

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Fyzikální chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical chemistry**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie
Ph.D. study program: Physical chemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Struktura PI4-kinázy
The crystal structure of PI4-kinase

Mgr. Adriana Bäumlová

Školitel/Supervisor: Mgr.&Mgr. Evžen Bouřa Ph.D.

Praha/Prague 2016

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 metabolizmus, transportní procesy v buňce a řízení transportovaného nákladu, remodelace membrán a cytoskeletu, přenos signálu do buňky a mnoha 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 mechanizmus 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 izoforem, přednostně v komplexu s její regulační molekulou, nebyla dosud 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 poskytuje strukturní i funkční charakterizaci PI4-kináz typu II a PI4-kinázy III β . 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 inositolom a inositol 1-fosfátem se nepodařilo získat. Proto bylo vazebné místo pro fosfatidylinositol určeno na základe 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 mechanizmu a poskytly informace potřebné pro návrh specifických léčiv.

1 Úvod

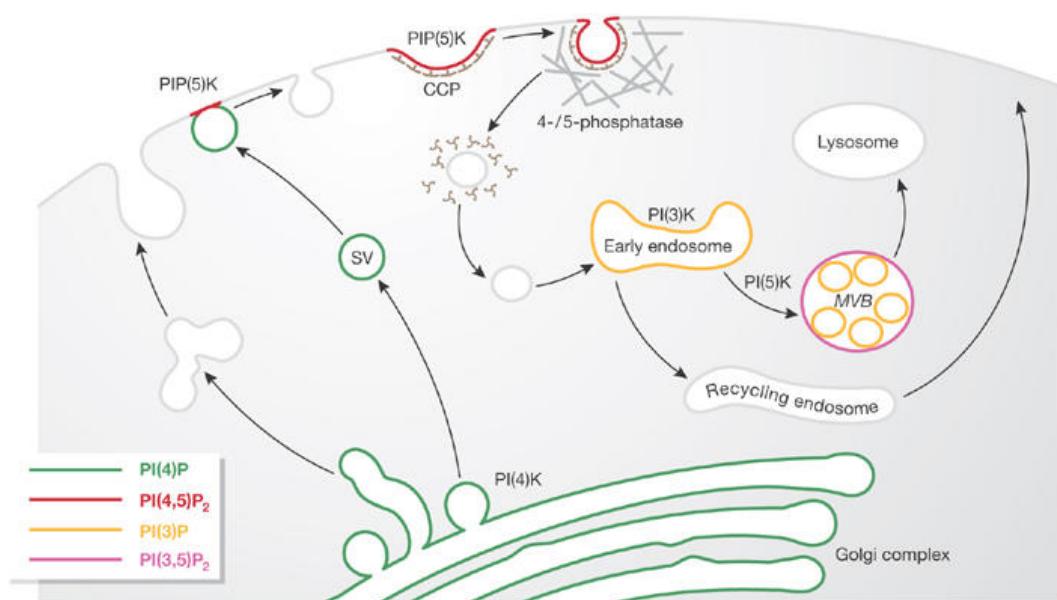
1.1 Fosfoinositidy

Fosfoinositidy představují pouze malý zlomek z buněčných fosfolipidů, nicméně kontrolují základní biologické procesy jako mezi-membránový transport, remodelaci cytoskeletu nebo receptorem řízený přenos signálu. Díky přísně kontrolované činnosti fosfatidylinositol kináz a fosfatáz může vznikat až sedm různých fosfoinositidů na intracelulárních membránách. Lokalizace a množství jednotlivých fosfoinositidů podmiňuje identitu dané organely a rovněž stanovuje vlastnosti určující její identitu. Například plazmatická membrána se vyznačuje rovnovážným obohacením o fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát [1,2], fosfatidylinositol 3-fosfát označuje membránu endozomů [3,4], fosfatidylinositol 4-fosfát je akumulovaný na membráně Golgi komplexu [5,6] a fosfatidylinositol (3,5)-bisfosfát označuje multivezikulární (pozdní neboli zralé) endozomy [7]. Mimoto fosfoinositidy fungují jako "závěsné molekuly" na které jsou vázány cytosolové proteiny prostřednictvím specifických lipid vázajících domén ve spolupráci s GTPázami, a tím regulují mnoho buněčných procesů. Konkrétně fosfatidylinositol 4-fosfát se podílí na biogenzi membrán, na metabolizmu sfingolipidů a cholesterolu a na post-Golgi vezikulárním transportu.

Syntéza a transport glykosfingolipidů, sfingomyelinu nebo cholesterolu do specifické organely je řízeno lipidy přenášejícími proteiny CERT (ceramid přenášející protein, z angl. ceramide transfer protein), FAPP2 (čtyř-fosfátový adaptorový protein 2, z angl. four-phosphate adaptor protein 2), OSBP (oxysterol vázající protein, z angl. oxysterol-binding protein) a ORPL (protein příbuzný oxysterol vázajícímu proteinu, z angl. OSBP-related protein like), které rozpoznávají fosfatidylinositol 4-fosfát pomocí PH (plecstrin homology) domény [8]. CERT váže ceramid skrze START doménu a přenáší ho z ER do TGN (*trans*-Golgi network), kde je přeměněn na sfingomyelin (SM). PH doména vázající Golgi a FFAT motiv interagující s ER, lokalizované každý na opačném konci CERT, umožňují současnou vazbu dvou různých membrán a nevezikulární transport ceramidu napříč organelami [9,10]. FAPP2 asociuje s Golgi membránou vazbou s PtdIns4P a GTPázou Arf1. FAPP2 na Golgi membráně efektivně přenáší glukosylceramid z *cis*- do *trans*-Golgi kompartmentů nebo do ER, kde glukosylceramid podléhá anterográdnímu transportu zpět do Golgi kvůli dodatečné glykosylaci. FAPP2 rozpoznává glukosylceramid pomocí C-terminálně lokalizované glykolipid přenášející doméně GLTP

(z angl. glycolipid transfer protein (GLTP) homology domain) [11]. OSBP a ORPL zprostředkují nevezikulární transport derivátů sterolu. Tyto proteiny mají podobné strukturní elementy jako CERT a navíc obsahují oxysterol/cholesterol vázající doménu zodpovědnou za transport sterolů z ER do Golgi, čímž vytváří gradient cholesterolu v buňce [12,13].

Kromě role PtsIns4P v nevezikulárním transportu je PtdIns4P klíčovou molekulou taktéž ve vezikulárním transportu, a to především v tvorbě vezikul, v jejich oddělování od původní membrány a v jejich splynutí s membránou novou. Během meziorganelového transportu je směr transportu určován proměnou PtdIns4P na příslušní derivát fosfatidylinostiolu nebo také naopak. Receptor na povrchu buňky je během endocytózy internalizovaný do cytosolu v klatrinových váčcích bohatých na PtdIns(4,5)P₂ [14]. Těsně před fúzí těchto váčků s membránou endozomů dochází k ztrátě klatrinového obalu a to díky defosforylací PtdIns(4,5)P₂ na PtdIns4P [15,16]. Další osud internalizované molekuly je určen následnou modifikací endozomální membrány bohaté na PtdIns3P. Proměna PtdIns3P na PtdIns(3,5)P₂ vede k tvorbě pozdních neboli zralých endozomů, jejichž obsah je určen pro degradaci [17]. Naopak výměna PtdIns3P za PtdIns4P vede k návratu internalizovaného receptoru zpět na plasmatickou membránu (viz. Obrázek 1.) [18].



Obrázek 1.: Zobrazení tvorby klatrinových váčků a přerozdělování internalizovaného materiálu do pozdních endozomů nebo endozomů určených k recyklaci nákladu.

Klatrinové váčky s internalizovaným nákladem jsou fúzovány s membránou nezralých endozomů, jejichž membrána je obohacena o PtdIns3P (znázorněno žlutě). Další modifikace tohoto lipida určuje osud internalizované molekuly, jestli bude vrácena zpět na membránu nebo bude degradována. Konverze PtdIns3P

(žlutě) na PtdIns(3,5)P₂ (růžově) označuje váčky určené pro degradaci. Naopak výměna PtdIns3P za PtdIns4P (zeleně) vede k recyklaci internalizované molekuly zpět na plasmatickou membránu. Převzato z [8].

Různé druhy patogenů využívají funkce PtdIns4P jako "závěsné" molekuly a molekuly řídící remodelaci membrán pro svůj vstup do buňky a pro svojí následnou replikaci. Například *Legionella pneumophilla* využívá proteiny SidM a SidC pro fúzi váčků odvozených od ER membrány s váčky obsahujícími tuto bakterii, čímž dochází k modulaci integrity takto vzniklých váčků. SidM a SidC, rozpoznávající PtdIns4P na membránách těchto váčků, formují prostředí vhodné pro replikaci této bakterie právě prostřednictvím interakce se sekrečními váčky [19,20].

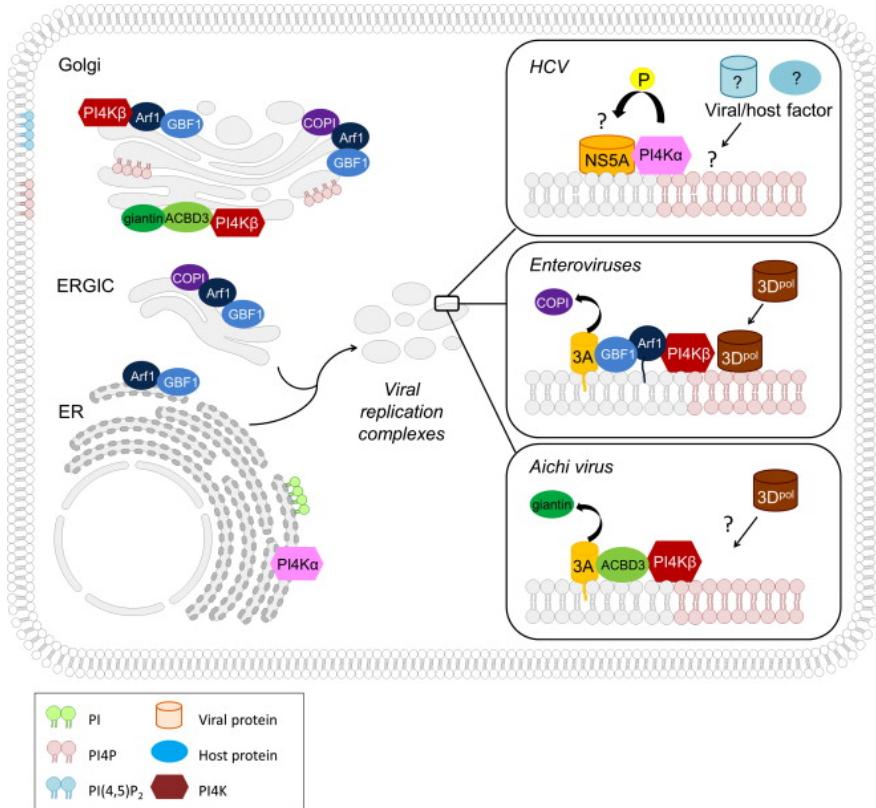
1.2 PI4-kinázy (EC 2.7.1.67)

Fosfatidylinositol 4-kinázy jsou s membránou asociované lipid kinázy, které syntetizují fosfatidylinositol 4-fosfát (PtdIns4P) fosforylací fosfatidylinositolu na 4 pozici. Produkt této reakce, PtdIns4P, byl považován pouze za prekurzor vyšších fosfoinositidů, ale později se ukázalo, že PtdIns4P je důležitým membránovým lipidem regulujícím různé signální a transportní procesy [21]. U savců byly identifikovány čtyři PI4-kinázy. Tyto kinázy se dále rozdělují na kinázy typu II, které jsou senzitivní k inhibici adenosinem, a typu III, které jsou inhibovány Wortmanninem, inhibitorem PI3-kináz. PI4-kinázy typu II obsahují isoformy α a β , jejichž vzájemná sekvenční podobnost je vyšší než jejich sekvenční podobnost s typem III. Zatímco PI4-kinázy typu II se chovají jako integrální membránové proteiny, typ III PI4-kináz je asociovaný s membránou pouze ve formě periferních proteinů. Speciální redistribuce PI4-kináz v rámci jednotlivých buněčných kompartmentů zdůrazňuje jejich význam v procesech odehrávajících se v dané organele. PI4K III β je lokalizována především v Golgi [22,23], zatímco PI4K III α se nachází v ER a na plasmatické membráně [24,25]. PI4K II α a PI4K II β se vyskytují na membránách endozomů a v menší míře v TGN [26]. Kinázy typu III taktéž obsahují jaderné lokalizační signály, avšak jejich funkce v této organele je prozatím nejasná [27]. Funkce PI4K III α v ER není taktéž známa, ale její přítomnost na plasmatické membráně vede k produkci PtdIns4P. Tento lipid zde slouží jako prekurzor druhých poslů (diacylglycerol, linositol (1,4,5)-trifosfát), kteří vznikají při receptorem zprostředkovaném přenosu signálu do buňky, nebo je tento lipid dále upravován na PtdIns(4,5)P₂, klíčovou molekulu v remodelaci membrán v endocytóze řízené klatrinovými váčky [28]. Na rozdíl od PI4K III α , se PI4K III β podílí na procesech odehrávajících se v Golgi. Bylo ukázáno, že PI4K III β

reguluje metabolizmus sfingolipidů skrze tvorbu PtdIns4P a jeho následným rozpoznáním lipid transportujícím proteinem, čím dochází k zajištění transportu ceramidu z ER do Golgi a jeho proměně na sfingomyelin [29]. Kromě toho PI4K III β v spolupráci s PI4K II α umožňuje *post-Golgi* transport a to díky produkci PtdIns4P jako prekurzoru PtdIns(4,5)P₂, kterého rozeznání adaptorovými molekulami klatrinu způsobuje pučení transportních váčků [30]. Kromě *post-Golgi* transportních procesů je PI4K II α zodpovědná za endozomálně řízenou degradaci EGF (epidermální růstový faktor, z angl. epidermal growth factor) receptoru [31] a tvorbu synaptických váčků [32]. PI4K II α byla taktéž identifikována jako klíčová složka v modulaci Wnt signální dráhy, která je často stimulovaná v rakovinných buňkách [33]. PI4K II α spolu s PI4K III β kontrolují transport β -glukocerebrosidázy (GBA) do lysozomů regulovaný receptorem LIMP-2 (lysozomální integrální membránový protein typu 2, z angl. lysosomal integral membrane protein type 2). GBA je lysozomální protein zodpovědný za hydrolýzu glukosylceramidů a proto porucha v této metabolické dráze vede k lysozomální akumulaci glukosylceramidů a k onemocnění označovanému jako "Gaucher disease" [34].

Mnoho nedávných studií poukazuje na roli PI4-kináz v životním cyklu +RNA virů. Některé +RNA viry včetně viru hepatitidy C, Aichi viru, coxsackieviru nebo enteroviru 71 využívá PI4-kinázy typu III pro jejich replikaci v hostitelské buňce a to prostřednictvím modulace metabolismu lipidů [35-38]. Virová replikace probíhá na specializovaných membránových kompartmentech označovaných jako membránové weby nebo replikační organely. Tyto vchlípené membránové struktury pochází z již existujících buněčných membrán bohatých na PtdIns4P [39,40]. Membránové weby/replikační organely poskytují prostor pro vazbu dalších virových nebo hostitelských proteinů, potřebných pro tvorbu aktivního replikačního komplexu a současně poskytují ochranu proti imunitnímu systému [41]. Biosyntéza replikačního komplexu není zcela plně pochopena, ale vzájemná spolupráce mezi virovými a hostitelskými proteiny se ukázala být důležitá. PI4-kinázy typu III jsou virovými proteiny, využívajícími různé strategie, vázány na membránové útvary odvozené od ER nebo Golgi kompartmentů, a tím umožňují vytvoření prostředí vhodného pro jejich replikaci [42,43]. V buňkách infikovaných HCV je PI4K III α vázána na membránové weby interakcí s virovým nestrukturním proteinem NS5A, který rovněž stimuluje její enzymovou aktivitu a tím zvyšuje produkci PtdIns4P (viz. Obrázek 2.) [44,45]. U enterovirové infekce nebo u infekce Aichi virem byl popsán odlišný mechanizmus pro vazbu PI4-kináz typu III na replikační organely. PI4K III β je za fyziologických podmínek vázána na Golgi membránu adaptorovým proteinem ACBD3

(acyl-koenzym A vázající doména 3, z angl. acyl-CoA binding domain containing 3), přičemž tato vazba vede k aktivaci kinázy [46]. Jelikož je ACBD3 rozpustným periferním proteinem, Golgi integrální protein giantin zaručuje lokalizaci ACBD3 na membráně [47]. Nicméně, v buňkách infikovaných Aichi virem se virový nestrukturální protein 3A přímo váže na ACBD3 za vzniku 3A-ACBD3-PI4K III β komplexu esenciálního pro replikaci tohoto viru [36]. Naopak, nestrukturální protein 3A polioviru nebo coxackieviru-B3 váže PI4K III β skrze interakci s GTPázou Arf1 v komplexu s jejím nukleotid vyměňujícím faktorem GBF1 (Golgi-specifický protein brefeldin A- rezistentní guanidin nukleotid vyměňující faktor, z angl. Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor) [48,49].



Obrázek 2.: Schematické zobrazení různých virových strategií pro využití PI4-kináz v jejich replikaci. Pravý horní panel: PI4K III α je vázána na membránové weby přímou interakcí s virovým nestrukturálním proteinem NS5A. Pravý prostřední panel: myristoylovaný enterovirový protein 3A váže PI4K III β na membránové struktury skrze interakci s GTPázou Arf1 a jejím GBF1 vazebným partnerem. Pravý spodní panel: vazba PI4K III β na replikační organely zprostředkovaná vzájemnou interakcí s Aichi virovým proteinem 3A a ACBD3. Převzato z [50].

PI4-kinázy typu III jsou využívány +RNA viry přímo, protože jejich enzymová aktivita je nepostradatelná pro replikaci těchto virů. Ačkoli bylo vynaloženo mnoho úsilí

ke studiu +RNA virů s implikací do antivirové terapie, některé aspekty jejich životního cyklu zůstávají stále nepochopeny. Proto jsou pro účinnou antivirovou terapii nezbytné další studie popisující využití PI4-kináz těmito viry.

2 Metody

Molekulární klonování

Celé nebo zkrácené varianty proteinů byly klonovány do plazmidu pRSFD obsahujícího afinitní kotvu se 6 histidinu následovanou solubilizačním proteinem GB1 (imunoglobulin vázající protein ze Streptokoka ze skupiny G, z angl. an immunoglobulin binding protein from G Streptococcal bacteria) a štěpným místem proTEV (virus tabákové mozaiky, z angl. Tabacco Etch Virus) proteázu. Plazmid pRSFD byl použit pro bakteriální expresi. Plazmid pFBD obsahující GST (glutation S-transferáza, z angl. glutathione S-transferase) kotvu byl použit pro bakulovirovou expresi PI4K III β v hmyzích buňkách Sf9/Sf21 (*Spodoptera frugiperda*). Mutageneze byla provedena za použití Quick-Change kit (Stratagene) a Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (ThermoScientific).

Proteinová exprese a purifikace

Proteiny určeny na krystalizaci byly exprimovány v bakteriích *E. Coli* BL21 Star. Protein PI4K III β určený pro *in vitro* test kinázové aktivity byl exprimován v hmyzích buňkách Sf9/Sf21 za použití bakulovirového expresního systému. Proteiny byly purifikovány afinitní chromatografií, iontovou výměnnou a gelovou chromatografií. Čistota proteinů byla určena pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), z angl. polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate) a barvením pomocí Coomassie Blue.

In vitro kinázová aktivitní esej

Kinázová aktivita byla určena měřením vzniklého ADP za použití ADP-Glo kinase kit (Promega) [51]. Pro měření aktivity PI4-kináz byl 1 μ l proteinu, o koncentraci 500 nM rozpuštěný v kinázovém pufu (20 mM Tris, pH 7,5; 5 mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100; 0,1 mg ml⁻¹ BSA; 2 mM DTT), přidán do reakční směsi o finálním objemu 5 μ l. V případě měření inhibice, byl 1 μ l inhibitoru o požadované koncentraci přidán do reakční směsi o finálním objemu 5 μ l. Reakce byly zahájeny přidáním 2 μ l ATP rozpuštěném v kinázovém pufu (finální koncentrace 100 μ M). Reakce probíhaly 60 min. při pokojové teplotě (298K). Všechny reakce byly provedeny v triplikátech a byly opakovány čtyřikrát. Reakce byly zastaveny přidáním 5 μ l ADP/GloTM činidla a inkubovány dalších 40 min. Následně bylo přidáno 10 μ l KDR (Kinase Detection Reagent) pro přeměnu vzniklého ADP na ATP.

Signál získaný luciferáza-luciferinovou reakcí byl měřen na přístroji Tecan Infinite M 1000 plate reader (Schoeller instruments).

Krystalizace

Krystalizace byla provedena metodou difuze par v provedení sedící kapky při teplotě 291 K mícháním rezervoáru a proteinu v poměru 1:1. ATP/Mg²⁺ nebo inhibitor byly přidány k proteinu před samotným kapáním. Krystalizační roboti Gryphon (Art Robbins Instruments) nebo Oryx8 (Douglas Instruments Ltd) byli použiti pro kapání kapek.

Sběr a zpracování difrakčních dat

Krystaly byly vyloveny pomocí nylonových smyček (Hampton Research), byla provedena jejich kryoprotekce a zmražení v tekutém dusíku. Difrakční data byla sbírána při 100 K na stanicích ID14-4 a ID 23-1 synchrotronu ESRF, Francie, a na stanicích MX 14-1 a MX 14-2 synchrotronu BESSY, Německo. Data byla zpracována s využitím sady programů HKL 3000 [52].

Řešení krystalových struktur

Data byla integrována a zpřesněna za použití programu XDS [53]. Krystalová struktura PI4K II α byla vyřešena pomocí techniky MR-SAD (molekulárního nahrazení v kombinaci s anomálním rozptylem) za použití T4 lysozymu jako modelu pro molekulární nahrazení (MR) a anomálních dat získaných ze selenometioninových krystalů. Krystalové struktury PI4K II β a PI4K III β samostatně nebo v komplexu s inhibitorem byly vyřešeny s použitím MR a jako modely pro MR byly použity PI4K II α (PDB kód 4PLA) a PI4K III β v komplexu s vazebným partnerem Rab11a (PDB kód 4D0L). Počáteční MR a MR-SAD modely byly získány v programu Phaser [54] z balíčku Phenix [55]. Modely byly dále upravovány a zlepšovány pomocí automatického stavění modelu v programu Buccaneer [56] z balíčku CCP4 [57], upřesňovány pomocí Phenix.refine [58] z balíčku Phenix a manuálně dokončeny v programu Coot [59]. Ligandy nebo inhibitory byly umístěny do struktury v programu Coot. Grafické representace struktur byly vytvořeny v programu PyMol [60]. Atomové souřadnice byly nahrány a uchovány v PDB (v databance proteinových struktur, z angl. Protein Data Bank).

3 Cíle práce

Specifické cíle práce:

1. Strukturně a funkčně charakterizovat PI4-kinázy typu II za použití proteinové krystalografie. Určit a vzájemně porovnat aktivní místa a aminokyselinové rezidua přispívající k vazbě ATP a fosfatidylinositol 4-fosfátu u obou kináz typu II. Zhodnotit celkovou strukturu a organizaci jednotlivých domén. Navrhnout možnou asociaci s membránou. Porovnat vzájemné podobnosti PI4-kinázy typu II s PI4-kinázami typu III.
2. Uskutečnit krystalizační pokusy s inhibitory odvozenými od substrátu ATP. Vybrat dostatečně rozpustné inhibitory a krystalizovat je s PI4-kinázami typu II nebo s PI4K III β . Optimalizovat růstu a kvalitu krystalů a provést sběr difrakčních dat. Navrhnout mechanizmu inhibice na atomární úrovni.

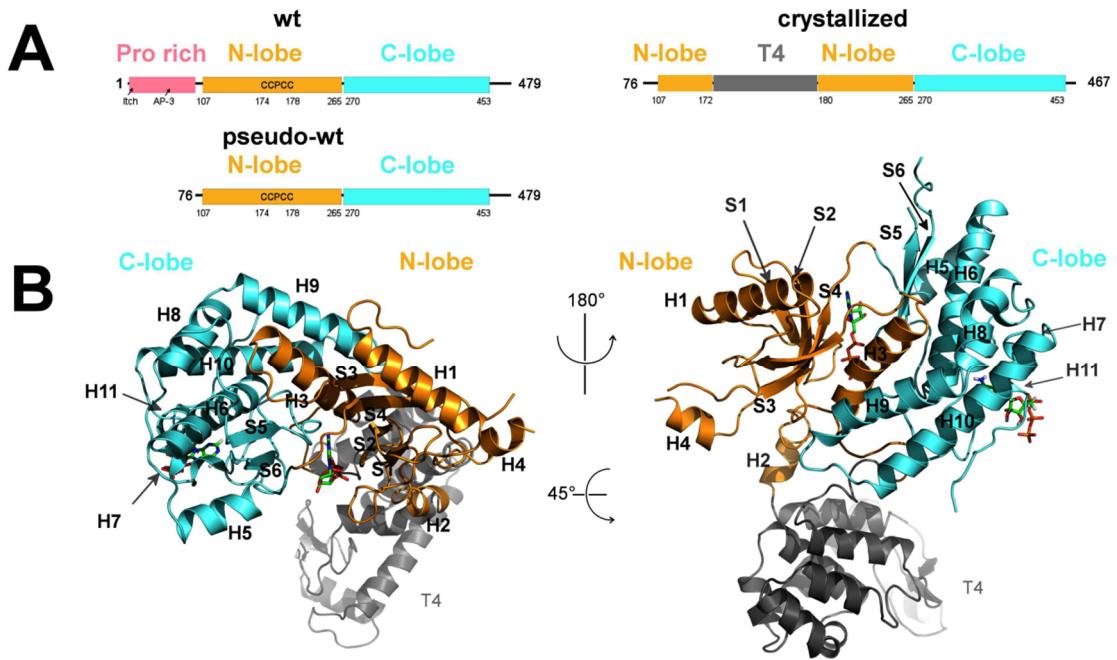
4 Výsledky

4.1 Krystalová struktura fosfatidylinositol 4-kinázy II α

Připravili jsme chimerní protein s T4 lysozymem nahrazujícím palmitoylační motiv pro zlepšení rozpustnosti daného proteinu, pro zlepšení růstu krystalů a difrakčních vlastností. Krystalová struktura PI4K II α v komplexu s jejím fyziologickým substrátem ATP byla vyřešena s rozlišením 2,8 Å za použití MR-SAD metody (viz. Obrázek 3.). Strukturní analýza odhalila, že ATP vazebné místo se nachází mezi N a C lalokem kinázové domény. Krystalová struktura taktéž umožnila definovat aminokyselinová residua tvořící ATP vazebné místo. Jejich důležitost pro katalytickou aktivitu byla ověřena pomocí mutageneze. Překvapivě byla v C laloku kinázové domény objevena druhá molekula ATP. Jelikož je toto místo tvořeno převážně hydrofobními aminokyselinami, nazvali jsme ji laterální hydrofobní kapsou. Přesná funkce této kapsy není známa a proto jsme, v snaze objasnit její funkci, zmutovali příslušná rezidua a testovali jejich vliv na enzymovou aktivitu jak s použitím čistých rekombinantních proteinů tak s použitím buněčných lyzátů. V tomto experimentu jsme ukázali, že rezidua hydrofobní kapsy jsou důležitá pro enzymovou funkci a jejich význam roste především u varianty postrádající palmitoylovou kotvu, co naznačuje její důležitost pro vazbu PI4K II α na membránu. Krystaly s inositolem nebo inositol 1-fosfátem se nám bohužel nepodařilo získat. K objasnění způsobu vazby PI4K II α na membránu byly použity MD simulace (molekulární dynamické simulace, z angl. molecular dynamic simulations) v kombinaci s mutagenezí. Při identifikaci oblastí podílejících se na vazbě na membránu byly brány v úvahu rozličné strukturní aspekty jako celková struktura proteinu, přítomnost laterální hydrofobní kapsy, umístění ATP vazebného místa a distribuce elektrostatického potenciálu.

Tato část výsledků je součástí publikace:

"The Crystal Structure of the Phosphatidylinositol 4-Kinase II α ."
Baumlova A, Chalupska D, Rózycki B, Jovic M, Wisniewski E, Klima M, Dubankova A, Kloer D, Nencka R, Balla T and Boura E. *EMBO Rep.* **15**, 1085–1092 (2014)



Obrázek 3.: Krystalová struktura PI4K II α .

Panel A: zobrazuje uspořádání jednotlivých domén konstruktů určených pro krystalizaci nebo pro biochemické studie. **Panel B:** zobrazuje celkovou strukturu PI4K II α s ATP ve vazebném místě. N a C laloky jsou zobrazeny oranžově a tyrkysově, T4 lysozym šedivě a ATP je zobrazeno v tyčinkové reprezentaci.

4.2 Krystalová struktura fosfatidylinositol 4-kinázy II β s vysokým rozlišením a krystalová struktura fosfatidylinositol 4-kinázy II α obsahující nukleosidový analog poskytuje strukturní podklad pro návrh inhibitorů specifických pro jednotlivé isoformy.

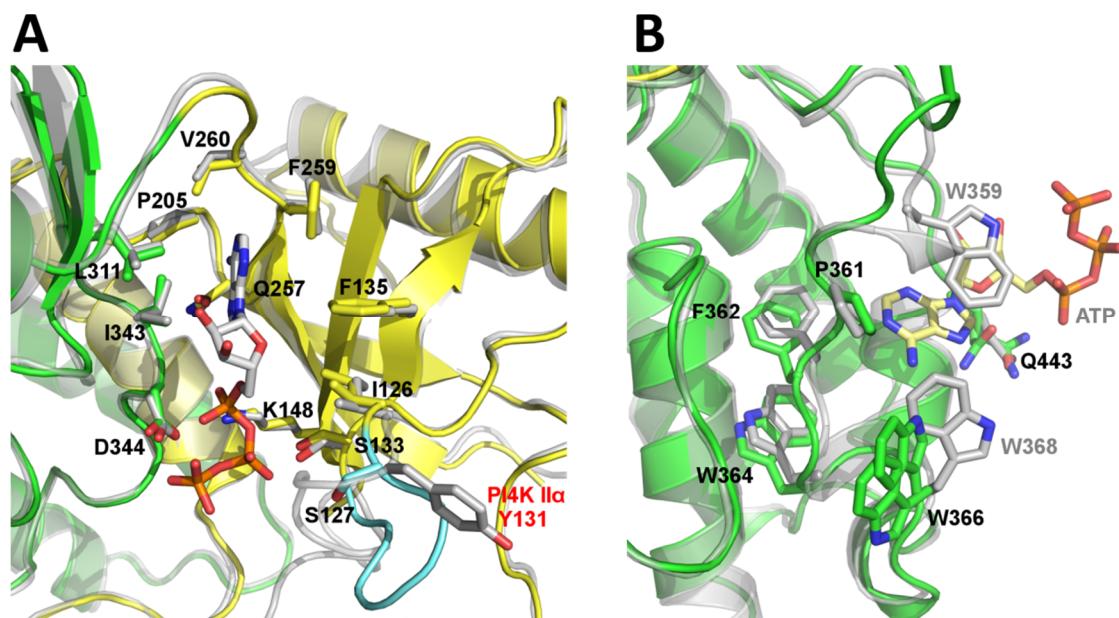
DNA konstrukt PI4K II β určený pro krystalizaci byl navržen na základě krystalové struktury PI4K II α . Následně byly provedeny krystalizační pokusy a optimalizace kvality krystalů. Výsledné krystaly byli podrobny difrakční analýze. Krystaly PI4K II β difraktovaly k 1,9 Å a vyřešená struktura potvrdila celkovou podobnost s PI4-kinázou II α a odhalila vysoce konzervované aktivní místo (viz. Obrázek 4.) s výjimkou Ser127 (odpovídajícímu Tyr131 v α isoformě) disponujícím odlišnou konformací. Důležitost tohoto rezidua se ale zdá být zanedbatelná vzhledem k jeho pozici ve flexibilní smyčce, ve které směruje ven z aktivního místa. U zmíněné isoformy byla taktéž potvrzena přítomnost nově objevené laterální hydrofobní kapsy, ovšem s chybějící molekulou ATP. Detailní analýza této kapsy odhalila flexibilitu Trp357 (není vidět ve struktuře kvůli své flexibilitě) a

Trp366 (odpovídající Trp359 a Trp368 v α isoformě), což naznačuje schopnost jejich sterického přizpůsobení se při vazbě domnělého substrátu. Mimoto se domníváme, že konformační flexibilita hydrofobních reziduí exponovaných na povrchu molekuly může být využita pro stabilizaci této molekuly na membráně díky zanoření hydrofobních reziduí do fosfolipidové dvojvrstvy. Tato teorie je zároveň podpořena pozorovaným modrým posunem u tryptofanové fluorescence po přidaní membrány k rekombinantnímu proteinu [61].

Tato část výsledků je součástí publikace :

"The High-Resolution Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II β and the Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II α Containing a Nucleoside Analogue Provide a Structural Basis for Isoform-Specific Inhibitor Design."

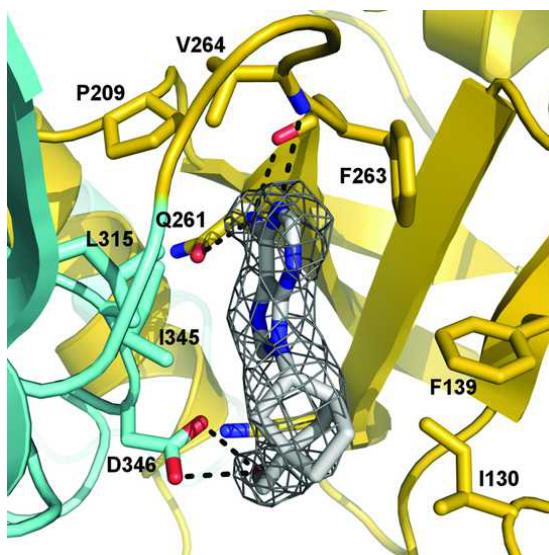
Klima M, Baumlova A, Chalupska D, Hřebabecký H, Dejmek M, Nencka R and Boura E. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **71**, 1555–1563 (2015)



Obrázek 4.: Superpozice ATP vazebních míst a laterálních hydrofobních kapes PI4K II α a II β .

Panel A: Porovnání ATP vazebních míst. Proteinová kostra je zobrazena ve stuhovém provedení, zatímco ATP a rezidua vázající molekulu ATP jsou zobrazena v tyčinkovém provedení. PI4K II α je zobrazena šedě a N a C laloky PI4K II β jsou zobrazeny žlutě a zeleně. Nestrukturovaná smyčka Ser127-Gly132 PI4K II β je zobrazena tyrkysově. Odlišně orientovaný PI4K II α Tyr131 odpovídající PI4K II β Ser127 je zvýrazněn červeně. **Panel B:** Porovnání laterálních hydrofobních kapes se zachovaným zobrazením jako na panelu A.

V druhé části projektu byly provedeny krystalizační pokusy se sérií inhibitorů odvozených od adenosinu. Podařilo se však vykristalizovat PI4K II α pouze s inhibitorem MD59 (s rozlišením 2,6 Å). MD59 obsadil pozici ATP v aktivním místě, čož jsme očekávali, neboť se jedná o adenosinový analog (viz. Obrázek 5.). Inhibiční profily inhibitorů specifických pro typ II PI4-kináz byly testovány pomocí ADP-Glo *in vitro* testu kinázové aktivity. Sloučenina MD59 vykazovala ze všech testovaných inhibitorů nejvyšší účinnost v inhibici PI4K II α , přičemž pro PI4K III β nebyla změřena žádná významná inhibice.



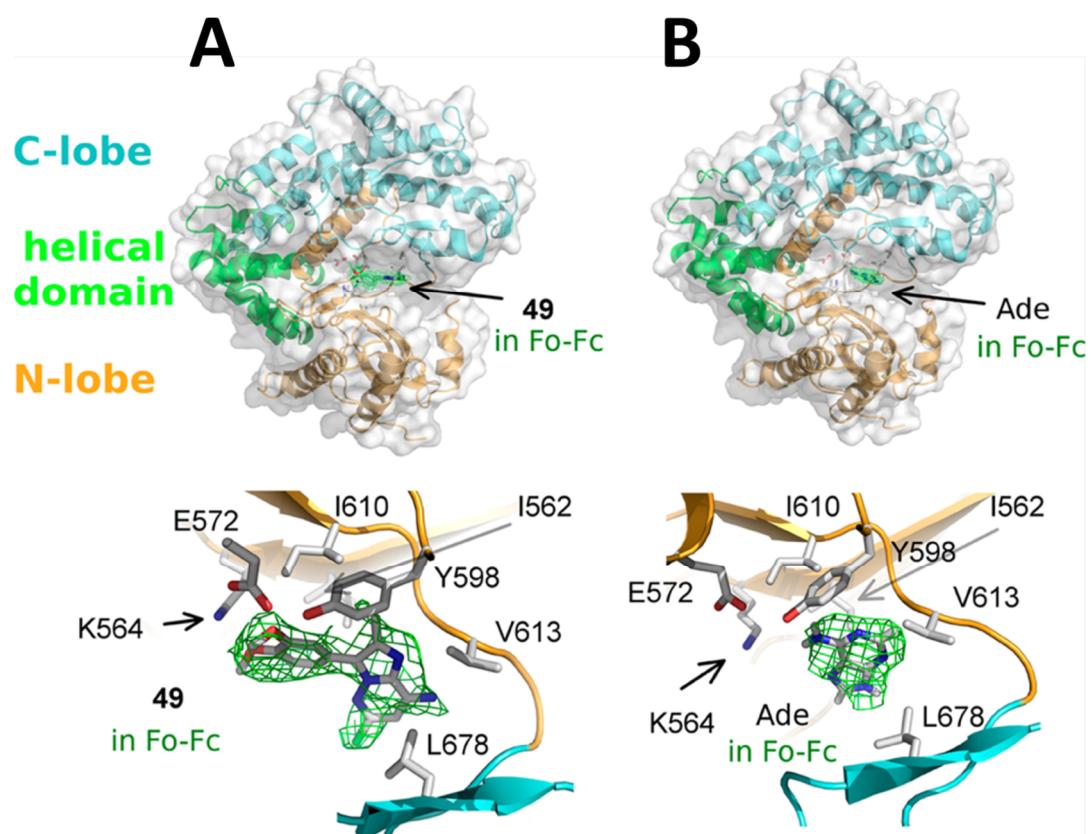
Obrázek 5.: Detailní pohled do aktivního místa PI4K II α s navázaným inhibitorem MD59 ze série adenosinových analogů.

Stuhové zobrazení proteinové kostry s N lalokem ve žlutém provedení a C lalokem v tyrkysovém provedení. Sloučenina MD59 a postranní řetězce vybraných reziduí jsou zobrazeny v tyčinkovitém provedení a barevně označeny následovně: kyslík-červeně, dusík-modře, uhlík-šedě. Diferenční mapa elektronové hustoty pro inhibitor MD59 je konturována na hladině 3 σ . Vodíkové vazby mezi MD59 a aminokyselinovými zbytky jsou zobrazeny jako přerušované černé linie.

4.3 Vysoko selektivní inhibitory fosfatidylinositol 4-kinázy III β a strukturní náhled do způsobu jejího účinku.

PI4K III β byla krystalizována s molekulou ATP a sérií inhibitorů typických pro typ III PI4-kináz. Dvě získané krystalové struktury (viz. Obrázek 6.) poskytly informace důležité pro náčrt mechanismu jejich účinku. Ačkoli krystalové struktury PI4K III β v komplexu s ATP nebo selektivním inhibitorem 49 byly vyřešeny s rozlišením 3,5 Å a 3,3 Å, elektronová hustota pro jednotlivé ligandy byla postačující pro jejich jednoznačné umístění. Superpozice těchto dvou struktur odhalila přítomnost inhibitoru v ATP aktivním

místě a zároveň ukázala míru konformačních změn vyvolaných vazbou tohoto inhibitoru. Imidazol-piridazinová skupina sloučeniny 49 se váže na stejné místo v aktivním centru jako adeninový kruh, přičemž metoxy skupina aromatického jádra tvoří přímou vodíkovou vazbu s Lys564, čímž vyklání Lys564 z aktivního místa. Celkové strukturní informace naznačují, že sloučenina 49 funguje na základě sterického bránění vstupu adenosinu do aktivního místa a tím inhibuje průběh fosforylace lipidů. Dokovací studie s vybranými inhibitory potvrdily inhibiční mechanismus pro všechny členy inhibitorů z této série.



Obrázek 6.: Krystalové struktury PI4K III β s navázaným inhibitorem a molekulou ATP.

Panel A: celková struktura PI4K III β v komplexu s inhibitorem 49 je zobrazena nahoře a detailní pohled do ATP vazebného místa s navázaným inhibitorem je zobrazen dole. Diferenční mapa elektronové hustoty pro inhibitor 49 je konturována na hladině 2σ . Proteinová kostra je ve stuhové provedení se žlutě zvýrazněným N lalokem, tyrkysově zvýrazněným C lalokem a s helikální doménou zobrazenou zeleně. Inhibitor 49 spolu s molekulou ATP a postranními řetězci aminokyselinových zbytků jsou zobrazeny v tyčinkovitém provedení a barevně označeny následovně: kyslík-červeně, dusík- modře a uhlík- šedě. Panel B: Celková struktura PI4K III β v komplexu s molekulou ATP nahoře a detailní pohled do aktivního místa s navázanou molekulou ATP dole. Diferenční mapa elektronové hustoty pro ligand ATP je konturována na hladině 2σ .

5 Závěr

Tato práce významně přispěla ke strukturní charakterizaci PI4-kináz typu II, napomohla objasnit detailní strukturní aspekty pro vazbu ligandu a úlohu laterální hydrofobní kapsy a navíc umožnila navrhnout mechanizmus vazby na membránu. Vzájemné porovnání obou struktur PI4-kináz typu II potvrдило evolučně konzervovanou a kinázově netypickou strukturu a odhalilo velmi podobný způsob působení a regulace. Nicméně PI4-kinázy typu II nejsou příliš strukturně podobné PI4-kinázám typu III, naopak jejich strukturní uspořádání je mnohem více podobné Ser/Thr kinázam, co naznačuje jejich příbuznost s protein kinázami. Krystaly v komplexu s inositolem nebo inositol 1-fosfátem se nám nepodařilo získat, ale předpokládané vazebné místo pro fosfatidylinositol bylo určeno pomocí dokovacích studií a modelování.

Kromě toho, krystalové struktury PI4-kináz v komplexu s isoformově-specifickými inhibitory poskytly strukturní informace ohledně mechanismu inhibice a sterických preferencí potřebných pro vazbu selektivního inhibitoru. Současné inhibitory PI4-kináz jsou odvozeny od inhibitorů PI3-kináz a proto strukturní studie PI4-kináz v komplexu s ATP nebo inhibitorem poskytují podklad pro návrh inhibitorů specifických pro PI4-kinázy s implikací do protivirové terapie.

Abstract

Phosphatidylinositol 4-kinases (PI4K/PI4-kinases) catalyse the production of phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P), the first step in the generation of higher phosphoinositides. PtdIns4P is an essential precursor in the production of second messengers, Ins(1,4,5)P₃ and diacylglycerol, in a receptor activated phospholipase C signalling pathway. Moreover, PtdIns4P itself regulates conserved compartment-specific biological processes, mainly via recruiting a broad spectra of effector proteins. Because PI4-kinases have a central position in PtdIns4P synthesis on a surface of intracellular membranes, they are implicated in a wide range of PtdIns4P-induced processes such as lipid transport and metabolism, intracellular trafficking processes and cargo sorting, membrane and cytoskeleton remodelling events, signal transduction and many others. In mammals, two types of PI4-kinases were identified: type II and type III. Both types do not bear high sequence similarity to each other and, therefore, they possess diverse biochemical properties. In order to elucidate their structural relationship to other lipid kinases, structural analysis is highly demanded. The structural characterisation of individual PI4-kinases could also clarify the catalytic mechanism of PtdIns4P synthesis. Furthermore, information about the architecture of the active site could provide the basis for isoform-specific inhibitor design that would be potentially important in human medicine since the selective blocking of enzymatic activity would eliminate phagocytic engulfment of several pathogenic bacteria or block replication of plus sense single strand RNA viruses (+RNA). Altogether, the structural characterisation of each of individual isoforms, preferably in complex with a regulatory molecule, was still not achieved. However, such structural information would help to elucidate structural aspects of fundamental biological processes and structural requirements for viral and pathogen replication.

The studies reported in this thesis provide the structural and functional characterisation of both type II PI4-kinases and PI4K III β . The high-resolution crystal structures of individual isoforms revealed their overall fold and domain organisation and confirmed a bi-lokal character of the C-terminally localised catalytic domain in all three variants. Co-crystallization of PI4-kinases with physiological substrates defined the ATP binding pocket but no crystals were obtained in complex with inositol or inositol 1-phosphate. However, the binding cavity for phosphatidylinositol (PtdIns) was identified based on docking and modelling. Interestingly, a new lateral hydrophobic pocked was

found as a putative regulatory site in the case of the type II PI4-kinases. The overall fold of these proteins also confirmed the structural diversity between type II and III PI4-kinases. Whilst type III PI4-kinases are rather more similar to PI3-lipid kinases, type II PI4-kinases share higher similarity with protein kinases. The crystal structures in complex with potent isoform-specific inhibitors were also obtained. The structural details of the active site in complex with isoform-specific inhibitors helped us to fully understand the inhibition mechanism and provided information needed for specific drug design.

1 Introduction

1.1 Phosphoinositides

Phosphoinositides represent only a small fraction of cellular phospholipids but they control fundamental biological processes, most notably membrane trafficking, cytoskeleton remodelling and receptor-mediated signal transduction. Up to seven different phosphoinositides are produced on intracellular membranes via the finely tuned action of phosphatidylinositol kinases and phosphatases. The localisation and abundance of individual phosphoinositides determine organelle identity as well as constitute a defining feature of a certain organelle. For instance, the steady state enrichment of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) is a hallmark of the plasma membrane [1,2], phosphatidylinositol 3-phosphate ($\text{PtdIns}3\text{P}$) marks endosomes [3,4], phosphatidylinositol 4-phosphate ($\text{PtdIns}4\text{P}$) accumulates at the Golgi complex [5,6] and phosphatidylinositol (3,5)-bisphosphate ($\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$) is a marker of multivesicular (late) endosomes [7]. Furthermore, phosphoinositides function as a membrane scaffold upon which cytosolic proteins are recruited via specific lipid binding domains in co-operation with small GTPases and hence regulate myriad of intracellular processes. Particularly, $\text{PtdIns}4\text{P}$ is implicated in membrane biogenesis, sphingolipid and cholesterol metabolism and post-Golgi vesicular trafficking events.

Synthesis and organelle-specific targeting of glycosphingolipids, sphingomyelin and cholesterol is mediated by lipid transfer proteins CERT (ceramide transfer protein), FAPP2 (four-phosphate adaptor protein 2), OSBP (oxysterol-binding protein) and ORPL (OSBP-related protein like) which recognise $\text{PtdIns}4\text{P}$ via their PH (plectrin homology) domain [8]. CERT binds ceramide via its START domain and transfers it from the ER to the *trans*-Golgi network (TGN) where ceramide is converted to sphingomyelin (SM). The Golgi interacting PH domain and the ER interacting FFAT motif at the opposite end of CERT facilitate simultaneous binding of two distinct membranes and the non-vesicular transport of ceramide across inter-organelle contact sites [9,10]. FAPP2 binds both $\text{PtdIns}4\text{P}$ and small GTPase Arf1 to associate with the Golgi membrane. At the Golgi membrane FAPP2 efficiently transfers glucosylceramide from *cis*- to *trans*-Golgi compartments or to the ER where glucosylceramide undergoes anterograde trafficking back to the Golgi for additional glycosylation. FAPP2 recognises glucosylceramide via its C-terminally localised glycolipid transfer protein (GLTP) homology domain [11]. OSBP

and ORPL mediate non-vesicular trafficking of sterol derivatives. They possess similar structural elements to CERT and additional oxysterol/cholesterol-binding domain responsible for sterol transfer from the ER to the Golgi to generate intracellular cholesterol gradient [12,13].

In addition to the role of PtdIns4P in non-vesicular trafficking, PtdIns4P is also a key player in vesicular-mediated trafficking mainly in vesicle biogenesis, fission and membrane fusion processes. During inter-organelle trafficking events the conversion of PtdIns4P to appropriate phosphatidylinositol derivative or vice versa occurs thus determining the direction of cargo transport. In clathrin-mediated endocytosis, a cell surface receptor is internalised into the cytosol in PtdIns(4,5)P₂ derived clathrin coated pits [14]. Prior to fusion of clathrin coated vesicles with early endosomes, endocytosed vesicles undergo uncoating induced by dephosphorylation of PtdIns(4,5)P₂ to PtdIns4P [15,16]. The further modification of PtdIns3P on highly enriched early endosomal membranes governs the fate of internalised cargo. The conversion of PtdIns3P to PtdIns(3,5)P₂ define the membrane of late endosomes whose cargo is designated for lysosomal degradation [17]. On the other hand, replacement of PtdIns3P to PtdIns4P leads to receptor recycling back to the plasma membrane (PM) in a ligand-free state (see Figure 1.) [18].

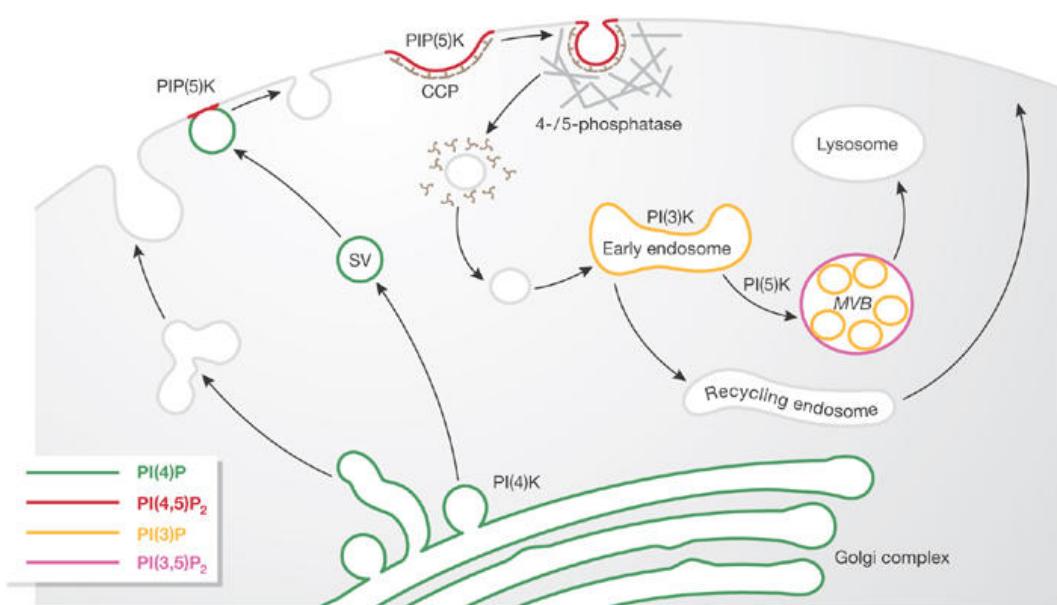


Figure 1.: Cartoon representation of forming the clathrine coated vesicles and further sorting of internalised cargo into recycling or late endosomes.

The clathrin coated pits harbouring the internalised cargo are fused with the membrane of early endosomes enriched with PtdIns3P (indicated in yellow). Another modification of this lipid determines whether or not the internalised cargo will be recycled back to the plasma membrane or undergo degradation. The PtdIns3P (yellow) conversion to PtdIns(3,5)P₂ (magenta) defines the vesicle designated for degradation. On the other

hand, replacement of PtdIns3P to PtdIns4P (green membrane) directs recycling endosomes (grey) back to the membrane. Taken from [8].

The scaffolding role of PtdIns4P and PtdIns4P-induced membrane remodelling events are also exploited by diverse pathogens for their invasion into the cell and establishment of replication niche. For instance, *Legionella pneumophilla* employs SidC and SidM proteins to modulate the integrity of *Legionella*-containing vesicles via their fusion with the ER-derived vesicles. SidC and SidM bind to PtdIns4P pool on *Legionella*-containing vesicles and recruit early secretory vesicles to form a favourable environment for bacterial replication [19,20].

1.2 PI4-kinases (EC 2.7.1.67)

Phosphatidylinositol 4-kinases are membrane associated lipid kinases that synthesise PtdIns4P by phosphorylating the inositol ring of phosphatidylinositol at the 4th position. The product of this reaction, PtdIns4P, was initially considered merely a precursor of higher phosphoinositides but later it was shown that PtdIns4P itself is an important membrane lipid regulating different signalling and trafficking events [21]. Four mammalian PI4K isoforms have been identified, subdivided to type II, which are sensitive to adenosine and type III which exhibit sensitivity to PI3K-derived inhibitor Wortmannin. Type II PI4-kinases comprise the α and β isoform which bear high sequence similarity to each other but they lack similar features with both isoforms of type III PI4-kinases. Furthermore, different substrate affinity, sensitivity towards inhibitors and a mechanism of membrane association make type II PI4-kinases distinct from type III PI4-kinases. While type II PI4-kinases behave as integral membrane proteins, type III PI4-kinases bind membrane as peripheral membrane proteins. Specialised compartment redistribution of PI4-kinases also emphasise their role in organelle-specific processes. PI4K III β is predominantly the Golgi-localised enzyme [22,23] while PI4K III α is primarily the ER and the PM resident enzyme [24,25]. PI4K II α and II β co-localise with endosomal membranes, however, PI4K II α is also present in a lesser amount in the TGN [26]. Type III PI4-kinases also contain nuclear localisation and nuclear export signals, however, their function in the nucleus remains elusive [27]. Also the function of PI4K III α in the ER is not entirely known but as the plasma membrane localised enzyme it is responsible for the PtdIns4P production *in situ*. PtdIns4P at the PM serves as a precursor for second messengers (diacylglycerol, inositol(1,4,5)-triphosphate) in receptor-mediated

signalling or it is converted to PtdIns(4,5)P₂ which is a key regulatory phospholipid of the plasma membrane remodelling events in clathrin-mediated endocytosis [28]. Unlike PI4K IIIα, PI4K IIIβ is involved in PtdIns4P-mediated Golgi-localised processes. PI4K IIIβ was shown to regulate the sphingolipid metabolism via the PtdIns4P production and its subsequent recognition by the lipid transfer protein thus assuring the ceramide transfer from the ER to the Golgi where it is further processed to SM [29]. Furthermore, PI4K IIIβ in cooperation with PI4K IIα promote post-Golgi trafficking events via generating PtdIns4P as a precursor for PtdIns(4,5)P₂ to which clathrin adaptors are recruited to induce vesicle budding [30]. In addition to post-Golgi trafficking events, PI4K IIα is implicated in EGF receptor endosomal-mediated degradation [31] and synaptic vesicle biogenesis [32]. PI4K IIα was also identified as a key component in modulating the Wnt signalling pathway which is often up-regulated in cancers [33]. Additionally, PI4K IIα together with PI4K IIIβ control LIMP-2-mediated β-glucocerebrosidase (GBA) transport to lysosomes. GBA is a lysosomal enzyme responsible for hydrolyzing glucosylceramide and, therefore, a defect in this metabolic pathway leads to glucosylceramide accumulation and cause the lysosomal storage disorder known as Gaucher's disease [34].

Number of recent studies implicates PI4-kinases in the life cycle of +RNA viruses. Many +RNA viruses including Hepatitis C virus (HCV), Aichi virus, coxsackievirus or enterovirus 71 exploit PI4-kinases type III to modulate host lipid metabolism to facilitate viral replication [35–38]. Viral RNA replication takes place on specialised membrane compartments designated as membranous webs or replication organelles. These invaginated membrane structures are derived from pre-existing cellular membranes enriched with phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P) [39,40]. Membranous webs/replication organelles provide a platform for recruitment of other host and viral non-structural proteins to build a functionally active replication complex and furthermore, to protect viral proteins against the host immune defence [41]. The replication complex biogenesis is still poorly understood but it requires the cooperative action of viral and host proteins. Different strategies are employed by RNA viruses in recruiting PI4-kinases type III to the ER or the Golgi-derived membranes to form a favourable environment for viral replication [42,43]. In HCV infected cells, PI4K IIIα is recruited to membranous webs via interaction with the viral non-structural protein NS5A triggering its enzymatic activity which in turn leads to an elevated level of PtdIns4P on the membranes (see Figure 2.) [44,45]. In addition to directly mediated hijacking of host lipid kinase, effector-mediated interaction between viral protein and host PI4K IIIβ was also observed in enteroviral or

Aichi viral infection. Under physiological conditions, PI4K III β is recruited and activated at the membrane via the Golgi adaptor protein ACBD3-mediated interaction [46]. Since ACBD3 (acyl-coenzyme A binding domain containing 3 protein) is a soluble membrane peripheral protein, its membrane localisation is achieved via interaction with the Golgi integral protein giantin [47]. However, in Aichi virus infected cells, the viral non-structural protein 3A directly binds ACBD3 to form the 3A-ACBD3-PI4KIII β complex essential for viral replication [36]. Contrary, the non-structural 3A protein of poliovirus or coxackievirus-B3 bind the complex of small GTPase Arf1 and its guanine nucleotide exchange factor GBF1 in order to recruit and activate PI4K III β [48,49].

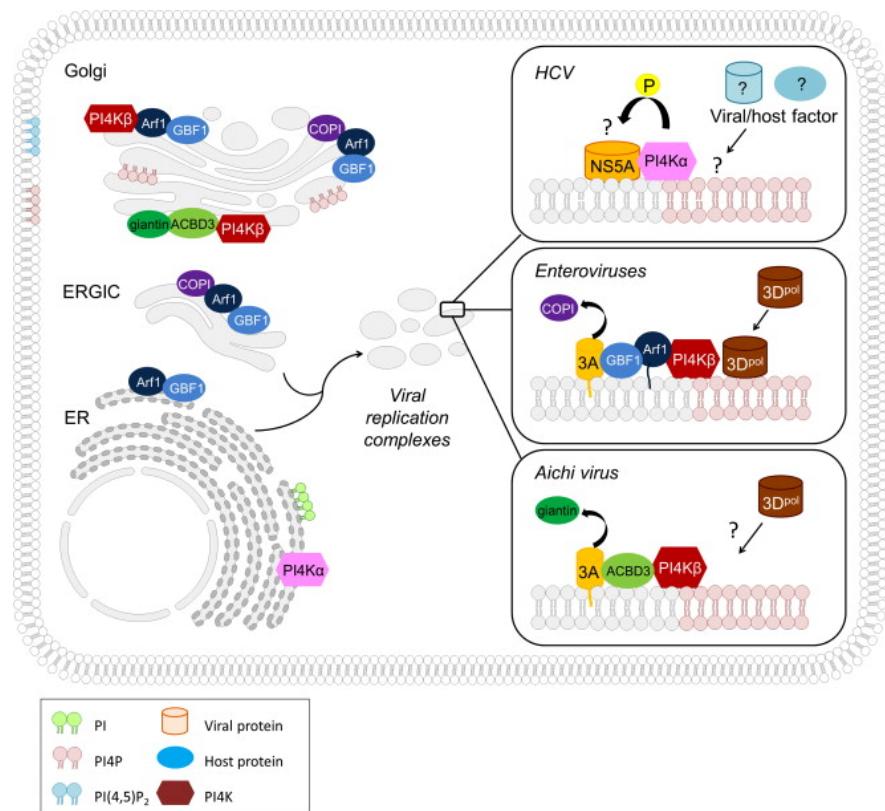


Figure 2.: Schematic representation of different strategies to hijack human PI4-kinases type III.

In the top right panel PI4K III α is recruited to the MWs by direct interaction with viral non-structural protein NS5A. In the middle right panel myristoylated enteroviral 3A protein recruits PI4K III β to the replication platform via interaction with small GTPase Arf1 and its GBF1 guanine nucleotide exchange factor. The bottom right panel depicts recruitment of PI4K III β by Aichi-virus 3A protein via cooperative interaction with ACBD3. Taken from [50].

Type III PI4-kinases represent the prime target for +RNA viruses to harness since their enzymatic activity is crucial for a replication complex formation. Although a huge effort is exerted in anti-viral research, some aspects of +RNA viruses life cycle are not completely understood. Therefore, deeper insight into how +RNA viruses utilize type III PI4-kinases would provide information needed for potent anti-viral therapy.

2 Methods

Molecular cloning

The full length proteins and their truncated variants were cloned into pRSFD vector with a N-terminal 6x His-tag followed by a GB1 (an immunoglobulin binding protein from G Streptococcal bacteria) solubility tag and TEV (Tobacco Etch Virus) protease cleavage site using restriction cloning. pRSFD was used for bacterial expression. pFBD vector with GST (glutathione S-transferase) tag was used for baculoviral expression of PI4K III β in Sf9/Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) insect cells. Mutations were introduced using the Quick-Change kit (Stratagene) or the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (ThermoScientific).

Protein expression and purification

Proteins used for crystallization trials were expressed in *E. Coli* BL21 Star. PI4K III β used for *in vitro* kinase activity assay were produced in insect cells Sf9/Sf21 using baculovirus system. Protein were purified using affinity chromatography followed by ion-exchange and size-exclusion chromatography. The purity was assessed by SDS-PAGE (polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate) followed by staining with Coomassie Blue.

In vitro kinase assay

Lipid kinase activity was determined by measuring the ADP generation using ADP-Glo kinase kit (Promega) [51]. 1 μ l of the protein with concentration 500 nM in a kinase buffer (20 mM Tris, pH 7.5; 5 mM mgCl₂, 0.2% Triton X-100; 0.1 mg ml⁻¹ BSA; 2 mM DTT) was added to a final reaction volume 5 μ l for the activity measurement. For the inhibition measurement additional 1 μ l of inhibitor at the desired concentration was added to a final volume 5 μ l. The kinase reactions were initiated by adding 2 μ l ATP in a kinase buffer (final concentration 100 μ M) to a final reaction volume 5 μ l. The reactions were carried out for 60 min. at room temperature (298K). All reactions were conducted in triplicates and were repeated four times. The reactions were stopped by adding of 5 μ l of ADP/GloTM reagent and incubated for 40 min. Subsequently, 10 μ l of Kinase Detection Reagent was added to convert ADP to ATP and the signal obtained from luciferase/luciferin reaction was measured on a Tecan Infinite M 1000 plate reader (Schoeller instruments).

Crystallization

Crystals were grown by the sitting-drop vapour diffusion method at 291 K by mixing the protein solution with equal volume of reservoir solution. Before setting up the drops, protein was supplemented with ATP/Mg²⁺ or inhibitor. Gryphon (Art Robbins Instruments) or Oryx8 (Douglas Instruments Ltd) crystallization workstations were used for crystallization trials.

X-ray diffraction data collection and processing

Crystals were fished with nylon loops (Hampton Research), cryo-protected and flash-frozen in liquid nitrogen. The diffraction data were collected at 100 K using the beamlines ID 14-4 and ID 23-1 of the ESRF, France and beamlines MX 14-1 and MX 14-2 of the BESSY, Germany. Data sets were processed with HKL3000 package [52].

Crystal structures determination

Data were integrated and scaled using XDS [53]. The structure of PI4K II α was solved by MR-SAD method (molecular replacement in combination with single-wavelength anomalous dispersion) using T4 lysozyme as a search model and the anomalous signal from SeMet containing crystals. The structures of PI4KII β and PI4K III β by themselves or in complex with inhibitors were solved by MR using PI4K II α (PDB code 4PLA) and PI4K III β in complex with Rab11a (PDB code 4D0L) as search models. The initial MR and MR-SAD models were obtained using program Phaser [54] from the Phenix package [55]. The models were further improved using automatic model building with Buccaneer [56] from CCP4 package [57], automatic model refinement with Phenix.refine [58] from Phenix package [55], and manual model building with Coot [59]. The ligands or inhibitors were placed using Coot. Structural figures were generated in PyMOL [60]. The atomic coordinates were deposited in the Protein Data Bank.

3 Aims of the studies

Specific research aims:

1. To structurally and functionally characterise type II PI4-kinases using X-ray crystallography. To define and juxtapose the active sites and individual residues responsible for cooperative ATP and phosphatidylinositol binding of both isoforms. To evaluate the overall kinase fold and domain organisation. To outline membrane association and kinase orientation with respect to the phospholipid bilayer. To compare the structural similarity of type II PI4-kinases with type III PI4-kinases.
2. To attempt crystallization with a series of ATP-derived inhibitors. To select reasonably soluble inhibitors and initiate their co-crystallization studies with PI4-kinases type II and PI4K III β . To optimise the crystal growth and quality and conduct X-ray diffraction analysis. To outline the inhibition mechanism at the atomic level.

4 Results

4.1 The Crystal Structure of the Phosphatidylinositol 4-Kinase II α

We designed a chimeric protein in which the palmitoylation motif was replaced with T4 lysozyme in order to improve protein solubility, crystal growth and diffraction properties. The crystal structure of PI4K II α in complex with its physiological substrate ATP was solved at 2.8 Å resolution using MR-SAD method (see Figure 3.). Structural analysis revealed that the ATP binding site is positioned between the N- and C-lobe of the kinase domain. The crystal structure also enabled us to define the residues of the ATP binding site. Their importance for catalytic activity was verified using mutagenesis analysis. Surprisingly, a second ATP molecule was identified in the C-lobe of the catalytic domain. Since mostly hydrophobic residues define this site, we termed it as the lateral hydrophobic pocket. The precise function of this pocket is unknown. In order to provide insight into the putative function of this lateral hydrophobic pocket, we performed enzymatic assay with mutated variants of this enzyme in their natural environment and *in vitro* experiment. We have shown that the residues forming the hydrophobic pocket are important for enzymatic function and that their relevance increases in the case of non-palmitoylated enzyme suggesting their importance for membrane binding and proper positioning of PI4K II α with respect to membrane. Unfortunately, we were not able to obtain the crystals with inositol or inositol-1-P bound. Therefore, docking studies were performed to identify a putative phosphatidylinositol pocket. More importantly, MD-simulations (molecular dynamic simulations) in combination with mutagenesis analysis were used to reveal membrane binding mode of PI4K II α . Different structural aspects such as the overall protein fold, presence of the lateral hydrophobic pocket, localisation of the ATP binding site and distribution of electrostatic potential were taken into account in identifying the regions responsible for membrane association.

Data are included in the following publication:

"The Crystal Structure of the Phosphatidylinositol 4-Kinase II α ."
Baumlova A, Chalupska D, Rózycki B, Jovic M, Wisniewski E, Klima M, Dubankova A, Kloer D, Nencka R, Balla T and Boura E. *EMBO Rep.* **15**, 1085–1092 (2014)

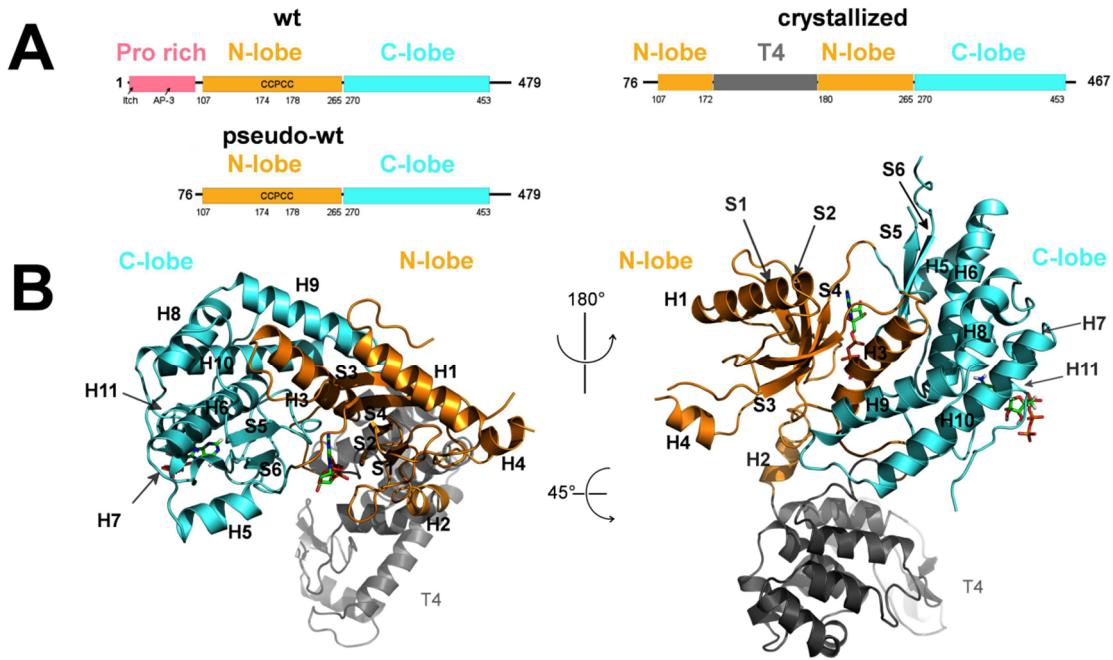


Figure 3.: The crystal structure of PI4K IIa.

Panel A: depicts a domain organisation of the individual constructs used for crystallization trials or biochemical studies. **Panel B:** shows cartoon representation of the overall PI4K II α structure with bound ATP. The N- and C-lobes are coloured in orange and cyan, T4 lysozyme in grey and ATP is shown in stick representation.

4.2 The High-Resolution Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II β and the Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II α Containing a Nucleoside Analogue Provide a Structural Basis for Isoform-Specific Inhibitor Design.

The DNA construct of PI4K II β used for crystallization studies was designed based on the crystal structure of PI4K II α . Subsequently, crystallization trials and optimization of crystal quality were performed and the final crystals were subjected to X-ray diffraction analysis. The crystals of PI4K II β diffracted to 1.9 Å resolution and the solved structure confirmed a highly similar overall fold with PI4K II α and a highly conserved active site (see Figure 4.) with the exception for Ser127 (corresponding to Tyr131 in α isoform) exhibiting a different conformation. However, the importance of this residue seems to be negligible due to its position in the flexible loop where it is pointing out from the ATP binding cavity. The presence of the newly discovered lateral hydrophobic pocket was also confirmed in this structure, however, it was lacking the second ATP. A detailed analysis of

this pocket also revealed the conformational flexibility of Trp357 (is not visible in the structure due to its flexibility) and Trp366 (corresponding to Trp359 and Trp368 in the α isoform) which indicated the possibility for putative steric accommodation in the binding of a membrane substrate. Furthermore, we suppose that the conformational flexibility of the surface-exposed residues (Trp368 and Trp359) in the hydrophobic pocket could be important for the protein stabilization at the membrane via immersion of these tryptophan residues into a lipid bilayer. This theory is also supported by the observed blue shift of tryptophan fluorescence upon addition of membrane to the recombinant protein [61].

Data are included in the following publication:

"The High-Resolution Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II β and the Crystal Structure of Phosphatidylinositol 4-Kinase II α Containing a Nucleoside Analogue Provide a Structural Basis for Isoform-Specific Inhibitor Design."

Klima M, Baumlova A, Chalupska D, Hřebabecký H, Dejmek M, Nencka R and Boura E. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **71**, 1555–1563 (2015)

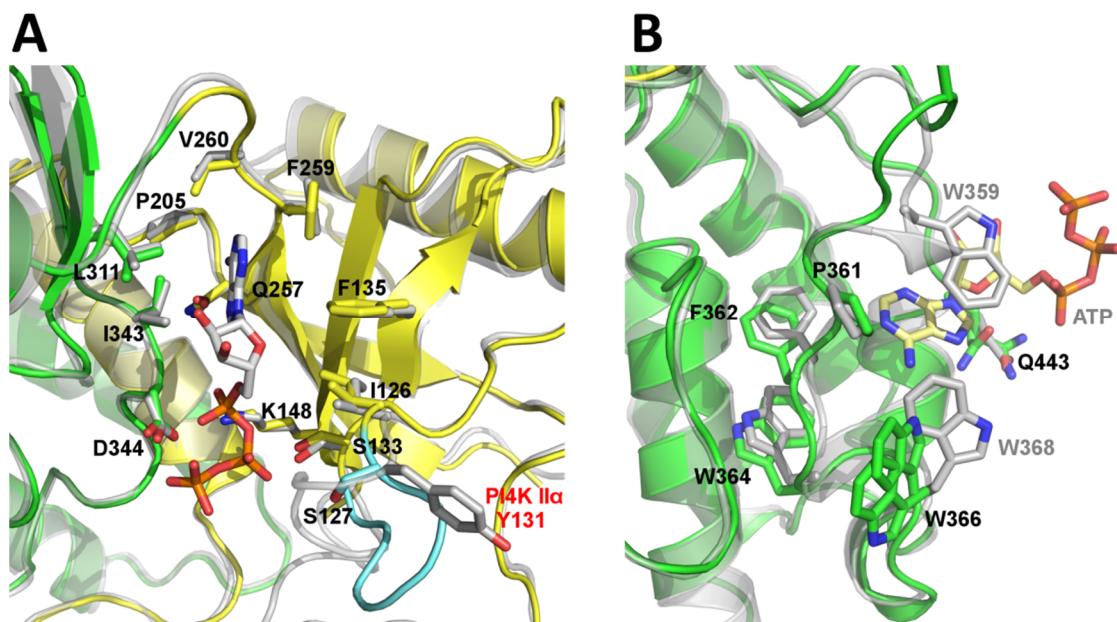


Figure 4.: Superposition of ATP binding sites and lateral hydrophobic pockets of PI4K II α and II β .

Panel A: Comparison of ATP binding pockets. The protein backbone is depicted in cartoon representation while ATP and the residues involved in ATP binding are shown in stick representation. PI4K II α is coloured in grey and the N- and C-lobes of PI4K II β are coloured in yellow and green, respectively. The disordered loop of PI4K II β consisting of Ser127-Gly132 is coloured in cyan. Differently oriented PI4K II α Tyr131 corresponding to PI4K II β Ser127 is highlighted in red. **Panel B:** Comparison of the lateral hydrophobic pockets is in the same representation and coloured as in panel A.

In a second part of this project, crystallization trials with a series of inhibitors derived from adenosine were performed with both isoforms. However, only co-

crystallization of PI4K II α with MD59 provided well diffracted crystals (2.6 Å resolution). As expected, MD59 occupied the position of ATP adenine in the active site as it is the adenosine analogue (see Figure 5.). The inhibition profiles of nucleotide analogues against PI4K II α were also tested using the luminescent ADP-Glo kinase assay. Compound MD59 from all tested inhibitors displays the highest potency towards PI4K II α and there were no significant concurrent inhibition of PI4K III β observed.

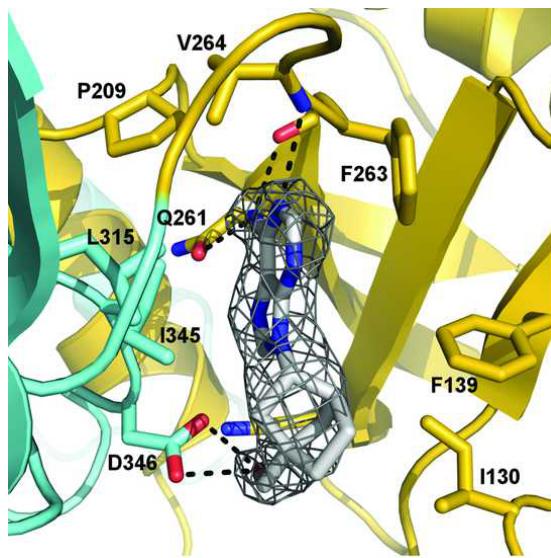


Figure 5.: Detailed view of the ATP binding site of PI4K II α with bound inhibitor MD59 from a series of adenosine analogues.

The protein backbone is depicted in cartoon representation with the N-lobe coloured in yellow and the C-lobe coloured in cyan. MD59 and the side chains of selected residues are shown in stick representation and coloured according to elements: oxygen-red; nitrogen-blue and carbon-grey. The unbiased F_o-F_c map contoured at 3 σ is shown around MD59. Hydrogen bonds between MD59 and amino acids residues are shown as dotted black lines.

4.3 Highly Selective Phosphatidylinositol 4-Kinase III β Inhibitors and Structural Insight into Their Mode of Action

PI4K III β was used for co-crystallization experiments with ATP and a series of archetypical inhibitors. Two obtained crystal structures (see Figure 6.) provided important information to outline the mechanism of their action. Albeit the crystal structures of PI4K III β in complex with ATP or selective inhibitor 49 were solved at 3.5 Å and 3.3 Å resolutions, respectively, the electron density for individual ligands was sufficient enough for their unambiguous placement. The superposition of these two structures revealed the compound 49 occupies the ATP binding site and showed the extent to which the inhibitor induced conformational changes. The imidazole-pyridazine moiety of compound 49

occupies the same position as adenine ring does in the active site and the methoxy group of the inhibitor's aromatic side chain forms a direct hydrogen bond with Lys564 thus displacing Lys⁵⁶⁴ slightly further away from the active site. Overall structural information indicates that compound 49 functions by providing steric interference for the adenine ring in binding to active site and hence inhibiting the lipid phosphorylation reaction. Docking studies with selected inhibitors confirmed the inhibitory mechanism for the whole series of newly designed inhibitors.

Data are included in the following publication:

"Highly Selective Phosphatidylinositol 4-Kinase III β Inhibitors and Structural Insight into Their Mode of Action." Mejdrová I, Chalupská D, Kögler M, Šála M, Plačková P, Baumlova A, Hřebabecký H, Procházková E, Dejmek M, Guillou R, Strunin D, Weber J, Lee G, Birkus G, Mertlíková-Kaiserová H, Boura E and Nencka R. *J Med. Chem.* **58**, 3767–3793 (2015)

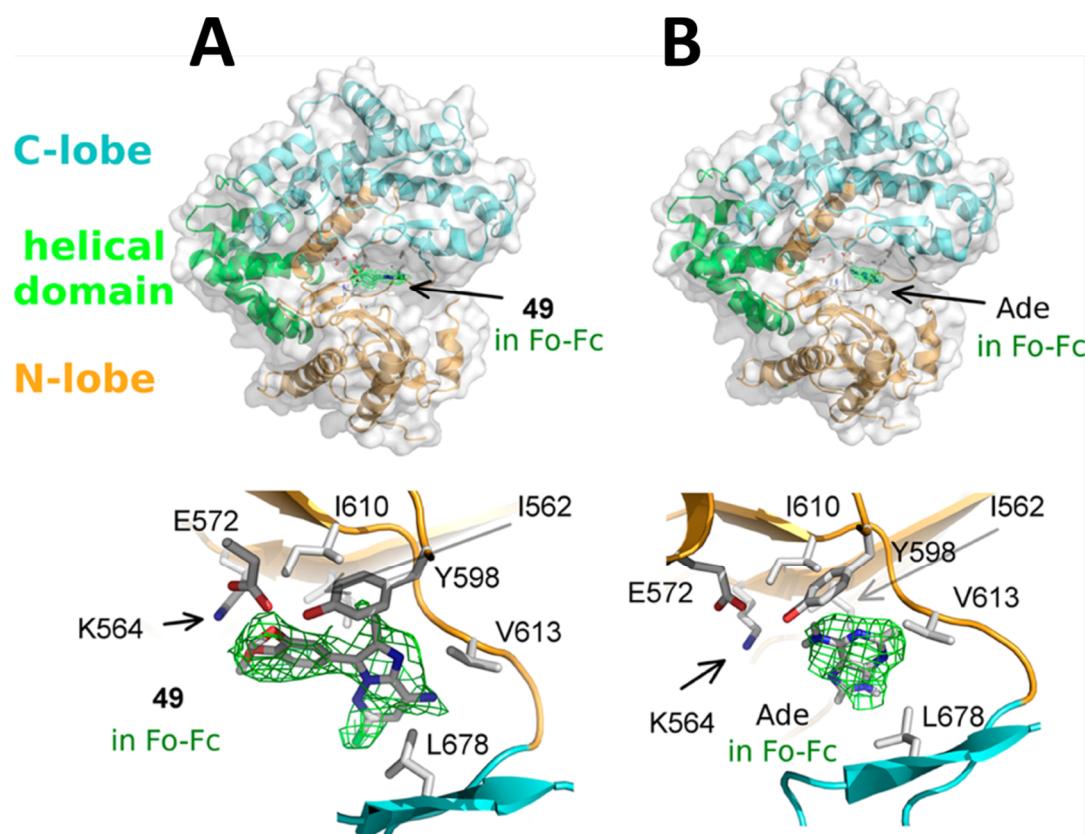


Figure 6.: The crystal structures of inhibitor 49 and ATP bound to PI4K III β .

Panel A: The overall structure of PI4K III β in complex with inhibitor 49 is depicted on top and a detailed view into the ATP binding site with inhibitor 49 is shown on the bottom. The unbiased Fo-Fc map contoured at 2 σ is shown around 49 compound. The protein backbone is depicted in a cartoon representation with the N-lobe coloured in yellow, the C-lobe coloured in cyan and with the helical domain in green. Inhibitor 49 together with ATP and side chains of selected residues are shown in stick representation coloured according

to elements: oxygen-red; nitrogen-blue and carbon in grey. **Panel B:** The overall fold of PI4K III β in complex with an ATP molecule on the top and a detailed view of the binding pocket with an ATP bound molecule on the bottom. The adenine ring of ATP in the unbiased Fo-Fc map is contoured at 2σ .

5 Conclusion

This work significantly contributed to the structural characterisation of type II PI4-kinases, helped elucidate the detailed structural aspects of ligand binding and the role of the unexpected lateral hydrophobic pocket and furthermore, enabled us to outline the mechanism of membrane binding. The juxtaposition of both type II isoforms confirmed an evolutionary conserved non-typical kinase fold and indicated a very similar mode of action and regulation. However, the overall fold does not bear high structural similarity with type III PI4-kinases, instead it is more similar to the fold of Ser/Thr kinases thus indicating the protein kinases as structural relatives. We were not able to obtain crystals with inositol or inositol 1-phosphate bound, however, we were able to use docking and modelling to identify the putative phosphatidylinositol binding pocket.

Additionally, the crystal structures of PI4-kinases in complex with isoform-specific inhibitors provided structural information about the mechanism of inhibition and steric preferences necessary for selective inhibitor binding. The currently available inhibitors of PI4-kinases originate from inhibitors of the PI3-kinases class. Therefore, the structural studies of PI4-kinases either in complex with ATP or inhibitor provided the basis for the design of PI4K-specific inhibitors with potential implications in anti-viral therapy.

6 Zkratky/Abbreviations

ACBD3	acyl-CoA binding domain containing 3 acyl-konezym A vázající doména 3
Arfl	ADP-ribosylation factor 1 ADP-ribosylační faktor 1
BSA	bovine serum albumin hovězí sérový albumin
CERT	ceramide transfer protein ceramid přenášející protein
DTT	dithiothreitol dithiotreitol
EGF	epidermal growth factor epidermální růstový faktor
ER	endoplasmic reticulum endoplazmatické retikulum
FAPP2	four-phosphate adaptor protein 2 čtyř-fosfátový adaptorový protein 2
GB1	immunoglobulin binding protein from G Streptococcal bacteria imunoglobulín vázající protein ze Streptokokové bakterie typu G
GBA	β -glucocerebrosidase β -glukocerebrosidáza
GBF1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor Golgi-specifický brefeldin A-rezistetní guanidin nukleotid vyměňující faktor
GLTP	glycolipid transfer protein glykolipid přenášející protein
GST	glutathione S-transferase glutathion S-transferáza
HCV	Hepatitis C virus Hepatitída typu C
Ins(1,4,5)P3	inositol (1,4,5) trisphosphate inositol (1,4,5) trifosfát
LIMP-2	lysosomal integral membrane protein type 2 lysozomální integrální membránový protein typu 2
MD simulations	molecular dynamic simulations molekulární dynamické simulace
MR-SAD	molecular replacement in combination with single wavelength anomalous dispersion molekulární nahrazení v kombinaci s anomálním rozptylem

ORPL	OSBP-related protein like protein podobný oxysterol-vázajícímu proteinu
OSBP	oxysterol-binding protein oxysterol-vázající protein
PH domain	pleckstrin homology domain pleckstrin homologní doména
PI4K	phosphatidylinositol 4-kinases fosfatidylinositol 4-kinázy
PM	plasma membrane plazmatická membrána
PtdIns4P	phosphatidylinositol 4-phosphate fosfatidylinositol 4-fosfát
SDS-PAGE	polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate polyakrylamidový gél v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SidC	synonym to interaptin synonymum k názvu interaptin
SidM	synonym to DrrA, Defect in Rab1 recruitment protein A synonymum k DrrA, defekt ve Rab1 vázajícím proteinu A
SM	sphingomyelin sfingomyelín
TEV	Tobacco Etch Virus virus tabákové mozaiky
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
Wnt	results from a fusion of the name of the <i>Drosophila</i> segment polarity gene <i>wingless</i> and the name of the vertebrate homolog, <i>integrated</i> or <i>int-1</i> vznikl kombinací dvou názvů: <i>wingless</i> (bezkřídlý), gen segmentu polarity u <i>Drosophila</i> ; <i>integrated</i> (integrováný), homologní protein u obratlovců
+RNA	plus sense single strand RNA pozitivní jednovláknová RNA

7 Použitá literatura/References

1. Micheva KD (2001) Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-biphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol* **154**: 355–368.
2. Holz RW, Hlubek MD, Sorensen SD, Fisher SK, Balla T, Ozaki S, Prestwich GD, Stuenkel EL, Bittner MA (2000) A Pleckstrin Homology Domain Specific for Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) and Fused to Green Fluorescent Protein Identifies Plasma Membrane PtdIns-4,5-P₂ as Being Important in Exocytosis. *J Biol Chem* **275**: 17878–17885.
3. Ellson CD, Anderson KE, Morgan G, Chilvers ER, Lipp P, Stephens LR, Hawkins PT (2001) Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr Biol CB* **11**: 1631–1635.
4. Burd CG, Emr SD (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* **2**: 157–162.
5. Balla T, Varnai P (2002) Visualizing Cellular Phosphoinositide Pools with GFP-Fused Protein-Modules. *Sci Signal* **2002**: pl3–pl3.
6. Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Curr Biol* **12**: 695–704.
7. Shisheva A, Rusin B, Ikonomov OC, DeMarco C, Sbrissa D (2001) Localization and insulin-regulated relocation of phosphoinositide 5-kinase PIKfyve in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **276**: 11859–11869.
8. Krauß M, Haucke V (2007) Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett* **581**: 2105–2111.
9. Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem* **281**: 30279–30288.
10. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**: 803–809.
11. D'Angelo G, Polishchuk E, Di Tullio G, Santoro M, Di Campli A, Godi A, West G, Bielawski J, Chuang C-C, van der Spoel AC, et al. (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* **449**: 62–67.
12. Raychaudhuri S, Im YJ, Hurley JH, Prinz WA (2006) Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J Cell Biol* **173**: 107–119.
13. Ngo M, Ridgway ND (2009) Oxysterol binding protein-related Protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol Biol Cell* **20**: 1388–1399.
14. Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol CB* **8**: 1399–1402.
15. Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, et al. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**: 179–188.
16. Hill E, van Der Kaay J, Downes CP, Smythe E (2001) The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J Cell Biol* **152**: 309–323.
17. Takasuga S, Sasaki T (2013) Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: metabolism and physiological functions. *J Biochem (Tokyo)* **154**: 211–218.

18. Ketel K, Krauss M, Nicot A-S, Puchkov D, Wieffer M, Müller R, Subramanian D, Schultz C, Laporte J, Haucke V (2016) A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* **529**: 408–412.
19. Kagan JC, Roy CR (2002) Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**: 945–954.
20. Luo X, Wasilko DJ, Liu Y, Sun J, Wu X, Luo Z-Q, Mao Y (2015) Structure of the Legionella Virulence Factor, SidC Reveals a Unique PI(4)P-Specific Binding Domain Essential for Its Targeting to the Bacterial Phagosome. *PLoS Pathog* **11**: e1004965.
21. Balla T (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev* **93**: 1019–1137.
22. Wong K, Meyers ddR null, Cantley LC (1997) Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *J Biol Chem* **272**: 13236–13241.
23. Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di Tullio G, Iurisci C, Luini A, Corda D, De Matteis MA (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **1**: 280–287.
24. Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T (2008) Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell* **19**: 711–721.
25. Balla A, Tuymetova G, Tsionenko A, Várnai P, Balla T (2005) A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* **16**: 1282–1295.
26. Wei YJ, Sun HQ, Yamamoto M, Wlodarski P, Kunii K, Martinez M, Barylko B, Albanesi JP, Yin HL (2002) Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J Biol Chem* **277**: 46586–46593.
27. Kakuk A, Friedländer E, Vereb G, Kása A, Balla A, Balla T, Heilmeyer LMG, Gergely P, Vereb G (2006) Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* **69**: 1174–1183.
28. Balla A, Balla T (2006) Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* **16**: 351–361.
29. Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T (2009) CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 684–691.
30. Wang J, Sun H-Q, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL (2007) PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* **18**: 2646–2655.
31. Minogue S, Waugh MG, De Matteis MA, Stephens DJ, Berditchevski F, Hsuan JJ (2006) Phosphatidylinositol 4-kinase is required for endosomal trafficking and degradation of the EGF receptor. *J Cell Sci* **119**: 571–581.
32. Salazar G, Craige B, Wainer BH, Guo J, De Camilli P, Faundez V (2005) Phosphatidylinositol-4-kinase type II alpha is a component of adaptor protein-3-derived vesicles. *Mol Biol Cell* **16**: 3692–3704.
33. Mössinger J, Wieffer M, Krause E, Freund C, Gerth F, Krauss M, Haucke V (2012) Phosphatidylinositol 4-kinase IIα function at endosomes is regulated by the ubiquitin ligase Itch. *EMBO Rep* **13**: 1087–1094.

34. Jović M, Kean MJ, Szentpetery Z, Polevoy G, Gingras A-C, Brill JA, Balla T (2012) Two phosphatidylinositol 4-kinases control lysosomal delivery of the Gaucher disease enzyme, β -glucocerebrosidase. *Mol Biol Cell* **23**: 1533–1545.
35. Hsu N-Y, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen Y-H, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, et al. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**: 799–811.
36. Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K (2012) ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites: Picornaviral protein/ACBD3/PI4KB complex. *EMBO J* **31**: 754–766.
37. Greninger AL, Knudsen GM, Betegon M, Burlingame AL, Derisi JL (2012) The 3A protein from multiple picornaviruses utilizes the golgi adaptor protein ACBD3 to recruit PI4KIII β . *J Virol* **86**: 3605–3616.
38. Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H (2011) Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliovirus activity. *J Virol* **85**: 2364–2372.
39. Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L (2005) Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**: 139–173.
40. Miller S, Krijnse-Locker J (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**: 363–374.
41. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V (2005) Quantitative Analysis of the Hepatitis C Virus Replication Complex. *J Virol* **79**: 13594–13605.
42. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**: 5974–5984.
43. Altan-Bonnet N, Sougrat R, Lippincott-Schwartz J (2004) Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 364–372.
44. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet M-S, et al. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**: 32–45.
45. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G (2011) Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol* **85**: 8870–8883.
46. Klima M, Tóth DJ, Hexnerova R, Baumlova A, Chalupska D, Tykvert J, Rezabkova L, Sengupta N, Man P, Dubankova A, et al. (2016) Structural insights and in vitro reconstitution of membrane targeting and activation of human PI4KB by the ACBD3 protein. *Sci Rep* **6**: 23641.
47. Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikebara Y (2001) Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* **276**: 45298–45306.
48. Lanke KHW, van der Schaar HM, Belov GA, Feng Q, Duijsings D, Jackson CL, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJM (2009) GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* **83**: 11940–11949.
49. Belov GA, Altan-Bonnet N, Kovtunovich G, Jackson CL, Lippincott-Schwartz J, Ehrenfeld E (2007) Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J Virol* **81**: 558–567.
50. Delang L, Paeshuyse J, Neyts J (2012) The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochem Pharmacol* **84**: 1400–1408.

51. Tai AW, Bojjireddy N, Balla T (2011) A homogeneous and nonisotopic assay for phosphatidylinositol 4-kinases. *Anal Biochem* **417**: 97–102.
52. Sethy VH, Heier RF, Moon MW (1991) alpha-Methyl analogues of acetylenic amines as striatal muscarinic antagonists. *J Pharm Pharmacol* **43**: 670–671.
53. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125–132.
54. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**: 658–674.
55. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczki G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213–221.
56. Cowtan K (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 1002–1011.
57. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 235–242.
58. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**: 352–367.
59. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126–2132.
60. Schrödinger, LCC (2010) *The PyMOL Molecular Graphics System*.
61. Zhou Q, Li J, Yu H, Zhai Y, Gao Z, Liu Y, Pang X, Zhang L, Schulten K, Sun F, et al. (2014) Molecular insights into the membrane-associated phosphatidylinositol 4-kinase II α . *Nat Commun* **5**: 3552.

Education

Charles University in Prague, Faculty of Science

Since 2012: Ph.D. in Physical Chemistry

Dissertation thesis: "The structural characterisation of PI4-kinases" under supervision of Dr. Evžen Bouřa, elaborated at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

final examination: Physical chemistry

2012-2010: MSc. in Biochemistry

Masters diploma thesis: "Expression and characterisation of homologues of human Glutamate Carboxypeptidase II" under supervision of Dr. Jan Konvalinka, elaborated at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

final examination: Biochemistry

Molecular biology

Biophysical chemistry

Methodology

2010-2007: BSc. in Biochemistry

Bachelor diploma thesis: "Preparation, expression and purification of mouse GCP III" under supervision of Dr. Jan Konvalinka, elaborated at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

final examination: Biochemistry

Organic chemistry

Inorganic chemistry

Physical chemistry

Courses and conferences:

- Macromolecular Crystallography School (Madrid, 2016 -accepted)
- 10th European Biophysics Congress- received EBSA Congress Bursaries (Dresden, 2015)
- PSDI 2014 PROTEIN STRUCTURE DETERMINATION IN INDUSTRY (Lisbon, 2014)
- XII Discussions in Structural Molecular Biology (Nové Hrady, 2014)
- XIV MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ, Czech conference (Milovy, Czech Republic, 2014)
- XI Discussions in Structural Molecular Biology (Nové Hrady, 2013)

Certificates:

Cambridge First Certificate in English (FCE certificate), level B2

List of publications

Structural insights and in vitro reconstitution of membrane targeting and activation of human PI4KB by the ACBD3 protein. Klima M, Tóth DJ, Hexnerova R, Baumlova A, Chalupska D, Tykvert J, Rezabkova L, Sengupta N, Man P, Dubankova A, Humpolickova J, Nencka R, Veverka V, Balla T, Boura E. **Sci Rep.** 2016, 6; doi: 10.1038/srep23641.

The high-resolution crystal structure of phosphatidylinositol 4-kinase II β and the crystal structure of phosphatidylinositol 4-kinase II α containing a nucleoside analogue provide a structural basis for isoform-specific inhibitor design. Klima M, Baumlova A, Chalupska D, Hřebábecký H, Dejmek M, Nencka R, Boura E. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** 2015, 71: 1555-63; doi: 10.1107/S1399004715009505

Highly Selective Phosphatidylinositol 4-Kinase III β Inhibitors and Structural Insight into Their Mode of Action. Mejdrová I, Chalupská D, Köglér M, Šála M, Plačková P, Baumlová A, Hřebábecký H, Procházková E, Dejmek M, Guillou R, Strunin D, Weber J, Lee G, Birkus G, Mertlíková-Kaiserová H, Boura E, Nencka R. **J Med Chem.** 2015, 59(9): 3767-93; doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00499

The crystal structure of the phosphatidylinositol 4-kinase II α . Baumlova A, Chalupska D, Rózycki B, Jovic M, Wisniewski E, Klima M, Dubankova A, Kloer DP, Nencka R, Balla T, Boura E. **EMBO Rep.** 2014; 15(10): 1085-92; doi: 10.15252/embr.201438841