

**Posudek na dizertační práci „Struktura PI4-kinázy“****Předkladatelka: Mgr. Adriana Bäumllová**

Školitel: Mgr.&amp;Mgr. Evžen Bouřa, PhD

Předkládaná dizertační práce je založena na třech rukopisech přijatých v renomovaných impaktovaných časopisech (*EMBO Rep; Acta Cryst D, a J Med Chem*), kde v *EMBO reports* je kandidátka prvním autorem. Adriana je rovněž spoluautorkou publikace ve *Scientific reports*, která v dizertaci zahrnuta není. Práce o celkovém rozsahu 108 stránek je psána v angličtině s klasickým členěním zahrnující obsáhlý úvod, tři přiložené publikace, celkové shrnutí a seznam citací. Po formální stránce nemám k práci výhrady. Polemiku by mohl vyvolat pouze minimalistický název dizertace „Struktura PI4-kinázy“, který ve skutečnosti popisuje pouze méně než 20% celé práce (napočítal jsem celkem pět struktur PI4 kináz II $\alpha$  a III $\beta$ , spolu s velkým množstvím dalších experimentů :-).

Zásadním příspěvkem dizertace je vyřešení krystalové struktury PI4 kinázy II $\alpha$  v komplexu s ATP umožňující, spolu s mutagenézí a molekulovým modelováním, definovat místa odpovědná za vazbu ATP, substrátu a interakci s plazmatickou membránou. Tato práce rovněž dokumentuje široký rozsah technik, které si Adriana osvojila během svého doktorandského studia. Tyto zahrnují metody molekulární biologie (klonování a mutageneze), heterologní expresi v několika expresních systémech, purifikační metody, kinetickou charakterizaci rekombinantních proteinů, inhibiční studie a v neposlední řadě také metody rentgenostrukturní analýzy.

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech a tudíž by bylo zbytečné znovu detailně analyzovat data přijatá vědeckou komunitou. Rád bych nicméně kandidátce položil několik dotazů týkajících se obecně PI4 kináz či jednotlivých experimentů:

1. PI4 kinázy jsou důležité pro řadu biologických dějů. V této souvislosti mě zajímá, zda-li existují KO myši těchto proteinů popřípadě s jakým fenotypem? Jestli se myši dožívají dospělosti, byl testována jejich rezistence vůči virům?
2. S výše zmíněným souvisí i druhá otázka – existují specifické inhibitory PI4 kináz testované v (pre)klinických studiích? Není třeba se u takto důležitých enzymů obávat systémové toxicity při eventuálním klinickém použití?
3. Zaujalo mě použití fúzí s T4 lysozymem, které je typické především pro krystalizaci GPCR proteinů. Kolik konstruktů bylo třeba otestovat, než byl získány difraktující krystaly? Bylo testováno více míst pro vložení molekuly lysozymu a jak ovlivnilo vložení lysozymu (u krystalizovaného konstruktů) jeho kinázovou aktivitu vzhledem ke kináze divokého typu?

4. Mohla by autorka v obecné rovině pojednat o purifikaci proteinů asociovaných s membránou a to především ve vztahu k purifikačním/extrakčním technikám, používaným detergentům a jejich výhodách/nevýhodách při krystalizaci, případně biochemických stanoveních?

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky Oborové rady fyzikální chemie a proto ji doporučuji k obhajobě. Současně přeji Mgr. Adrianě Baumlové hodně úspěchů v dalším profesním i osobním životě.

V Praze, 15. červen 2016

RNDr. Cyril Bařinka, PhD  
Laboratoř Strukturní Biologie  
Biotechnologický ústav AV ČR