

ABSTRAKT

Protein LEDGF/p75 je lidský transkripční koaktivátor, který je asociován s epigenetickými modifikacemi transkripčně aktivního chromatinu. Je také nezbytný v procesu integrace HIV do genomu hostitelské buňky a v leukemogenezi způsobené fúzními produkty genu kódujícího protein MLL1. Interakce proteinu LEDGF/p75 s HIV integrázou a komplexem MLL1–menin jsou považovány za potenciální cíl terapeutického zásahu. Interakce proteinu LEDGF/p75 s HIV integrázou i MLL1 jsou zprostředkovány tzv. integrázu vážící doménou (IBD – integrase binding domain).

Zatímco patofyziologické interakce IBD LEDGF/p75 byly intenzivně studovány, těm fyziologickým byla věnována malá pozornost. Mimo HIV integrázy a MLL1 interaguje LEDGF/p75 skrze IBD také s proteiny JPO2, PogZ, ASK a MLL2. Jelikož se interakce IBD s HIV integrázou stala cílem pro vývoj inhibitorů, bylo nutné získat informace o ostatních interakcích této domény. Jen díky detailní charakterizaci všech interakcí IBD je možné zajistit specifické cílení vyvíjených inhibitorů.

Proteinový komplex IBD–MLL1–menin byl již dříve strukturně charakterizován, ale pouze částečně. Pomocí NMR spektroskopie se nám podařilo zmapovat novou interakční oblast komplexu IBD–MLL1. Toto navazující interakční rozhraní je schopné zajistit interakci IBD s MLL1 i bez přítomnosti meninu, která byla považována za nezbytnou. Testování primárních leukemických buněk na schopnost tvořit kolonie odhalilo nezbytnost tohoto interakčního rozhraní v leukemické transformaci. Toto rozhraní na straně IBD se navíc překrývá s vazebnou oblastí HIV integrázy.

Naše analýzy odhalily strukturní detaily interakcí LEDGF/p75 s dalšími fyziologickými vazebnými partnery. Interakce s IBD jsou zprostředkovány vnitřně neuspořádaným vazebným motivem (IBM – IBD-binding motif), který je přítomen ve všech fyziologických vazebných partnerech. Důležitost tohoto motivu pro interakce s IBD byla ověřena pomocí mutačních analýz. Byly také vyřešeny dvě struktury komplexů IBD–IBM. Srovnáním dostupných strukturních informací jsme vysvětlili, proč má HIV integráza řádově vyšší afinitu vůči LEDGF/p75 než buněčné proteiny.

Díky znalosti IBM jsme zjistili, že protein IWS1 je dalším interakčním partnerem LEDGF/p75. IWS1 je lidský transkripční faktor, který hraje klíčovou roli ve složení elongačního komplexu RNA polymerázy II. IWS1 také interaguje s methyltransferázou Hypb/Set2, která methyluje lysin 36 histonu 3, čímž vytváří epigenetickou značku charakteristickou pro transkripčně aktivní chromatin. Tato epigenetická značka je pak rozpoznávána PWWP doménou proteinu LEDGF/p75.

Detailní charakterizace odhalila značný překryv interakčních rozhraní na IBD. Velká část těchto rozhraní je společná pro všechny interakční partnery IBD LEDGF/p75 včetně HIV integrázy a jednotlivé interakce se vzájemně vylučují. Tento překryv představuje komplikaci pro vývoj selektivních inhibitorů interakcí s IBD. Určitou výjimku v tomto směru představuje MLL1, který navíc využívá interakci s jinou částí IBD závislou na přítomnosti meninu, což by mohlo umožnit vývoj specifických inhibitorů.