



Doc. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.  
děkan fakulty  
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

V Praze, dne 16.12.2008

## Posudek disertační práce

*„Studium vztahů mezi strukturou a funkcí C – konce vaniloidního receptoru TRPV1“.*

**Autor: Mgr. Lenka Gryčová**

Předložená práce se zabývá studiem vztahu struktury a funkce membránového proteinu TRPV1. Tento receptor představuje neselektivní kationtový kanál, jehož funkce je regulována řadou podnětů, často souvisejících s bolestí (kapsaicin, vysoká teplota, nízké pH). Receptor TRPV1 je intenzivně zkoumán, zvláště ve fyziologii (o aktuálnosti tohoto tématu svědčí i 384 článků zmiňujících TRPV1 publikovaných jen v roce 2008<sup>1</sup>). Vzhledem k tomu, že se jedná o membránový protein, není překvapující, že jeho 3D struktura přes intenzivní výzkum není známá. Autorka se tedy soustředila pouze na studium C-terminální domény receptoru, která je rozpustná ve vodě<sup>2</sup> a tudíž umožňuje relativně jednodušší experimentální přístup. Byla vytvořena řada cílených jednobodových mutací a studována vazba dvou ligandů, ATP a kalmodulinu, a to řadou biofyzikálních metod.

Použité metody kombinují standartní molekulárně-biologické postupy (vytváření cílených mutací, purifikace proteinu) s biofyzikálními (fluorescenční metody užití pro charakterizaci vazby ligandů, cirkulární dichroismus) a bioinformatickými (homologní modelování a predikce vazebných míst).

Výsledky práce přispěly k lepšímu prozkoumání dvou vazebných míst na C-terminální doméně proteinu TRPV1, zejména k poznání aminokyselinových zbytků účastnících se vazby obou ligandů. Experimentální výsledky jsou srovnávány s předpovědí modelů vzniklých pomocí homologního modelování.

Získané poznatky byly publikovány ve dvou recenzovaných mezinárodních časopisech (Biochem. Biophys. Res. Commun. a Arch. Biochem. Biophys.), starší z publikací je již 4x citována<sup>3</sup>. To je jistě pro získání titulu Ph.D. dostačující; kromě toho se autorka podílela na další vědecké publikaci, která však tematicky nesouvisí s předkládanou disertační prací.

Práci lze zařadit do oblasti základního výzkumu, není tedy možné hovořit o přímých aplikacích výsledků. Lepší poznání vztahu struktury a funkce membránových proteinů je ale velice žádoucí a zejména hlubší poznání membránových receptorů může přispět k rozvoji medicíny (nové léky – léčba bolesti v případě TRPV1, příčiny nemocí,...).

Po formální stránce je práce přehledně a pěkně graficky upravena, s dostatečným rozsahem (75 stran). Množství překlepů a tiskových chyb je přiměřené rozsahu. Mám jen poznámku k použitému jazyku – je velice znát, že většina textu (hlavně v úvodní části) byla překládána

<sup>1</sup> PubMed, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 8.12.2008

<sup>2</sup> I když jen po fúzi s pomocnými proteiny, jak je popsáno v textu.

<sup>3</sup> očištěno od autocitací

z angličtiny. Domnívám se, že než používat výrazy typu „kalmodulin vazebné místo“, „kalcium vázající protein“, bylo by pravděpodobně lepší psát práci rovnou anglicky.

V části diskuze během obhajoby bych autorce ráda položila následující otázky:

1. Měření vazby ATP na studovaný protein jste prováděli v 500 mM NaCl<sup>4</sup>. Jaký byl důvod k tomu používat tak velkou iontovou sílu? Zkoušeli jste měřit vazbu i v roztocích o menší iontové síle? Nemůže být právě složení pufru příčinou velkého rozdílu mezi vazebnou konstantou pro TNP-ATP a ATP (v případě TNP-ATP uvádíte, že roli mohou hrát i interakce s TNP, v případě ATP interakce s  $\gamma$ - a  $\beta$ -fosfátem, které jsou zřejmě iontové povahy a tudíž slabší při vyšší iontové síle)<sup>5</sup>?
2. Byla CD spektra<sup>6</sup> komplexu CaM a TRPV1-CT měřena v nepřítomnosti vápníku (jak z textu vyplývá)? Pokud jsem to dobře pochopila, bez iontů Ca<sup>2+</sup> k vazbě nedochází a tím pádem srovnání CD spektra komplexu se součtem jeho komponent jen dokládá neexistenci komplexu.
3. Předpokládá se, že vazebná místa pro ATP i kalmodulin jsou přítomna jak na N-, tak na C-terminální doméně proteinu TRPV1. To mi připadá velice zajímavé. Ví se něco o jejich případně kooperaci? Je možné, že se jedna molekula kalmodulinu váže na obě vazebná místa zároveň?

Uvedené otázky považuji jen jako doplňující a rozvíjející diskuzi při obhajobě. Nezpochybňují nijak získané výsledky a závěry práce.

Na závěr lze konstatovat, že předložená disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji proto Mgr. L. Gryčové udělit titul „**Ph.D.**“

RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.

Fyzikální ústav UK  
Matematicko-fyzikální fakulta  
Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2  
Telefon: +420 221 911 339  
e-mail: Eva.Urbankova@mff.cuni.cz

---

<sup>4</sup> str. 39

<sup>5</sup> str. 60-61

<sup>6</sup> str. 68