



**Oponentský posudek doktorské disertační práce  
Mgr. Salome Kyrlové  
s názvem: „Studium molekulárních mechanismů regulace signálních proteinů“**

Předkládána doktorská disertační práce Mgr. Salome Kyrlové se věnuje strukturní charakterizaci interakcí proteinů signálních drah, jejichž deregulace může vést k závažným patologickým stavům, mezi které patří kardio-vaskulární onemocnění, zhoubné bujení nebo myopatická dystrofie. Práce se zaměřuje na molekulární úroveň interakce thioredoxin-vazné domény ASK1 kinasy s thioredoxinem v redukčním nebo oxidačním prostředí, dále vazbu dimeru 14-3-3 na kinasu CaMKK2 nebo strukturní změny kinasy CaMKK2 indukované kalmodulinem.

Práce je předkládána k obhajobě v plné verzi a je členěna do několika oddílů. První oddíl objasňuje fyziologickou funkci studovaných proteinů signálních kaskád nebo jejich proteinových komplexů v živém organismu v kontextu možné patogeneze, dále následuje metodická a materiální část, kde se předkladatelka snaží popsat použitou strategii, následuje velmi podrobný výčet a zhodnocení získaných výsledků, a také diskuze veškerých úskalí, se kterými se musela vypořádat. Zde se také autorka snaží zasadit výsledky své práce do širšího kontextu studované problematiky. Celá práce je ukončena výčtem velmi kvalitních publikací (člen řešitelského týmu – The Journal of Biological Chemistry, Biophysica Biochemica Acta – General Subjects, první autor – FEBS Journal, Biophysica Biochemica Acta – General Subjects v oponentském řízení), které vyšly v recenzovaných periodících a předkladatelka je zde uvedena jako první autor nebo člen řešitelského týmu s vyznačeným podílem na příslušné publikaci. Práce vypadá uceleně a z formálního i vědeckého hlediska dle mého názoru splňuje požadavky, které jsou nutné pro úspěšné obhájení doktorské disertační práce.

První publikace popisuje rekombinantní expresi a purifikaci thioredoxin vazné domény ASK1 kinasy, divokou a mutantní formu thioredoxinu, které byly postupně využity ke strukturním studiím. V rámci těchto experimentů byla využita analytická ultracentrifugace k potvrzení či vyvrácení tvorby proteinového komplexu zmíněných proteinů. Jakmile se potvrdila tvorba proteinového komplexu, byly provedeny experimenty časově rozlišené fluorescence, které měly poukázat na dynamiku tvorby komplexu. Cirkulární dichroismus byl využit ke sledování přítomnosti sekundárních struktur. Závěrem se podařilo získat data z malouhlového rozptylu paprsků X. Na základě naměřených dat byl sestaven strukturní model komplexu thioredoxinové domény ASK1 kinasy s thioredoxinem. V další práci se předkladatelka zaměřila na podobnou problematiku s drobnou modifikací. Opět byla sledována interakce thioredoxinové domény ASK1 kinasy s thioxireoxinem v přítomnosti oxidačního činidla. Pomocí alkylačních sond, v kombinaci s hmotnostně-spektrometrickou analýzou, analytickou ultracentrifugací, časově rozlišenou fluorescencí a počítačovým modelováním se podařilo zjistit, že za tvorbu kovalentního komplexu je zodpovědná intermolekulární vazba mezi C200 ASK1 kinasy a C32 thioredoxinu. V třetí publikaci je popsána studie řešící interakci CaMKK2 s dimerem 14-3-3. Pomocí stanovení enzymové aktivity,

**Přírodovědecká fakulta UK**

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

adresa: Albertov 6, 128 00 Praha  
2

telefon: 221 951 281

e-mail: novakpe1@natur.cuni.cz

ičo: 00216208, dič: CZ00216208

fax: 221 951 283

web: www.natur.cuni.cz



analytické ultracentrifugace, maloúhlového rozptylu paprsků X a roentgen-strukturní analýzy se předkladatelce podařilo identifikovat oblasti interakce těchto proteinů. V poslední práci, byť je zatím v oponentském řízení, je popsána interakce CaMKK2 kinasy s kalmodulinem.

Z předkládané doktorské disertační práce je patrné, že v průběhu svého studia se Mgr. Kylarová naučila celou řadu technik současné strukturní biologie, molekulární biologie a biofyziky. Zároveň prokázala, že získaná data je schopna interpretovat v kontextu současného poznání. Po formální stránce práce obsahuje drobné nepřesnosti, např. kolona na obrácené fázi nebo gravitační pole generované centrifugou. Kapitola popisující vodík-deuteriovou výměnou je poměrně nepřesná, protože nerozlišuje situaci mezi laděním podmínek pro získání nejlepšího prostorového rozlišení a samotnou analýzou deuterovaných vzorků.

Práci doporučuji obhajobě a mám několik dotazů.

- 1) Můžete, prosím, vysvětlit principy separace peptidů na obrácené fázi.
- 2) Ve svých pokusech sledujete interakci dvou proteinů v přítomnosti oxidačního a alkylačního činidla za pH 7.4, přestože se v literatuře uvádí hodnota pH cytosolu 6.5-6.8. Můžete odhadnout jaký vliv má pH 7.4 (mírné oxidační podmínky) na provedené pokusy oproti např. pH 6.8?
- 3) V textu uvádíte použití 500mM koncentrace iodoacetamidu. Může dojít za daných podmínek k alkylation jiných aminokyselin než cysteinu? Jak vysvětlíte přítomnost osmkrát alkylovaného proteinu na straně 105?
- 4) V práci popisujete identifikaci zapojení disulfidických můstků po štěpení proteinů trypsinem. Zároveň popisujete přítomnost různých zapojení. Jak si vysvětlujete přítomnost disulfidických zapojení, která jsou minoritní? Nechybí náhodou v popisu metod přítomnost činidla, které by mělo tyto artefakty eliminovat?

V Jáchymově dne 19. 6. 2018

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

**Přírodovědecká fakulta UK**

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

adresa: Albertov 6, 128 00 Praha  
2

telefon: 221 951 281

e-mail: novakpe1@natur.cuni.cz

ičo: 00216208, dič: CZ00216208

fax: 221 951 283

web: www.natur.cuni.cz