

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Moniky Zouharové Studium vazebných partnerů a modulace funkčních vlastností kalmodulinu a jeho fúzních proteinových variant.

Práce se zabývá studiem interakcí kalmodulinu a jiných vápník vázajících proteinů s vybranými vazebnými partnery - iontovými kanály rodiny TRPM. Je napsána česky na 68 stranách, má 199 položek citované literatury a je doprovázena pěti publikacemi autorky. Obrázky a grafy mají vynikající grafickou úroveň. V práci jsem našel jen minimální počet nedopatření v textu.

Teoretický úvod shrnuje současný stav informací o kalmodulinu, jak po stránce jeho struktury a funkce, tak po stránce jeho vybraných vazebných partnerů, se kterými může v buňkách interagovat. Rodina iontových kanálů TRPM byla vybrána, protože dva členové této rodiny jsou kalmodulinem prokazatelně regulovány (TRPM2, TRPM4) a u většiny členů této rodiny byly nalezeny oblasti se strukturními prvky, které kalmodulin mohou vázat.

Pozornost je věnována fúzním proteinům založeným na molekule kalmodulinu, které se mohou uplatňovat například jako biosenzory nebo terapeutika.

Další oblastí zájmu jsou vnitřně neuspořádané proteiny, které se také mohou podílet na vazbě vápenatých kationtů jako například ameloblastin obsažený v zubní sklovině. Vnitřně neuspořádané proteiny mohou zaujímat velké množství odlišných konformací, a pokud jsou součástí fúzního proteinu s vhodným partnerem, je možné jejich vlastnosti do určité míry „naladit“. C koncová část ameloblastinu označená jako ameloblastin Ct byla použita ve formě fúzního proteinu s kalmodulinem.

Cíle práce jsou stanoveny jasně.

Ke splnění cílů autorka využila širokou škálu metod zahrnující výpočetní modelování molekul a jejich interakcí, četné fyzikálně chemické a biofyzikální metody a metody molekulární biologie. Vazebné motivy TRPM receptorů vhodné k vazbě kalmodulinu byly *in silico* vyhledány v sekvencích kanálů TRPM 4-7. Nalezené nové sekvence vhodné k interakci s kalmodulinem a jejich mutované varianty byly syntetizovány jako krátké peptidy. Kalmodulin, ameloblastin a jejich fúzní protein byly exprimovány v bakteriích *E. coli* a purifikovány. Získané proteiny a krátké peptidy byly použity k testování interakce mezi molekulami pomocí měření anizotropie fluorescence, analytické ultracentrifugace a spektroskopie cirkulárního dichroismu. V sekvencích krátkých TRPM peptidů byly prováděny bodové mutace odstraňující kladně nabitě aminokyseliny, u kterých se předpokládá interakce se záporně nabitými aminokyselinami kalmodulinu. Tím byly připraveny verze vazebných partnerů, u kterých se dá očekávat oslabená interakce. Vazba testovaných molekul s kalmodulinem byla kvantifikována jako disociační konstanty vazby kalmodulinu nebo fúzního proteinu kalmodulin-ameloblastin Ct s připravenými krátkými peptidy.

Dosažené výsledky odpovídají očekávaným předpokladům. Postupné odstraňování kladně nabitých aminokyselin z vazebných epitopů TRPM receptorů mělo za následek postupný růst disociačních konstant interakce.

Vytvoření fúzního proteinu mezi kalmodulinem a C terminální doménou ameloblastinu vedlo k výraznější změně sedimentačního koeficientu po navázání vápníku, než tomu bylo u samotného kalmodulinu a ameloblastinu Ct. Schopnost vazby fúzního konstruktů na epitop TRPM4np se mírně oslabila. Teplotní stabilita fúzního komplexu se zlepšila jak ve stavu s navázaným vápníkem, tak i bez něho.

Diskuse získaných výsledků je přiměřená a vytčené cíle práce byly splněny. Autorka získala řadu původních nových výsledků.

Experimentální výsledky, na kterých je práce založena byly již publikovány v pěti publikacích autorky. Protože práce prošly náročným recenzním řízením v mezinárodních vědeckých časopisech, nemohou být pochybnosti o závažnosti témat, vhodnosti použitých metod a aktuálnosti dosažených výsledků. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, a proto doporučuji, aby práce byla přijata k obhajobě a autorce byl udělen titul PhD.

V Praze dne 13.8.2024

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

### Otázky:

- 1) Interakce kalmodulinu s vazebnými partnery byla studována v přítomnosti vápníkových kationtů. Docházelo by k nějaké interakci i v nepřítomnosti vápníku?
- 2) Ukazujete, že podle spekter cirkulárního dichroismu samotný C konec ameloblastinu prakticky nereaguje na přidavek vápenatých kationtů, zatímco nativní oligomery ameloblastinu na obrázku 5 vápník navazují. Vysvětlujete si to tak, že ameloblastin k vazbě vápníku potřebuje přítomnost paralelních struktur, podmíněných oligomerizací N konců, nebo že samotná Ct doména ameloblastinu zaujímá konformaci nevhodnou k interakci s vápníkem, přestože acidický charakter by tomu nasvědčoval?
- 3) Mohla by za určitých podmínek přítomnost vápníku vést ke vzniku paralelních struktur v roztoku samotných Ct domén ameloblastinu?

### Návrh:

Nebylo by vhodnější při uvádění disociačních konstant  $K_d$  interakce TRPM receptorů s kalmodulinem a jinými vazebnými partnery uvádět směrodatnou odchylku  $SD$  u  $pK_d$  ( $-\log(K_d)$  místo u  $K_d$ )? Předpokládá se, že v logaritmické škále koncentrací jsou odchylky rozloženy lépe podle normálního rozdělení a tím jsou lépe splněny podmínky pro určování statistických chyb.