

Posudek doktorské disertační práce Mgr. Lenky Gryčové “Studium vztahů mezi strukturou a funkcí C-konce vaniloidního receptoru TRPV1”

V předkládané doktorské disertační práci se Mgr. Lenka Gryčová zabývá detailním studiem interakcí izolovaného C-konce vaniloidního receptoru TRPV1s vybranými vazebnými partnery, jmenovitě s kalmodulinem a s ATP. Pomocí moderních spektroskopických stacionárních a časově rozlišených metod byly interakce kvantifikovány. Strukturní informace byly získány porovnáním experimentálních dat získaných na vhodně zvolené sadě mutantů a za pomoci homologního modelování.

Disertace je založena na dvou stěžejních publikacích uveřejněných v letech 2007 a 2008 v renomovaných vědeckých časopisech, konkrétně v *Archives of Biochem. Biophys.* (IF 2.58) a *BBRC* (IF 2.75) doplněných průvodním textem. Tento doprovodný text čítá 88 stran a obsahuje 165 citací. U obou zmíněných prací je Mgr. Lenka Gryčová uvedena jako první autor, na práci z r. 2007 již lze nalézt citace. Mgr. Lenka Gryčová je dále spoluautorkou jedné původní vědecké práce a šesti konferenčních příspěvků. Seznam všech publikací autorky je v disertační práci uveden.

Hlavní výsledky práce je možno stručně shrnout do následujících bodů:

1) V rámci Walker A domény lokalizované na C-konci vaniloidního receptoru TRPV1 bylo nalezeno vazebné místo pro ATP. Data naznačují, že se na C-konci TRPV1 nachází pouze 1 ATP vazebné místo. Bylo ukázáno, že se na vazebné interakci zásadně podílí Lys 735.

2) Byla detailně prozkoumána vazba kalmodulinu na ne zcela typický vazebný kalmodulinový motiv lokalizovaný na C-konci TRPV1. Pomocí sady 9 bodových mutantů byly identifikovány aminokyselinové zbytky účastníci se vazby. Pro vazbu kalmodulinu na TRPV1 se ukázal velmi významným Arg785.

Po formální stránce je práce sepsána přehledně a má dobrou grafickou úpravu a vysoký počet relevantních citací. Poměr mezi popisnými partiemi a výsledkovou částí je vyvážený.

K práci mám následující otázky a komentáře:

- 1) Jaký je běžný rozsah koncentrací ATP a kalmodulinu v cytoplazmě? Bylo by vhodné diskutovat, zda jsou (nebo mohou být) naměřené hodnoty disociačních konstant pro oba studované ligandy fyziologicky relevantní.
- 2) Jaké koncentrace ATP byly použity u zhášecích experimentů s TRPV1 značeného FITC? V jakém rozsahu koncentrací zhášedla AntiFL byly experimenty prováděny? Tyto údaje jsem v práci nenalezl a stávají se důležitými v případě, když není vliv ATP a zhášedla pozorován (Tab. III a IV).
- 3) V práci je na str. 65 uvedeno, že z hodnoty Stern-Volmerovy konstanty lze usoudit, že Lys735, který je přednostně značen FITC, není exponován do rozpouštědla. Pro porovnání postrádám hodnotu zhášecí konstanty pro volný FITC nebo pro volný Lys značený FITC. Pro kritické posouzení závěrů by bylo přínosem, kdyby autorka uvedla příklady experimentálně naměřených zhášecích křivek.
- 4) Ze škálování y-ové osy v obrázku 18 předpokládám, že jsou v grafu vyneseny normované hodnoty fluorescenční anizotropie. Jelikož z grafu není patrná hodnota anizotropie v platu křivek, není jasné, jak bylo toto normování prováděno. Vysvětlete prosím.

Závěrem konstatuji, že předložená práce přináší řadu původních vědeckých poznatků publikovaných v renomovaných recenzovaných časopisech. Tato práce podle mého názoru splňuje kriteria kladená na doktorskou disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze 8. 1. 2009

Doc. RNDr. Petr Heřman, CSc.