

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Adriany Bäumlové nazvanou: „The crystal structure of PI4-kinase“

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Adriany Bäumlové je zaměřena na studium struktury fosfatidylinositol-4-kinas (PI4K), což jsou enzymy katalyzující fosforylaci inositolového kruhu fosfatidylinositolu na hydroxylové skupině v pozici 4 za vzniku fosfatidylinositol-4-fosfátu. U savců se vyskytují dva typy těchto enzymů, tzv. PI4K typu II a typu III. Tyto typy PI4K nejsou sekvenčně podobné a vykazují rozdílné biochemické vlastnosti. Každý typ PI4K se dále vyskytuje ve dvou isoformách α a β . PI4K hrají klíčovou roli v řadě biologických procesů včetně transportu lipidů, remodelace membrán a cytoskeletu, přenosu signálu v buňce atd. Specifická inhibice těchto kinas má dále velmi perspektivní využití v medicíně vzhledem k roli jakou tyto enzymy hrají během vstupu patogenních bakterií fagocytózou či replikaci virů s jednovláknovou RNA. Proto jsou strukturní studie těchto enzymů a jejich komplexů velmi žádoucí.

Prvním cílem disertační práce Mgr. Adriany Bäumlové bylo provést strukturní analýzu PI4K II α pomocí rentgenostrukturní analýzy a získanou strukturu porovnat se strukturou PI4K typu III. Druhým cílem byla krystalizace PI4K typu II α a III β s vybranými inhibitory pro detailní objasnění inhibičního mechanismu těchto kinas. Obou těchto cílů bylo v rámci řešení práce dosaženo a autorka získala řadu velmi pěkných výsledků. Podařilo se jí vykristalizovat a vyřešit strukturu PI4K II α s rozlišením 2.8 Å. Jednalo se v o první vyřešenou strukturu tohoto typu PI4K, která ukázala netypický typ kinasového sbalení katalytické domény a přítomnost hydrofobního vazebného místa, kam se pravděpodobně váže inositolová skupina fosfatidylinositolu. Autorka se dále podílela na vyřešení krystalové struktury PI4K II β a komplexu PI4K II α s nukleosidovým analogem. V poslední části práce se Mgr. Adriana Bäumlová účastnila rozsáhlé studie zaměřené na vývoj selektivních inhibitorů PI4K III β a strukturní charakterizaci komplexů PI4K s těmito inhibitory.

Získané výsledky byly publikovány ve třech publikacích v kvalitních časopisech s IF, přičemž Mgr. Adriana Bäumlová je první autorkou jedné z nich. Disertační práce je psána tzv. zkrácenou formou a obsahuje úvod do studované problematiky, cíle práce, kopie jednotlivých publikací, které jsou doprovázeny stručným shrnutím a uvedením autorského podílu, diskusi, závěr a seznam citované literatury. Práce je psána pěknou angličtinou a z formálního hlediska je dle mého názoru vše v pořádku. Přítomnost gramatických chyb a formulačních nepřesností je nízká.

Předložená disertační práce ukazuje, že Mgr. Adriana Bäumlová získala značné zkušenosti v celé šíři strukturní biologie a zejména proteinové krystalografie.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. U savců se vyskytují dva typy PI4K označované jako typ II a III. Kam se poděl typ I?
2. Lidská PI4K III β (obr. 9 na str. 27) obsahuje uprostřed N-lobu velmi dlouhý nestrukturovaný segment o délce přibližně 100 aminokyselin, který musel být při krystalizaci tohoto proteinu odstraněn. Jaká je funkce tohoto segmentu?
3. Byla popsána interakce mezi PI4K III β a proteinem 14-3-3. Tato interakce je zprostředkována fosforylací Ser294, přičemž fosforylace tohoto serinu zvyšuje aktivitu PI4K III β . Jaká je úloha proteinu 14-3-3 v rámci této interakce? Jaký je mechanismus aktivace PI4K III β fosforylací Ser294?
4. Pro úspěšnou krystalizaci PI4K II α bylo nutné připravit fúzní (či spíše chimérický) protein s T4 lysozymem. Existují nějaká „pravidla“ pro umístění T4 lysozymu při konstrukci takového konstruktů či se jedná o čistě empirickou záležitost?
5. Jakým způsobem bylo dosaženo lepšího rozlišení při krystalizaci PI4K III β oproti předchozím strukturám?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Adriany Bäumlové představuje cenný přínos ke studiu struktury a inhibice PI4 kinas. Vzhledem k biologickému významu těchto enzymů představují tyto kinasy velmi atraktivní cíl z hlediska medicínální chemie. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Adriany Bäumlové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 17. června 2016

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyz. a makromol. chemie
Přírodovědecká fakulta UK, Praha