

## **Oponentský posudek**

### **na doktorskou disertační práci Mgr. Petra Těšiny nazvanou: „Strukturní studie interakcí proteinu LEDGF/p75“**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Petra Štětiny je zaměřena na studium struktury transkripčního koaktivátoru LEDGF/p75, který je spojen s epigenetickými změnami transkripčně aktivního chromatinu. Tento protein je také klíčový pro integraci viru HIV a rozvoj leukémie způsobené fúzními produkty genu MLL1. Proto je LEDGF/p75 zajímavým cílem případných terapeutických zásahů. Nicméně prvním předpokladem pro vývoj látek, které by interferovaly s interakcemi cílového proteinu, je důkladná znalost těchto interakcí. A právě na jejich studium byl zaměřen PhD projekt Mgr. P. Těšiny. Protein LEDGF/p75 prostřednictvím své IBD (integrase binding domain) domény interaguje s řadou dalších proteinů včetně JPO2, PogZ, ASK či MLL2. Cílem předložené práce byla detailní strukturní charakterizace fyziologických interakcí IBD domény proteinu LEDGF/p75 zejména pomocí metod NMR a jejich porovnání s dostupnými strukturami komplexu IBD a HIV integrasy.

První část dizertační práce Mgr. P. Těšiny je věnována mapování interakcí mezi LEDGF/p75 IBD a peptidy reprezentujícími různé oblasti proteinu MLL1. Tyto experimenty vedly k identifikaci dvou oblastí na povrchu IBD, které jsou vazebnými místy pro studované peptidy MLL1. Techniky NMR spektroskopie byly dále použity k vyřešení 3D struktury komplexu IBD s peptidem MLL1 140-160, která objasnila klíčovou úlohu dvou fenylalaninových zbytků (F148 a F151) pro vazbu tohoto segmentu MLL1 na IBD. Význam těchto reziduí pro interakci MLL1 s IBD byl následně potvrzen pomocí cílené mutagenese.

Druhá část práce se věnuje studiu interakcí LEDGF/p75 IBD s proteiny JPO2 a PogZ. Pro studium interakcí s JPO2 byl použit N-terminální fragment 1-130, který byl charakterizován jako inherentně nestrukturovaný protein. Pro studium vazby PogZ byl použit fragment se sekvencí 1117-1410, u kterého biofyzikální charakterizace pomocí CD spektroskopie, DSF, SEC a NMR ukázala, že se jedná o dobře strukturovaný protein, který v roztoku vytváří dimery. Vazebné interakce JPO2 1-130 a PogZ 1117-1410 s IBD byly dále charakterizovány pomocí ITC titrací, které ukázaly, že oba proteiny váží IBD s mikromolární vazebnou afinitou. Následně byly tyto komplexy studovány pomocí metod NMR. Výsledkem je identifikace nejen oblastí IBD, které jsou odpovědné za interakci s JPO2 a PogZ, ale i IBD vazebných povrchů v molekulách JPO2 a PogZ. Tyto experimenty ukázaly značnou podobnost těchto vazebných rozhraní, zvláště pak přítomnost společného motivu osmi aminokyselin, který byl autory nazván jako IBD-interakční motiv (tzv. IBM). Relevance

tohoto motivu pak byla potvrzena pomocí cílené mutagenese. Vazebné rozhraní komplexu IBD:PogZ bylo dále detailně charakterizováno vyřešením 3D struktury tohoto komplexu. Identifikace IBM motivu byla následně využita k hledání dalších potenciálních vazebných partnerů LEDGF/p75 IBD. Jedním z identifikovaných proteinů je transkripční faktor IWS1. Příslušná oblast IWS1 byla připravena a byla provedena biofyzikální charakterizace tohoto konstruktu. Ta ukázala, že se opět jedná o IDP, který interaguje s IBD s mikromolární afinitou. Vazebné místo IBD odpovědné za interakci s IWS1 bylo charakterizováno pomocí NMR spektroskopie.

V poslední části PhD práce se Mgr. P. Těšina věnoval porovnání získaných IBD vazebných povrchů s daty dostupnými pro komplex IBD s HIV integrasou. Tato srovnání spolu s mutační analýzou ukázala, že LEDGF/p75 IBD využívá velmi podobný vazebný povrch pro interakci se všemi svými vazebnými partnery. Tento povrch zahrnuje jednu z hydrofobních kapes a dále pak kladně nabitou oblast důležitou pro elektrostatické kontakty.

Disertační práce Mgr. P. Těšiny je psána standardní formou a obsahuje úvod do studované problematiky, cíle práce, popis výsledků, diskusi, závěry 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 minimální. Předložená disertační práce ukazuje, že Mgr. P. Těšina získal zkušenosti v celé šíři strukturní biologie a seznámil se s řadou klíčových technik včetně studia struktury proteinů metodami NMR a metod pro biofyzikální charakterizaci proteinů a jejich interakcí včetně ITC, DSF či CD. Výsledky práce byly publikovány ve dvou publikacích v prestižních mezinárodních časopisech s vysokým IF. Na jedné z těchto prací je Mgr. P. Těšina prvním autorem (práce otištěná v časopise Nature Commun.). Mgr. P. Těšina je pak dále ještě spoluautorem další publikace, která nesouvisí s podanou PhD prací.

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

1. Pro studium interakcí IBD s vazebnými partnery jste používal ITC. Tyto výsledky jsou v práci prezentovány formou obrázků znázorňujících reprezentativní titraci s příslušným fitem a s uvedením vypočtené hodnoty disociační konstanty a vazebné stechiometrie. ITC však také poskytuje informaci o vazebné entalpii a vazebné entropii. Proč tyto údaje nejsou součástí práce?
2. Mohl byste blížeji vysvětlit princip metody AlphaScreen? Jaké jsou její výhody oproti metodám SPR či MST?
3. Byly identifikovány nějaké posttranslační modifikace LEDGF/p75 IBD (např. fosforylace)? Pokud ano, mohly by tyto modifikace mít vliv na vazebné interakce IBD?
4. Jaká je hodnota disociační konstanty komplexu IBD:HIV IN? Je srovnatelná s afinitami získanými pro vámi studované komplexy?

5. Všechny studované vazebné interakce IBD s vazebnými partnery měly  $K_D$  v  $\mu\text{M}$  oblasti, tedy jednalo se o transientní protein-proteinové interakce. Můžete komentovat, v čem spočívá výhoda takto slabých interakcí v kontextu známých funkcí LEDGF/p75?

**Závěrem konstatuji:**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Petra Těšiny představuje cenný přínos ke studiu interakcí LEDGF/p75 s jeho vazebnými partnery. Získaná data o vazebných rozhraních mohou být použita pro vývoj látek, které by s těmito protein-proteinovými interakcemi interferovali. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v prestižních mezinárodních časopisech s IF. Autor ve své disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

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

V Praze 19. ledna 2016

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