

## Abstrakt

Fosfatidylinositol 4-kinázy (PI4K/PI4-kinázy) katalyzují produkci fosfatidylinositol 4-fosfátu (PtdIns4P), první krok v tvorbě vyšších fosfoinositidů. Fosfatidylinositol 4-fosfát je esenciálním prekurzorem pro tvorbu druhých poslů, fosfatidylinositol(1,4,5)trifosfátu a diacylglycerolu, které vznikají v signalizační dráze zahájené receptorem aktivovanou fosfolipázou C. Kromě toho fosfatidylinositol 4-fosfát reguluje procesy specificky se odehrávající v buněčných kompartmentech a to prostřednictvím vazby širokého spektra efektorových molekul na membránu. Jelikož PI4-kinázy mají ústřední pozici v tvorbě fosfatidylinositol 4-fosfátu probíhající na povrchu intracelulárních membrán, jsou tímto způsobem zodpovědné za procesy zprostředkované fosfatidylinositol 4-fosfátem jako například transport lipidů a jejich metabolismus, transportní procesy v buňce a řízení transportovaného nákladu, remodelace membrán a cytoskeletu, přenos signálu do buňky a mnoho jiných. U savců byly identifikovány dva druhy PI4-kináz: typu II a typu III. Tyto typy kináz si nejsou sekvenčně podobné, a proto mají odlišné biochemické vlastnosti. Abychom objasnili strukturní příbuznost PI4-kináz, je zapotřebí strukturní analýzy. Strukturní charakterizace jednotlivých PI4-kináz by taktéž umožnila objasnit mechanismus katalýzy vzniku fosfatidylinositol 4-fosfátu. Informace o aktivním místě by navíc mohly být využity při navrhování inhibitorů specifických pro PI4-kinázy, což by mělo potenciální využití v medicíně. Selektivní blokování enzymové aktivity by totiž eliminovalo vstup patogenních bakterií fagocytózou a inhibovalo replikaci virů s pozitivní jednovláknovou RNA (+RNA). Strukturní charakterizace jednotlivých izoform, přednostně v komplexu s její regulační molekulou, nebyla doposud provedena. Získané informace by přitom pomohly ozřejmit strukturní aspekty základních biologických dějů a rovněž by osvětlily strukturní nároky virů či bakteriálních patogenů pro jejich replikaci.

Studie popsané v této práci poskytují strukturní i funkční charakterizaci PI4-kináz typu II a PI4-kinázy III $\beta$ . Krystalové struktury jednotlivých forem objasnily celkové uspořádání molekul a organizaci jednotlivých domén a současně potvrdily přítomnost N a C laloku v C-terminální části katalytické domény u všech tří variant. Krystalizace PI4-kináz s fyziologickými substráty odhalila ATP vazebné místo, avšak krystaly v komplexu s inositolem a inositol 1-fosfátem se nepodařilo získat. Proto bylo vazebné místo pro fosfatidylinositol určeno na základě dokovacích studií a molekulárního modelování. Ve struktuře PI4-kináz typu II byla překvapivě objevena také nová laterální hydrofobní kapsa-potenciální regulační místo. Celkové uspořádání u všech tří proteinů taktéž potvrdilo

strukturní odlišnosti mezi typem II a typem III PI4-kináz. Zatímco typ III PI4-kináz je mnohem víc podobný PI3-kinázám, typ II PI4-kináz se podobá protein kinázám. Kromě struktur PI4-kináz s ATP byly vyřešeny také krystalové struktury v komplexu s inhibitory specifickými pro dané kinázy. Strukturní detaily aktivního místa s navázaným inhibitorem nám umožnily plně porozumět inhibičnímu mechanismu a poskytly informace potřebné pro návrh specifických léčiv.