

AZ LC8 DINEIN KÖNNYŰLÁNC KÖTŐMOTÍVUMÁNAK JELLEMZÉSE ÉS ÚJ KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREK JÓSLÁSA IRÁNYÍTOTT EVOLÚCIÓ SEGÍTSÉGÉVEL

Rapali Péter¹, Radnai László¹, Süveges Dániel¹, Harmat Veronika^{2,4}, Weixiao Y. Wahlgren³, Katona Gergely³, Nyitray László¹ és Pál Gábor¹

¹Biokémiai Tanszék és ²Kémiai Intézet, Eötvös Loránd Tudományegyetem,

³Department of Chemistry, University of Gothenburg, Svédország;

⁴MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

Összefoglalás

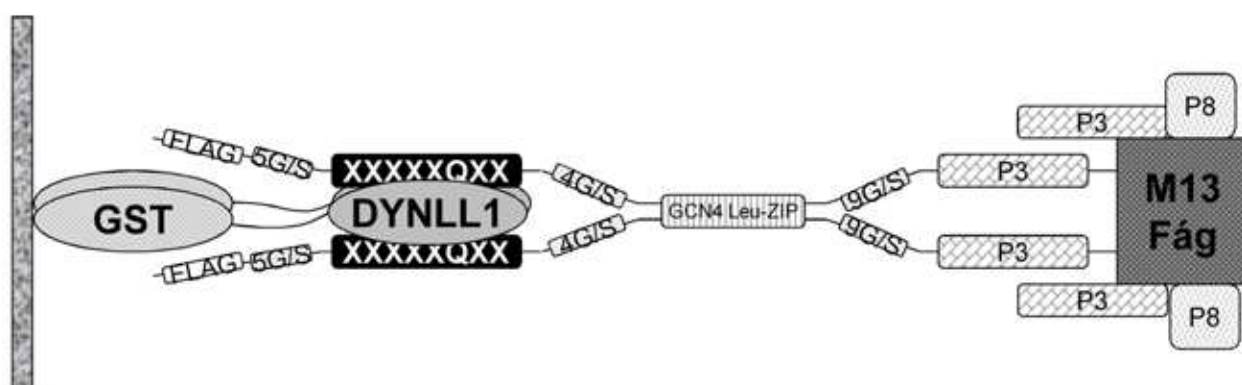
Az LC8 dinein könnyűlánc (DYNLL) egy erősen konzervatív homodimer eukarióta csomóponti fehérje. Több tucat különböző fehérjét képes megkötni egy rövid lineáris motívumon keresztül. Fő funkciója, hogy az interakció során a partnereit „molekuláris ragasztóként” dimerizálja és stabilizálja, ezáltal a működésüket szabályozza. Munkánk során egy nagy áteresztőképességű *in vitro* irányított evolúciós módszer, a fág-bemutató segítségével jellemeztük a DYNLL-kötő lineáris motívumot. A kötése erősségre szelektálva, az eddig ismert legerősebben kötődő motívumnál 20-szor nagyobb affinitású peptidet sikerült előállítanunk, amelynek dimerizált (bivalens) változata, az aviditás hatás révén, szubnanomólos disszociációs állandóval rendelkezik. A DYNLL és a Leu- cipzárral dimerizált szelektált konszenzus peptid komplexének kristályszerkezete részben magyarázatot ad a megnövekedett affinitásra. A szelektált szekvencia-mintázatból kiindulva legalább 100 új DYNLL kölcsönható partnert jósolunk. A legnagyobb biztonsággal prediktált fehérjéről, az EML3-ról igazoltuk, hogy valóban kötődik a DYNLL-hez. A nagy affinitású dimerizált peptid a DYNLL kompetitív gátlószereként használható, ezért terápiás célú fejlesztések kiindulópontja is lehet.

A legtöbb sejtbiológiai folyamat molekuláris szintű működése és szabályozása fehérje-fehérje kapcsolatok szintjén valósul meg. A fehérje-fehérje kapcsolatok skála-független hálózatot alkotnak, amelynek egyik fő jellemzője a nagy fokszámú csomóponti fehérjék (*hub proteins*) jelenléte. A csomóponti fehérjék működésének megismerése, a fehérje-fehérje interakciós hálózat egyes gráfjainak megtalálása és jellemzése elengedhetetlen a biológiai folyamatok molekuláris szintű megértéséhez, illetve új gyógyszer-célpont-fehérjék azonosításához.

Az ELTE Biokémiai Tanszék nagy hagyományokkal rendelkezik a motorfehérjék, ezen belül is a miozin kutatása terén. Egy korábbi munkánkban azonosítottuk a miozin 5a motorfehérjében az eredetileg dinein motorfehérje alegységeként leírt LC8 dinein könnyűlánc (DYNLL) kötőmotívumát [1]. A DYNLL egy 89 aminosavból álló, konzervált, eukarióta csomóponti fehérje, amelyről korábban azt feltételezték, hogy egyfajta adapterként a dinein, illetve a miozin 5a motorfehérjéhez kapcsolja az ezek által szállított komponenseket, az ún. kargókat [2]. Később kiderült, hogy a DYNLL nagyobb része nem motorfehérjéhez asszociált formában található a citoplazmában, hanem több tucat egyéb fehérjéhez is kötődik, és ezáltal szabályozza is a működésüket [3]. Partnerei olyan eltérő sejt-

folyamatokban játszanak szerepet, mint pl. az apoptózis (Bmf és Bim) [4,5], a sejtmagi transzport (pl. NUP159) [6], a transzkripció (pl. NRF-1) [7] és a DNS hibajavítás (pl. P53BP1) [8]. A DYNLL egy β -lánc kicserélődés által stabilizált homodimer fehérje [9-14]. A dimerizációs felszínen két, párhuzamos kötőárok alakul ki. Ezekbe illeszkednek – a DYNLL központi β -lemezét mintegy kiterjesztve – a partnerfehérjék lineáris peptidjei. A természetből ismert kötőszekvenciák alapján a következő motívum-mintázat rajzolódott ki: $[D/S]_{-4}K_{-3}X_{-2}[T/V/I]_{-1}Q_0[T/V]_1[D/E]_2$ [15-16]. A kötőpeptidek a partnerek rendezetlen régióiban találhatóak, és ezeket gyakran *coiled-coil* vagy valamilyen más dimerizációra képes domén határolja [1,3,17]. A partnerek dimer jellege és a homodimer DYNLL két parallel kötőárka lehetővé teszi dimer-dimer komplexek kialakulását. Az ilyenkor fellépő aviditás következtében a dimer kötőmotívumok a monomerek affinitásánál ($750 < K_d < 40.000$ nM) akár 200-szor erősebben kötődnek [18].

A csomóponti fehérjék esetében a kísérletesen (például élesztő két-hibrid módszerrel és/vagy immunprecipitációval) azonosított kötőpartnerek és kötőmotívumok gyakran csak egy kis részét reprezentálják a természetben létező kölcsönhatási hálózatnak, és az evolúció során gyakran nem a termodinamikailag optimális motívumok szelektálódnak. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a lineáris DYNLL-kötőmotívum egyes pozícióinak termodinamikailag optimális aminosav preferenciáját. Egy nyolc aminosavas lineáris motívum összes, 20^8 változatának előállítása és jellemzése tradicionális klónozási és mérési technikákkal természetesen beláthatatlan feladat lett volna. Az egyedi mutánsok előállítása helyett egy kombinatorikus mutagenézisen alapuló, nagy áteresztőképességű, irányított evolúciós módszert alkalmaztunk. Ez a fág-bemutató, amit a *Bio-kémia* folyóirat egy korábbi számában Pál Gábor ismertetett [19]. A kötőmotívum legkonzerváltabb pozícióját (0. pozíció, Gln) rögzítettük, míg hét pozícióban megengedtük mind a 20 aminosav előfordulását, ami 20^7 , azaz $1,28 \times 10^9$ peptid variánst eredményez. A létrehozott $X_{-5}X_{-4}X_{-3}X_{-2}X_{-1}Q_0X_1X_2$ sémájú könyvtárunk

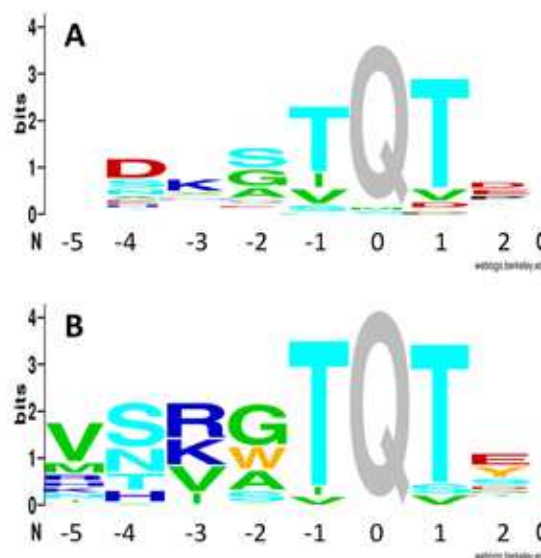


1. ábra. Az XXXXXQXX szekvenciájú peptidkönyvtár bivalens fág bemutatásának sematikus ábrája.

$2,1 \times 10^{10}$ egyedi klónt tartalmazott. A könyvtárat Leu-cipzár segítségével bivalens módon mutattuk be M13 bakteriofág felszínén (1. ábra). A bivalens formátum a természetes partnerek dimer jellegét utánozza, és növeli a könyvtártagok affinitását. A szelekció során immobilizált GST-fúzionált DYNLL-t használtunk. A fágokat kötőerősségre szelektáltuk, azaz minden szelekciós kör után a GST-

DYNLL-t tartalmazó felszínről a nem kötődő fágokat lemostuk, a kötődőket pedig *E. coli* baktériumban újra felszaporítottuk. Három szelekciós kör után 25 egyedi klónt azonosítottunk. Ezek elemzésével meghatároztuk az egyes kötőmotívum pozíciókban az aminosavak előfordulási gyakoriságát, tehát a kötőerősítésre szelektált motívum mintázatát. Ez a mintázat hasonlít a természetből korábban már ismert 41 kötőpartner elemzéséből meghatározott mintázathoz (2. ábra).

A motívum amino-terminálisánál azonban lényeges eltéréseket figyeltünk meg. A szelektált szekvenciákban a -4-es pozícióban nem jelenik meg a természetes kötőszekvenciákban itt leggyakoribb aminosav, az aszparaginsav. A szelektált szekvenciákban itt a szerin a leggyakoribb, ami a természetből eddig ismert kötőmotívumokban a második leggyakoribb aminosav. Kristályszerkezetekből tudjuk, hogy mind a szerin, mind pedig az aszparaginsav képes kialakítani ugyanazt a hidrogénhidat a DYNLL 65-ös tirozin oldalláncával. A természetben itt előforduló, a kötés szempontjából nem optimális aszparaginsav még nem ismert szabályozási folyamat(ok)ban játszhat szerepet. A másik szembetűnő különbség, hogy a természetben nem konzervált -5-ös pozíció az irányított evolúció során nagymértékben konzerválódott. A szelektált aminosavak teljesen vagy részlegesen hidrofób karakterűek. A leggyakoribb aminosav itt a valin.



2. ábra. A természetből ismert 41 (A) és a fág szelekció során azonosított 25 kötőmotívum (B) mintázatának LOGO ábrázolása. A két mintázat közötti legnagyobb eltérések a -4-es és a -5-ös pozíciókban találhatóak.

1. táblázat. A szelektált konszenzus peptidek kötésének termodinamikai paraméterei

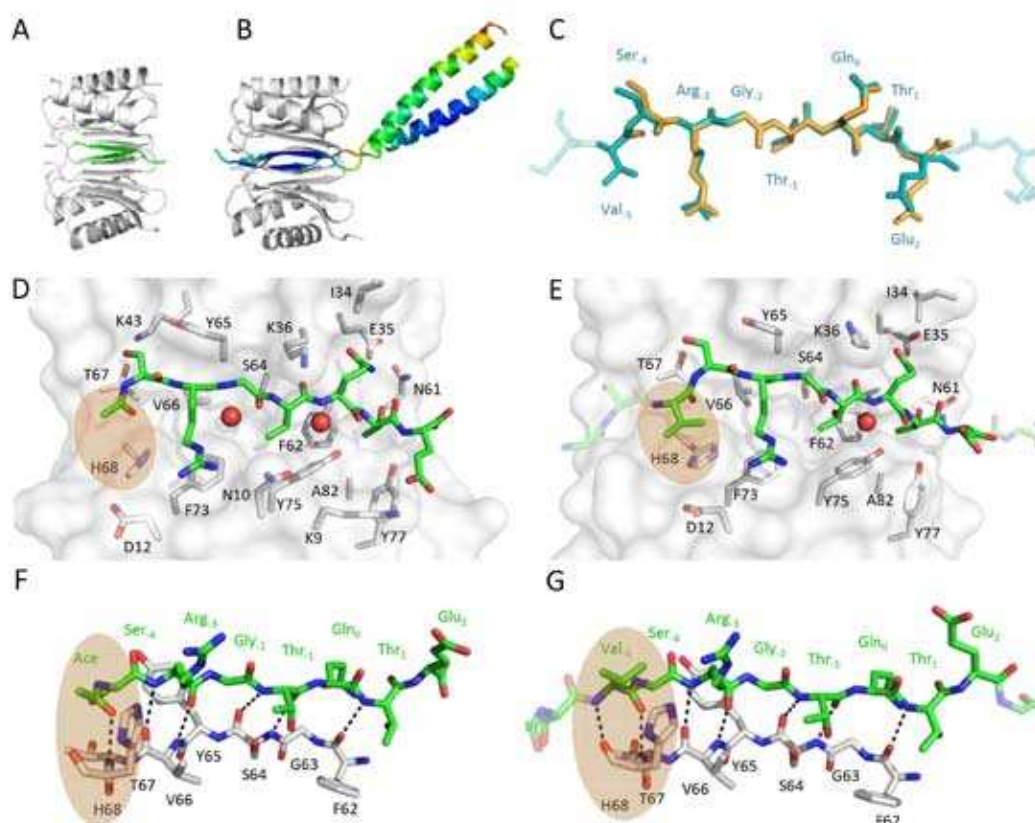
Minta	K_d (μM)	ΔH (kJ mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kJ mol^{-1})
Ac-SRGTQTE	15,2	-48,6	21,0
Ac-GSRGTQTE	1,64	-69,7	36,5
Ac-VSRGTQTE	0,08	-75,6	35,0
dimer-GSGSRGTQTE	< 0,003*	-69,6	< 20,6
dimer-GSVSRGTQTE	< 0,007*	-64,9	< 17,6
EML3 (8-94)	0,05	-32,4	9,47

* A kötőerősség eléri az ITC módszer megbízhatósági határát.
Ac : N-acetilált minták

Izotermikus titrációs kalorimetria (ITC) segítségével szintetikus monomer

peptideken meghatároztuk a DYNLL kötés termodinamikai paramétereit a szelektált konszenzus szekvencia ($V_{-5}S_{-4}R_{-3}G_{-2}T_{-1}Q_0T_1E_2$), valamint ennek két variánsa esetében (1. táblázat). Ez utóbbiak a -5-ös pozícióban valin helyett glicint, illetve acetyl-csoportot tartalmaztak. A glicint tartalmazó peptid ~ 10 -szer erősebben kötődött, mint a -5-ös pozícióban acetátot tartalmazó variáns. A glicinhez képest a valin további 20-szoros affinitás növekedést eredményezett. Ennek a variánsnak a DYNLL-kötő affinitása ($K_d = 84$ nM) ~ 10 -szer nagyobb, mint a természetből korábban ismert legerősebb DYNLL-kötő motívumé [18]. A leucin-cipzárral dimerizált szelektált konszenzus peptid szubnanomólos disszociációs állandóval kötődik.

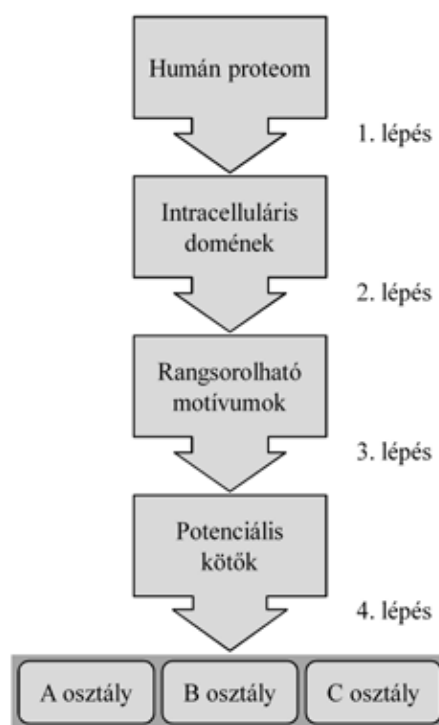
Meghatároztuk a DYNLL és a monomer Ac-SRGTQTE peptid (1,31 Å felbontás), valamint a DYNLL és a leucin-cipzár által dimerizált VSRGTQTE peptid komplexének (2,9 Å felbontás) kristályszerkezetét (3. ábra). A két szerkezet összehasonlítása részben magyarázatot ad az ITC mérésekből kapott eredményekre. A -5-ös pozíciónak mind a főlánc, mind pedig a valin oldallánc hozzájárul a kötés kialakításához (3. ábra). A -5-ös pozíció főlánc két hidrogénhíd kialakításával stabilizálja a kialakuló β -redőt, míg a Val₋₅ oldallánc a DYNLL2 kötőfelületén egy sekély hidrofób zsebben helyezkedik el, és kölcsönhatásba lép a DYNLL His₆₈ oldalláncával.



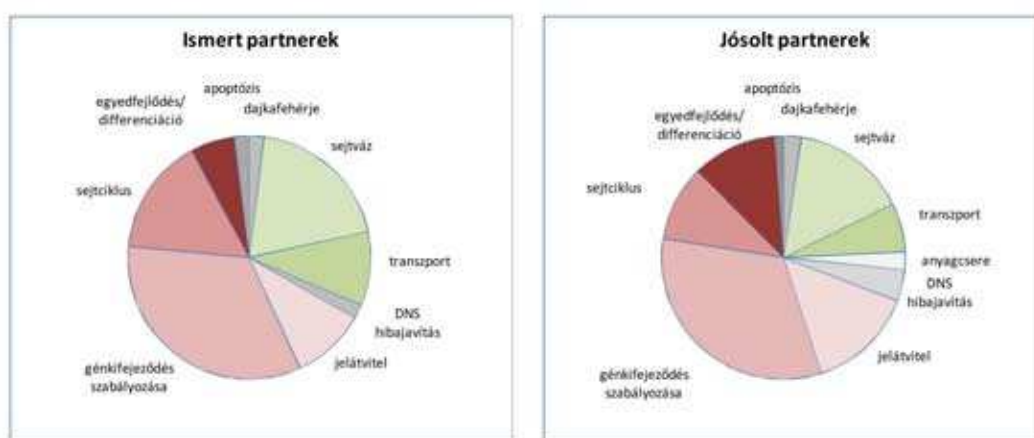
3. ábra. A DYNLL fehérje (szürke) Ac-SRGTQTE peptiddel alkotott komplexének (A, D és F), illetve leucin-cipzár által dimerizált VSRGTQTE motívummal alkotott komplexének kristályszerkezetét (B, E és G). A C ábrán látható a két peptid egymásra illesztése. Barna folttal jelöltük a peptidek -5-ös pozícióiban található valin, illetve acetyl-csoport DYNLL fehérjével kialakított kölcsönhatásait.

Az *in vitro* evolúció által jellemzett kötőmintázat alapján új humán DYNLL partnereket jósltunk (4. ábra). Kigyűjtöttük az összes olyan nyolctagú peptidszakaszt a humán proteom intracelluláris fehérjéiből, illetve doménjeiből, amelyek a DYNLL kötőmotívum számozás alapján a 0. pozícióban glutamint tartalmaznak, és amelyek az IUPred program [20] alapján rendezetlen régiókban találhatóak. A peptidek rangsorolásához használt pontozási rendszer az egyes pozíciók *in vitro* evolúció során meghatározott aminosav gyakoriságain alapul.

A pontszám küszöbértékét egy „bootstrap” típusú statisztikai eljárással határoztuk meg. A küszöbérték az a pontszám, amely felett a proteomban azonosított potenciális DYNLL kötőpartnerek számossága pozitív természetes szelekció miatt szignifikánsan nagyobb, mint az statisztikailag várható. Összesen 219 humán fehérje 242 kötőmotívuma rendelkezik küszöbérték feletti pontszámmal. Egyéb független paraméterek együttes figyelembevétel alapján ezek közül 98 fehérje 109 kötőmotívuma esetében tartjuk a predikciót kiemelkedően megbízhatónak (A osztály, lásd 4. ábra). Ebből a halmazból 8 humán fehérje 18 kötőmotívumát korábban már kísérletesen is azonosították. Érdekes, hogy a legnagyobb pontszámú, azaz a konszenzus szekvencia megtalálható egyetlen humán intracelluláris fehérjében, a mitózisban szerepet játszó, mikrotubulus-kötő EML3-ban [21]. A kötőszekvenciát tartalmazó EML3 doménről (83 aminosav) kimutattuk, hogy az valóban nagy affinitással kötődik a DYNLL-hez (1. táblázat) [22]. Az eddig ismert és az általunk jóslt DYNLL kötőfehérjék funkciók szerinti felosztása nagyon hasonlít



4. ábra. Az új DYNLL kötőpartnerek jóslásának folyamatábrája.



5. ábra. Az ismert és a jóslt partnerek funkcionális felosztása.

egymásra (5. ábra). Az újonnan prediktált kötőpartnerek validálását a munkacsoportunk megkezdte. A jóslt partnerek nagy száma jól összeegyeztethető azzal a jelenlegi elképzeléssel, miszerint a DYNLL, mint csomóponti fehérje egy dimerizációt kiváltó „molekuláris ragasztó”. Ez a szerepe hozzájárulhat kötőpartnerei szabályozásához, szupramolekuláris komplexek (magpórus, szinaptikus és posztzinaptikus komplexek, transzkripciós komplexek stb.) kialakulásához és ezek működésének finomhangolásához.

Mire lehet a jövőben az *in vitro* evolúcióval szelektált DYNLL-kötő peptidet használni? A mai napig kérdéses a DYNLL szerepe a dynein és a miozin motorfehérjék kargó szállításában. A nagy affinitású dimer peptidet a DYNLL kompetitív inhibitoraként használhatjuk (*in vivo* „molekuláris csapda” [24]), hogy pontosabb képet kapjunk a motorfehérjék és a DYNLL funkcionális kapcsolatáról. A DYNLL képes egyes proapoptotikus fehérjék, mint a Bmf és a Bim szekvesztrálására [4,5]. Proapoptotikus fehérjék hiányában a sejtek képesek elkerülni a programozott sejthalált. Ez a mechanizmus állhat számos daganatos megbetegedés hátterében [23]. Az általunk előállított nagy affinitású peptid ezekben a sejtekben felfüggesztheti a DYNLL anti-apoptotikus funkcióját, és így terápiás alkalmazások kifejlesztésének kiindulópontjául is szolgálhat.

Köszönetnyilvánítás: a munkát az OTKA (NK81950, K81784, K68408) és a TÁMOP (4.2.1./B-09/KMR-2010-0003) támogatta.

Irodalomjegyzék:

- [1] Hódi Z, Németh AL, Radnai L, Hetényi C, Schlett K, Bodor A, Perczel A, Nyitray L (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* **45**: 12582-12595.
- [2] King SM, Patel-King RS (1995) The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues. *J Biol Chem* **270**: 11445-11452.
- [3] Barbar E (2008) Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks. *Biochemistry* **47**: 503-508.
- [4] Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**: 1829-1832.
- [5] Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**: 287-296.
- [6] Stelter P, Kunze R, Flemming D, Hopfner D, Diepholz M, Philippsen P, Bottcher B, Hurt E (2007) Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex. *Nat Cell Biol* **9**: 788-796.
- [7] Herzig RP, Andersson U, Scarpulla RC (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J Cell Sci* **113 Pt 23**: 4263-4273.
- [8] Lo KW, Kan HM, Chan LN, Xu WG, Wang KP, Wu Z, Sheng M, Zhang M (2005) The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J Biol Chem* **280**: 8172-8179.

- [9] Benison G, Karplus PA, Barbar E (2007) Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: swallow and dynein intermediate chain compete for a common site. *J Mol Biol* **371**: 457-468.
- [10] Benison G, Karplus PA, Barbar E (2008) The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8. *J Mol Biol* **384**: 954-966.
- [11] Liang J, Jaffrey SR, Guo W, Snyder SH, Clardy J (1999) Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nat Struct Biol* **6**: 735-740.
- [12] Tochio H, Ohki S, Zhang Q, Li M, Zhang M (1998) Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Nat Struct Biol* **5**: 965-969.
- [13] Wang W, Lo KW, Kan HM, Fan JS, Zhang M (2003) Structure of the monomeric 8-kDa dynein light chain and mechanism of the domain-swapped dimer assembly. *J Biol Chem* **278**: 41491-41499.
- [14] Williams JC, Roulhac PL, Roy AG, Vallee RB, Fitzgerald MC, Hendrickson WA (2007) Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10028-10033.
- [15] Lo KW, Naisbitt S, Fan JS, Sheng M, Zhang M (2001) The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem* **276**: 14059-14066.
- [16] Rodriguez-Crespo I, Yelamos B, Roncal F, Albar JP, Ortiz de Montellano PR, Gavilanes F (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett* **503**: 135-141.
- [17] Nyarko A, Hare M, Hays TS, Barbar E (2004) The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8. *Biochemistry* **43**: 15595-15603.
- [18] Radnai L, Rapali P, Hódi Z, Süveges D, Molnar T, Kiss B, Bécsi B, Erdődi F, Buday L, Kardos J, Kovács M, Nyitray L (2010) Affinity, avidity and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem* **285**: 38649-38657.
- [19] Pál G (2008) Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban. *Biokémia* **XXXII**: 82-87.
- [20] Dosztányi Z, Csizmók V, Tompa P, Simon I (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**: 3433-3434.
- [21] Tegha-Dunghu J, Neumann B, Reber S, Krause R, Erfle H, Walter T, Held M, Rogers P, Hupfeld K, Ruppert T, Ellenberg J, Gruss OJ (2008) EML3 is a nuclear microtubule-binding protein required for the correct alignment of chromosomes in metaphase. *J Cell Sci* **121**: 1718-1726.
- [22] Süveges D, Rapali P, Radnai L, Wahlgren W, Katona G, Nyitray L (2010) Echinoderm microtubule associated protein like 3 (EML3): a novel binding partner of the dynein light chain, DYNLL. *FEBS JOURNAL* **277**: 301-302.
- [23] VanBrocklin MW, Verhaegen M, Soengas MS, Holmen SL (2009) Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma. *Cancer Res* **69**: 1985-1994.



2006-ban okleveles biológusként végeztem a Szegedi Tudományegyetem biológus szakán. 2006-ban az ELTE Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia programjában kezdtem doktori tanulmányaimat Pál Gábor és Nyitray László témavezetése mellett. 2009-ben három hónapig kutathattam magyar-spanyol közös Tét pályázat keretében a madridi egyetem Biokémia tanszékén (Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid). Jelenleg tudományos segédmunkatárs vagyok az ELTE alkalmazásában. Januártól TÁMOP ösztöndíjban részesülök.