

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Moniky Zouharové „ Studium vazebných partnerů a modulace funkčních vlastností kalmodulinu a jeho fúzních proteinových variant“.

Dizertační práce Mgr. Moniky Zouharové byla vypracována na Ústavu Organické Chemie a Biochemie AV ČR pod odborným vedením RNDr. Kristýny Boušové, Ph.D. V dizertační práci se Mgr. Zouharová zaměřila na identifikaci vazebných oblastí pro kalmodulin v podrodině iontových kanálů TRPM4-7, kde tyto vazebné epitopy nebyly dosud popsány. Druhá část dizertační práce se věnuje studiu vlivu vnitřně neuspořádané domény ameloblastinu fúzované s kalmodulinem na vlastnosti výsledného fúzního proteinu, zejména na zvýšení jeho teplotní stability.

Dizertační práce je podložena pěti originálními články a několika konferenčními příspěvky. Z hlediska autorství vědeckých článků je Mgr. Zouharová prvním autorem na dvou původních článcích publikovaných v *International Journal of Molecular Sciences* a v *International Journal of Biological Macromolecules* a spoluautorkou na třech publikacích v časopisech *Heliyon*, *Biochemistry* a *International Journal of Molecular Sciences*. Za zmínku také stojí autorčina účast na dalších třech manuskriptech, které nemají přímý vztah k dizertační práci. Jeden nedávno publikovaný manuskript typu review pak v seznamu prací není uveden.

Aktuálnost a zaměření práce

Dizertační práce se věnuje dvěma aktuálním vědeckým tématům, a to charakterizaci vazby kalmodulinu na iontové kanály TRPM, a funkční optimalizaci proteinů, jako je kalmodulin, pomocí fúze s vnitřně neuspořádanými proteiny.

Práce přináší celou řadu nových a zajímavých poznatků, zejména pak identifikaci vazebných oblastí pro kalmodulin v iontových kanálech TRPM4-7. I když funkční význam těchto interakcí, například při desenzitizaci TRPM kanálů, nebyl objasněn, přesto tyto poznatky představují důležitý krok nejen pro detailní objasnění mechanismů regulace iontových kanálů TRPM, ale i k pochopení toho, jak aberantní regulace těchto iontových kanálů vede k patofyziologickým projevům. Vzhledem k tomu, že TRPM představují cíl pro vývoj nových léčiv, tak je svým způsobem překvapující, jak zásadní otázky v tomto kontextu zůstávají nezodpovězeny.

Ve druhé části dizertační práce autorka využila přístupů proteinového inženýrství ke zlepšení stability kalmodulinu, který byl použit jako modelový protein. Za tímto účelem vytvořila fúzní protein skládající se z kalmodulinu a nestrukturované oblasti ameloblastinu. Podrobná charakterizace tohoto fúzního proteinu odhalila, že mezi oběma doménami probíhá vzájemná interakce, což vede ke zvýšení teplotní stability kalmodulinu.

Autorka výsledky své práce přehledně shrnuje a kriticky hodnotí. Závěry jsou logicky podloženy a srovnávány s poznatky z literatury. Text je celkově velmi dobře strukturovaný, ale domnívám se, že by kapitole Diskuze prospělo rozdělení na podkapitoly reflektující dva tématické okruhy předkládané dizertační práce.

Formální úroveň práce a jazykové zpracování

Předkládaná dizertační práce je jasně strukturovaná, dostatečně detailní a poskytuje aktuální informace. Autorka prokazuje rozsáhlý přehled o tématu a zpracovala značné množství odborné literatury, což dokazuje téměř 200 citací. Práce je členěna podle obvyklé struktury na kapitoly *Abstrakt/Abstract*, *Úvod*, *Cíle disertační práce*, *Materiál a Metody*, *Výsledky*,

Diskuze, Závěr a Souhrn/ Summary. Závěrečná část pak obsahuje přehled literatury a přílohy.

Dizertační práce je napsána v českém jazyce a po jazykové stránce je tato práce jako celek velmi dobře zpracována. Text je bez stylistických neobratností a obsahuje jen minimální počet chyb. Zaznamenané nedostatky jsou spíše výjimečné, například na straně 38 se vyskytuje formulace „...*dokování...epitopu do molekuly CaM do je zobrazeno na příkladu...*“), nebo drobné anglicismy jako „formace komplexů“ nebo „monitoring změn koncentrace“. Rovněž se objevily drobné formální nedostatky, jako je chybějící uvedení jednotek (μM) u rovnovážných disociačních konstant komplexů (Kd) v tabulkách 1 a 2. I přes tyto drobné výtky je text srozumitelný a čtivý, což svědčí o pečlivém zpracování jak po formální, tak obsahové stránce.

Závěrečné zhodnocení

Navzdory výše uvedeným drobným formálním připomínkám se domnívám, že dizertační práce Mgr. Moniky Zouharové přináší nové poznatky, které významně přispívají k rozvoji řešené problematiky. Kvalita dosažených výsledků je podtržena řadou původních publikací, na kterých se autorka podílela. Dizertační práce plně splňuje veškerá kritéria kladená na tento typ prací a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze 20. 8. 2024

Tomáš Vomastek
Mikrobiologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
Praha-4

Otázky do diskuze:

- 1 V dizertační práci autorka predikovala vazebné epitopy pro kalmodulin v proteinech TRPM4-7. Vazba těchto epitopů ke kalmodulinu byla potvrzena biofyzikálními metodami, zejména měřením anizotropie fluorescence pomocí metody ustálené fluorescence. Mutační analýza následně prokázala, že vazba kalmodulinu je závislá na bazických aminokyselinových zbytcích.
Bylo by možné vazbu kalmodulinu ke studovaným kanálům TRPM testovat i jinými způsoby, např. pomocí ko-imunoprecipitace kalmodulinu a TRPM z buněčných lysátů, pomocí fluorescenční mikroskopie nebo FRET experimentů v tkáňových kulturách? Tyto techniky by mohly poskytnout doplňující informace o interakci kalmodulinu s TRPM proteiny a přispět k hlubšímu pochopení jejich vzájemného působení. Prosím o komentář.
2. Pro optimalizaci stability kalmodulinu byla využita C-terminální doména ameloblastinu o molekulové hmotnosti přibližně 25 kDa, přičemž volba této domény byla odůvodněna tím, že se jedná o jeden z mála vnitřně neuspořádaných proteinů, který váže vápenaté ionty. Zajímalo by mě, zda by podobné zvýšení teplotní stability kalmodulinu mohlo nastat i při použití jiných nestrukturovaných domén, které nevážou vápenaté ionty. S tím souvisí také otázka, zda by mohla fúze kalmodulinu s nestrukturovanými proteiny, které nevážou vápenaté ionty vést ke zvýšení jejich helicity?