Study of the binding interface of the complexes revealed characteristics typical for CaM interactions with TRP channels. As for TRPM4, the new binding epitopes expand the spectrum of previously described epitopes that may be involved in CaM-dependent regulation of TRPM4. As for TRPM5, TRPM6, and TRPM7, the CaM-binding epitopes are the first ones described and can become the basis for further study of TRPM5, TRPM6 and TRPM7 regulation by CaM.

The unique properties of CaM, particularly its conformational plasticity and structural changes in the presence of Ca^{2+} ions, are used in the design of molecules of biotechnological / biomedical importance. Optimization of CaM stability for its use in suboptimal conditions is thus an attractive goal of protein engineering. A new molecule, CaM/AMBN-Ct, was obtained by fusing CaM with the IDP domain AMBN-Ct. The native structure and essential binding properties of CaM, i.e. its ability to interact with Ca^{2+} ions or the binding epitope derived from the TRP member, are preserved in CaM/AMBN-Ct. Communication between CaM and AMBN-Ct enhances thermal stability of CaM. CaM/AMBN-Ct can thus be used to develop novel, more stable molecules that employ the characteristic structural and functional properties of CaM.

9. Literatura

- ABRAHAM, M. J., MURTOLA, T., SCHULZ, R., PÁLL, S., SMITH, J. C., HESS, B. & LINDAHL, E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25.
- BAHLER, M. & RHOADS, A. 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett*, 513, 107-13.
- BARBATO, G., IKURA, M., KAY, L. E., PASTOR, R. W. & BAX, A. 1992. Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry*, 31, 5269-78.
- BERCHTOLD, M. W. & VILLALOBO, A. 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 398-435.
- BOUSOVA, K., BARVIK, I., HERMAN, P., HOFBAUEROVA, K., MONINCOVA, L., MAJER, P., ZOUHAROVA, M., VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2020. Mapping of CaM, S100A1 and PIP2-Binding Epitopes in the Intracellular N- and C-Termini of TRPM4. *Int J Mol Sci*, 21.
- BOUSOVA, K., BEDNAROVA, L., ZOUHAROVA, M., VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K., HOFBAUEROVA, K., PETRVALSKA, O., VANEK, O., TRIPSANES, K. & VONDRASEK, J. 2021a. The order of PDZ3 and TrpCage in fusion chimeras determines their properties-a biophysical characterization. *Protein Sci*, 30, 1653-1666.
- BOUSOVA, K., HERMAN, P., VECER, J., BEDNAROVA, L., MONINCOVA, L., MAJER, P., VYKLIČKY, L., VONDRASEK, J. & TEISINGER, J. 2018. Shared CaM- and S100A1-binding epitopes in the distal TRPM4 N terminus. *FEBS J*, 285, 599-613.
- BOUSOVA, K., ZOUHAROVA, M., HERMAN, P., VETYSKOVA, V., JIRASKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2021b. TRPM7 N-terminal region forms complexes with calcium binding proteins CaM and S100A1. *Heliyon*, 7, e08490.
- BOUSOVA, K., ZOUHAROVA, M., HERMAN, P., VYMETAL, J., VETYSKOVA, V., JIRASKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2022. TRPM5 Channel Binds Calcium-Binding Proteins Calmodulin and S100A1. *Biochemistry*, 61, 413-423.
- DIKICI, E., DEO, S. K. & DAUNERT, S. 2003. Drug detection based on the conformational changes of calmodulin and the fluorescence of its enhanced green fluorescent protein fusion partner. *Analytica Chimica Acta*, 500, 237-245.
- DUAN, J., LI, Z., LI, J., HULSE, R. E., SANTA-CRUZ, A., VALINSKY, W. C., ABIRIA, S. A., KRAPIVINSKY, G., ZHANG, J. & CLAPHAM, D. E. 2018.

- Structure of the mammalian TRPM7, a magnesium channel required during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E8201-E8210.
- FALLON, J. L. & QUIOCHO, F. A. 2003. A closed compact structure of native Ca(2+)-calmodulin. *Structure*, 11, 1303-7.
- FECAROTTA, S., GASPERINI, S. & PARENTI, G. 2018. New treatments for the mucopolysaccharidoses: from pathophysiology to therapy. *Ital J Pediatr*, 44, 124.
- GATTKOWSKI, E., JOHNSEN, A., BAUCHE, A., MOCKL, F., KULOW, F., GARCIA ALAI, M., RUTHERFORD, T. J., FLIEGERT, R. & TIDOW, H. 2019. Novel CaM-binding motif in its NudT9H domain contributes to temperature sensitivity of TRPM2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866, 1162-1170.
- GOFFE, B. & CATHER, J. C. 2003. Etanercept: An overview. *J Am Acad Dermatol*, 49, S105-11.
- GRANT, B. M. M., ENOMOTO, M., IKURA, M. & MARSHALL, C. B. 2020. A Non-Canonical Calmodulin Target Motif Comprising a Polybasic Region and Lipidated Terminal Residue Regulates Localization. *Int J Mol Sci*, 21.
- GRYCOVA, L., HOLEDOVA, B., LANSKY, Z., BUMBA, L., JIRKU, M., BOUSOVA, K. & TEISINGER, J. 2015. Ca(2+) binding protein S100A1 competes with calmodulin and PIP2 for binding site on the C-terminus of the TPRV1 receptor. *ACS Chem Neurosci*, 6, 386-92.
- GRZYBOWSKA, E. A. 2018. Calcium-Binding Proteins with Disordered Structure and Their Role in Secretion, Storage, and Cellular Signaling. *Biomolecules*, 8.
- HARTENECK, C. 2005. Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371, 307-14.
- HASAN, R. & ZHANG, X. 2018. Ca(2+) Regulation of TRP Ion Channels. *Int J Mol Sci*, 19.
- HOFMANN, T., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T. & MONTELL, C. 2003. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol*, 13, 1153-8.
- HOLAKOVSKA, B., GRYCOVA, L., JIRKU, M., SULC, M., BUMBA, L. & TEISINGER, J. 2012. Calmodulin and S100A1 protein interact with N terminus of TRPM3 channel. *J Biol Chem*, 287, 16645-55.
- HOLEDOVA, B., GRYCOVA, L., JIRKU, M. & TEISINGER, J. 2012. PtdIns(4,5)P2 interacts with CaM binding domains on TRPM3 N-terminus. *Channels (Austin)*, 6, 479-82.
- HUANG, Y., FLIEGERT, R., GUSE, A. H., LU, W. & DU, J. 2020. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium*, 85, 102111.
- ISHIDA, H., NGUYEN, L. T., GOPAL, R., AIZAWA, T. & VOGEL, H. J. 2016. Overexpression of Antimicrobial, Anticancer, and Transmembrane Peptides in

- Escherichia coli through a Calmodulin-Peptide Fusion System. *J Am Chem Soc*, 138, 11318-26.
- JIMENEZ, I., PRADO, Y., MARCHANT, F., OTERO, C., ELTIT, F., CABELLO-VERRUGIO, C., CERDA, O. & SIMON, F. 2020. TRPM Channels in Human Diseases. *Cells*, 9.
- JOHNSON, C. N., POTET, F., THOMPSON, M. K., KRONCKE, B. M., GLAZER, A. M., VOEHLER, M. W., KNOLLMANN, B. C., GEORGE, A. L., JR. & CHAZIN, W. J. 2018. A Mechanism of Calmodulin Modulation of the Human Cardiac Sodium Channel. *Structure*, 26, 683-694 e3.
- JUNG, H. J., KIM, J. H., SHIM, J. S. & KWON, H. J. 2010. A novel Ca²⁺/calmodulin antagonist HBC inhibits angiogenesis and down-regulates hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 285, 25867-74.
- KOZAKOV, D., HALL, D. R., XIA, B., PORTER, K. A., PADHORNY, D., YUEH, C., BEGLOV, D. & VAJDA, S. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc*, 12, 255-278.
- KUBONIWA, H., TJANDRA, N., GRZESIEK, S., REN, H., KLEE, C. B. & BAX, A. 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Biol*, 2, 768-76.
- LIU, F., CHU, X., LU, H. P. & WANG, J. 2017. Molecular mechanism of multispecific recognition of Calmodulin through conformational changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, E3927-E3934.
- LIU, Q., XUN, G. & FENG, Y. 2019. The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnol Adv*, 37, 530-537.
- MANSUROV, A., LAUTERBACH, A., BUDINA, E., ALPAR, A. T., HUBBELL, J. A. & ISHIHARA, J. 2021. Immunoengineering approaches for cytokine therapy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 321, C369-C383.
- MARTIN, S. R. & BAYLEY, P. M. 1986. The effects of Ca²⁺ and Cd²⁺ on the secondary and tertiary structure of bovine testis calmodulin. A circular-dichroism study. *Biochem J*, 238, 485-90.
- MATHEW, M. & VERMA, R. S. 2009. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci*, 100, 1359-65.
- MINNES, L., SHAW, D. J., COSSINS, B. P., DONALDSON, P. M., GREETHAM, G. M., TOWRIE, M., PARKER, A. W., BAKER, M. J., HENRY, A. J., TAYLOR, R. J. & HUNT, N. T. 2017. Quantifying Secondary Structure Changes in Calmodulin Using 2D-IR Spectroscopy. *Anal Chem*, 89, 10898-10906.
- MISHRA, A. P., CHANDRA, S., TIWARI, R., SRIVASTAVA, A. & TIWARI, G. 2018. Therapeutic Potential of Prodrugs Towards Targeted Drug Delivery. *Open Med Chem J*, 12, 111-123.
- NILIUS, B. 2007. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 805-12.

- NILIUS, B., PRENEN, J., TANG, J., WANG, C., OWSIANIK, G., JANSSENS, A., VOETS, T. & ZHU, M. X. 2005. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, 280, 6423-33.
- O'DAY, D. H. 2020. Calmodulin Binding Proteins and Alzheimer's Disease: Biomarkers, Regulatory Enzymes and Receptors That Are Regulated by Calmodulin. *Int J Mol Sci*, 21.
- OLAH, Z., JOSVAY, K., PECZE, L., LETOHA, T., BABAI, N., BUDAI, D., OTVOS, F., SZALMA, S. & VIZLER, C. 2007. Anti-calmodulins and tricyclic adjuvants in pain therapy block the TRPV1 channel. *PLoS One*, 2, e545.
- PARDRIDGE, W. M. & BOADO, R. J. 2012. Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol*, 503, 269-92.
- PERRAUD, A. L., FLEIG, A., DUNN, C. A., BAGLEY, L. A., LAUNAY, P., SCHMITZ, C., STOKES, A. J., ZHU, Q., BESSMAN, M. J., PENNER, R., KINET, J. P. & SCHARENBERG, A. M. 2001. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411, 595-9.
- PHILO, J. S. 2023. SEDNTERP: a calculation and database utility to aid interpretation of analytical ultracentrifugation and light scattering data. *Eur Biophys J*, 52, 233-266.
- PROTASEVICH, I., RANJBAR, B., LOBACHOV, V., MAKAROV, A., GILLI, R., BRIAND, C., LAFITTE, D. & HAIECH, J. 1997. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry*, 36, 2017-24.
- PRZIBILLA, J., DEMBLA, S., RIZUN, O., LIS, A., JUNG, M., OBERWINKLER, J., BECK, A. & PHILIPP, S. E. 2018. Ca(2+)-dependent regulation and binding of calmodulin to multiple sites of Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *Cell Calcium*, 73, 40-52.
- RHOADS, A. R. & FRIEDBERG, F. 1997. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, 11, 331-40.
- RYAZANOVA, L. V., PAVUR, K. S., PETROV, A. N., DOROVKOV, M. V. & RYAZANOV, A. G. 2001. [Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked to ion channels]. *Mol Biol (Mosk)*, 35, 321-32.
- SAMANTA, A., HUGHES, T. E. T. & MOISEENKOVA-BELL, V. Y. 2018. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem*, 87, 141-165.
- SARRIA, I., LING, J., ZHU, M. X. & GU, J. G. 2011. TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP(2): distinction from tachyphylaxis. *J Neurophysiol*, 106, 3056-66.
- SCHUCK, P. 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, 78, 1606-19.

- SHINDO, A., HARA, Y., YAMAMOTO, T. S., OHKURA, M., NAKAI, J. & UENO, N. 2010. Tissue-tissue interaction-triggered calcium elevation is required for cell polarization during *Xenopus* gastrulation. *PLoS One*, 5, e8897.
- SINGH, A. K., MCGOLDRICK, L. L., TWOMEY, E. C. & SOBOLEVSKY, A. I. 2018. Mechanism of calmodulin inactivation of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *Sci Adv*, 4, eaau6088.
- SISCO, N. J., LUU, D. D., KIM, M. & VAN HORN, W. D. 2020. PIRT the TRP Channel Regulating Protein Binds Calmodulin and Cholesterol-Like Ligands. *Biomolecules*, 10.
- SPIESS, K., JAKOBSEN, M. H., KLEDAL, T. N. & ROSENKILDE, M. M. 2016. The future of antiviral immunotoxins. *J Leukoc Biol*, 99, 911-25.
- TIAN, L., HIRES, S. A., MAO, T., HUBER, D., CHIAPPE, M. E., CHALASANI, S. H., PETREANU, L., AKERBOOM, J., MCKINNEY, S. A., SCHREITER, E. R., BARGMANN, C. I., JAYARAMAN, V., SVOBODA, K. & LOOGER, L. L. 2009. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods*, 6, 875-81.
- TONG, Q., ZHANG, W., CONRAD, K., MOSTOLLER, K., CHEUNG, J. Y., PETERSON, B. Z. & MILLER, B. A. 2006. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca²⁺ sensor calmodulin. *J Biol Chem*, 281, 9076-85.
- UVERSKY, V. N. & DUNKER, A. K. 2010. Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1231-64.
- VANGEEL, L. & VOETS, T. 2019. Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11.
- VETYSKOVA, V., ZOUHAROVA, M., BEDNAROVA, L., VANEK, O., SAZELOVA, P., KASICKA, V., VYMETAL, J., SRP, J., RUMLOVA, M., CHARNAVETS, T., POSTULKOVA, K., RESELAND, J. E., BOUSOVA, K. & VONDRASEK, J. 2020. Characterization of AMBN I and II Isoforms and Study of Their Ca(2+)-Binding Properties. *Int J Mol Sci*, 21.
- WALD, T., OSICKOVA, A., SULC, M., BENADA, O., SEMERADTOVA, A., REZABKOVA, L., VEVERKA, V., BEDNAROVA, L., MALY, J., MACEK, P., SEBO, P., SLABY, I., VONDRASEK, J. & OSICKA, R. 2013. Intrinsically disordered enamel matrix protein ameloblastin forms ribbon-like supramolecular structures via an N-terminal segment encoded by exon 5. *J Biol Chem*, 288, 22333-45.
- WALD, T., SPOUTIL, F., OSICKOVA, A., PROCHAZKOVA, M., BENADA, O., KASPAREK, P., BUMBA, L., KLEIN, O. D., SEDLACEK, R., SEBO, P., PROCHAZKA, J. & OSICKA, R. 2017. Intrinsically disordered proteins drive enamel formation via an evolutionarily conserved self-assembly motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E1641-E1650.

- YAP, K. L., KIM, J., TRUONG, K., SHERMAN, M., YUAN, T. & IKURA, M. 2000. Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics*, 1, 8-14.
- YI, H., SUN, T., ARMSTRONG, D., BORNEMAN, S., YANG, C., AUSTIN, S., KISHNANI, P. S. & SUN, B. 2017. Antibody-mediated enzyme replacement therapy targeting both lysosomal and cytoplasmic glycogen in Pompe disease. *J Mol Med (Berl)*, 95, 513-521.
- ZHU, M. X. 2005. Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch*, 451, 105-15.
- ZOUHAROVA, M., HERMAN, P., HOFBAUEROVA, K., VONDRASEK, J. & BOUSOVA, K. 2019. TRPM6 N-Terminal CaM- and S100A1-Binding Domains. *Int J Mol Sci*, 20.
- ZOUHAROVA, M., VYMETAL, J., BEDNAROVA, L., VANEK, O., HERMAN, P., VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K., LINGSTAADAS, P. S., VONDRASEK, J. & BOUSOVA, K. 2021. Intrinsically disordered protein domain of human ameloblastin in synthetic fusion with calmodulin increases calmodulin stability and modulates its function. *Int J Biol Macromol*, 168, 1-12.

Přehled publikační činnosti

Původní vědecké publikace, která jsou podkladem disertační práce:

ZOUHAROVA, M., VYMETAL, J., BEDNAROVA, L., VANEK, O., HERMAN, P., VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K., LINGSTAADAS, P. S., VONDRASEK, J. & BOUSOVA, K. 2021. Intrinsically disordered protein domain of human ameloblastin in synthetic fusion with calmodulin increases calmodulin stability and modulates its function. *Int J Biol Macromol*, 168, 1-12. **IF₂₀₂₁ 8,025**

ZOUHAROVA, M., HERMAN, P., HOFBAUEROVA, K., VONDRASEK, J. & BOUSOVA, K. 2019. TRPM6 N-Terminal CaM - and S100A1-Binding Domains. *Int J Mol Sci*, 20. **IF₂₀₁₉ 4,556**

BOUSOVA, K., **ZOUHAROVA, M.**, HERMAN, P., VYMETAL, J., VETYSKOVA, V., JIRASKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2022. TRPM5 Channel Binds Calcium-Binding Proteins Calmodulin and S100A1. *Biochemistry*, 61, 413-423. **IF₂₀₂₂ 2,9**

BOUSOVA, K., **ZOUHAROVA, M.**, HERMAN, P., VETYSKOVA, V., JIRASKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2021b. TRPM7 N-terminal region forms complexes with calcium binding proteins CaM and S100A1. *Heliyon*, 7, e08490. **IF₂₀₂₁ 3,776**

BOUSOVA, K., BARVIK, I., HERMAN, P., HOFBAUEROVA, K., MONINCOVA, L., MAJER, P., **ZOUHAROVA, M.**, VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K. & VONDRASEK, J. 2020. Mapping of CaM, S100A1 and PIP2-Binding Epitopes in the Intracellular N- and C-Termini of TRPM4. *Int J Mol Sci*, 21. **IF₂₀₂₀ 5,924**

Původní vědecké publikace které nejsou podkladem k disertační práci:

BOUSOVA, K., BEDNAROVA, L., **ZOUHAROVA, M.**, VETYSKOVA, V., POSTULKOVA, K., HOFBAUEROVA, K., PETRVALSKA, O., VANEK, O., TRIPSANES, K. & VONDRASEK, J. 2021a. The order of PDZ3 and TrpCage in fusion chimeras determines their properties-a biophysical characterization. *Protein Sci*, 30, 1653-1666. **IF₂₀₂₁ 6,993**

VETYSKOVA, V., **ZOUHAROVA, M.**, BEDNAROVA, L., VANEK, O., SAZELOVA, P., KASICKA, V., VYMETAL, J., SRP, J., RUMLOVA, M., CHARNAVETS, T., POSTULKOVA, K., RESELAND, J. E., BOUSOVA, K. &

VONDRASEK, J. 2020. Characterization of AMBN I and II Isoforms and Study of Their Ca(2+)-Binding Properties. Int J Mol Sci, 21. **IF₂₀₂₀ 5,924**

VETYSKOVA, V., ZOUHAROVA, M. & BOUSOVA, K. 2022. Production of recombinant human ameloblastin by a fully native purification pathway. Protein Expr Purif, 198, 106133. **IF₂₀₂₁₋₂₀₂₂ 1,6**

Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních:

42nd FEBS congress, Jerusalem, Israel, 10–14 September 2017, komentovaný poster: Novel calmodulin and S100A1 binding site in distal TRPM4 N-terminus.

PhD meeting Třešť 2017, 20. – 22. 11. 2017, Třešť, Česká republika, komentovaný poster: Novel calmodulin and S100A1 binding site in distal TRPM4 N-terminus.

22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Nara, Japan, 22–25 May 2018, komentovaný poster: Novel calmodulin binding site on TRPM6 N-terminus – a regulator of neural tube closure.

High-throughput protein production and crystallization, 10–19 June 2019, Oxford, UK, přednáška + komentovaný poster: Calcium-binding proteins in fusions. **Obdržena cena za nejlepší příspěvek.**

Konference 2. lékařské fakulty. Praha, Česká republika, 1. – 2. 10. 2020, poster: Modifikace vlastností proteinů vázajících vápník ve fúzních konstruktech.

