

**Egy eukarióta csomóponti fehérje, az LC8 dinein könnyűlánc
fehérje-kölcsönhatásainak irányított evolúciós, biofizikai és
bioinformatikai módszerekkel való átfogó jellemzése és feltárása**

Doktori (Ph.D) értekezés

Rapali Péter



Témavetetőik: Dr. Nyitray László és Dr. Pál Gábor

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Nyitray László

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet

Biokémiai Tanszék

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Pál Gábornak és Nyitray Lászlónak;

Nyitray Lászlónak a lehetőségért, hogy csatlakozhattam az ELTE Biokémiai Tanszékhez és részt vehettem az ott folyó kutatásokban. Nyitott látásmódja, az új iránti gyermeki lelkesedése és lendülete, valamint végtelen türelme és nem utolsó sorban sportos életmódja követendő példaként áll előttem.

Pál Gábornak, aki precizitásával, éleslátásával mindig rámutatott a követendő útra. Kiemelném türelmét és alaposágát, amivel olvasta és javította dolgozataimat.

Továbbá köszönetet mondok a Nyitray labor összes dolgozójának a kialakult baráti légkörért, a motiváló, inspiráló beszélgetésekért. Külön kiemelném Radnai Lászlót, akivel számos kísérletet végeztünk közösen. Úgy gondolom, analitikus, precíz hozzáállásával eredményesen egészítettük ki egymást. Süveges Dánielnek, akihez – bármennyire is elfoglalt volt – problémáimmal mindig fordulhattam és önzetlenül segített. Szeretném külön megemlíteni Kiss Bencét és a motiváló, munkához való hozzáállását, valamint Bakos Anitát és Biri Beátát, akik családi légkört teremtettek a laborban. Köszönetet mondok továbbá Kardos Józsefnek, aki mindig partner volt mind szakmai problémák megoldásában, mind társasági események részvételében.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak és Szeretteimnek, akik megteremtették kiskorom óta a kutatómunkához szükséges nyugodt légkört. Édesapámnak és Édesanyámnak, akik teljes mellszélességgel mindig támogattak tanulmányaim során. Köszönöm továbbá Páromnak, Blankának aki a dolgozat megírása közben folyamatosan biztatott és bízott bennem.

Hálás vagyok továbbá mindazoknak, akik a legkisebb módon is hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez, de a helyhiány miatt nem áll módomban kiemelni őket.

Rövidítések jegyzéke

ATMIN:	<i><u>ATM</u> interactor</i>
Bim:	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
Bmf:	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
BSA:	<i>bovine serum albumin</i>
C. elegans:	<i>Caenorabditis elegans</i>
CDK2:	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNS:	<i>complementary deoxiribonukleinsav</i>
DIC:	<i>dynein intermediate chain</i>
DNS:	<i>deoxiribonukleinsav</i>
DTT:	<i>dithiothreitol</i>
E.coli:	<i>Escherichia coli</i>
EDC:	<i>N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELM:	<i>eukarióta lineáris motívum</i>
EML3:	<i>echinoderm microtubule-associated protein-like 3</i>
GKAP:	<i>guanylate-kinase-associate protein 1</i>
GST:	<i>glutathion-S-tranzsferase</i>
HPLC:	<i>high performance liquid chromatography</i>
IDR:	<i>intrinsically disordered region</i> ; magyar fordításban funkcionálisan rendezetlen régió
IPTG:	<i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
ITC:	<i>isothermal titration calorimetry</i> , magyar fordításban izotermális titráló kalorimetria
KIBRA:	<i>kidney and brain protein</i>
LB:	<i>Luria Broth</i>
NHS:	<i>N-hidroxy succinimide</i>
NMR:	<i>nuclear magnetic resonance</i> , magyar fordításban mágneses magrezonancia
nNOS:	<i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NRF-1:	<i>nuclear respiratory factor 1</i>
Nup159:	<i>nucleoporin 159</i>
Pak1:	<i>p21-activated kinase 1</i>

PBS: *phosphate buffered saline*
PCR: *polymerase chain reaction*
PDB: *protein data bank*
PEG: *polyethylene glycol*
PSD-95: *post synaptic density protein 95*
RU: *response unit*
SFFKH: *skálafüggetlen fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat*
SH2: *Src homology 2*
SH3: *Src homology 3*
SPR: *surface plasmon resonance*, magyar fordításban felület plazmon rezonancia
Tctex-1: *t-complex testis-expressed 1*
TEV: *tobacco etch virus*
TP53bp1: *tumor suppressor p53-binding protein 1*
UV: *ultraviola*

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Rövidítések jegyzéke	3
1.1 Fehérje-fehérje kapcsolatok kialakulása és hálózatba rendeződése	8
1.1.1 Domén-domén közötti kölcsönhatás	9
1.1.2 Domén-lineáris motívum közötti kölcsönhatás	9
1.1.2.1 Eukarióta lineáris motívumokat felismerő fehérje interakciós domének	9
1.1.2.2 Eukarióta lineáris motívumok általános jellemzői	11
1.1.2.3 Fehérje komplexek kialakulása során történő szerkezetváltozások	12
1.1.2.4 Szerkezetváltozások az eukarióta lineáris motívumok kötődése során	13
1.1.2.5 Az eukarióta fehérjék modularitásából adódó interakciós domén- és eukarióta lineáris motívum-felhalmozódás	14
1.1.3 Fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat felépítése	14
1.2 Dinein könnyűláncok	16
1.2.1 LC8 dinein könnyűlánc általános jellemzői	17
1.2.2 LC8 szerkezetének ismertetése	22
1.2.3 LC8 peptidekkel komplexben alkotott szerkezete.....	23
1.2.4 Az LC8 által felismert lineáris motívum jellemzői	23
1.2.5 LC8 dinein könnyűlánc paralóg fehérjék összehasonlítása.....	26
1.2.6 Az LC8 és partnerei között kialakuló kölcsönhatás szabályozása	27
1.3 Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata irányított evolúciós megközelítéssel; fág-bemutató módszerének részletezése.....	29
2. Célkitűzések	33
2.1 Előzmények és kérdések	33
2.2 Célok pontokba foglalva	34
3. Anyagok és módszerek.....	35
3.1 <i>E. coli</i> heterológ expresszióhoz szükséges DNS konstrukciók elkészítése.....	35
3.2 <i>E. coli</i> heterológ fehérje expresszió és a rekombináns fehérjék tisztítása.....	36
3.3 Szilárd fázisú peptid szintézis	37
3.4 Izotermális titráló kalorimetria.....	38
3.5 Fluoreszcencia anizotrópia spektroszkópia	39
3.6 Felületi plazmon rezonancia.....	39
3.7 Megállított áramlású fluoreszcencia spektroszkópia kinetikai mérések.....	40
3.8 Kunkel-féle mutagenézis eljárás	41
3.9 Fágmid vektor konstrukciók.....	42

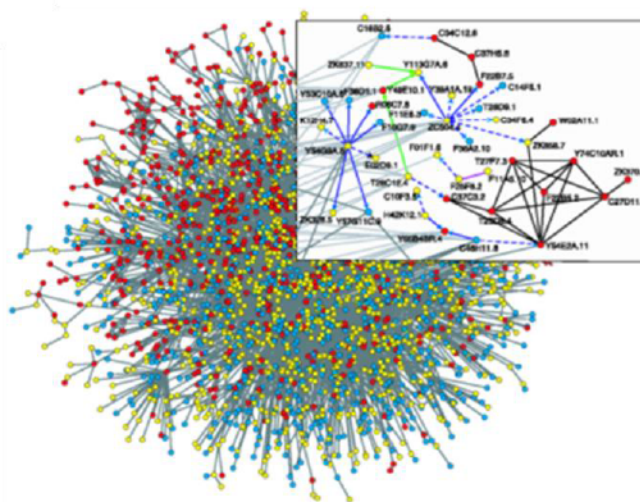
3.10 Fágmid- és fág-könyvtár készítés valamint fág-bemutató	43
3.11 LC8 dinein könnyűlánc kötőpartnereinek jóslása	44
3.12 Kristályosítás és röntgendiffrakció	45
3.13 Pepscan analízis	47
3.14 Élesztő kéthibrid	47
4. Eredmények	49
4.1 Az LC8 dinein könnyűlánc humán paralógjainak, a DYNLL1 és DYNLL2 kötőspecifitásának <i>in vitro</i> vizsgálata és összehasonlítása	49
4.2 Az LC8 dinein könnyűlánc különböző motívumcsaládokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása	51
4.3 A partnerek dimer szerkezetének hatása a kötőerősségre és a kötés kinetikájára: aviditás	54
4.4 Az aviditás hatása az LC8 fehérje Ser88-foszforiláción keresztüli szabályozására	56
4.5 Az LC8 kötőmotívumának átfogó jellemzése nagy-áteresztőképességű, irányított evolúciós megközelítéssel, fág-bemutatóval	58
4.6 Fág-bemutató eredményei alapján egy nagy affinitású motívum létrehozása	63
4.7 A -5. pozíció szerepének szerkezeti alapjai	66
4.8 Eddig nem azonosított humán LC8 kötőpartnerek jóslása az irányított evolúcióval meghatározott mintázat alapján	69
4.9 Nem-kanonikus motívumok keresése, partnerek jóslásának fejlesztése második generációs fág-könyvtár segítségével	72
4.10 Két jóslott partner (az EML3 és az ATMIN) kísérletes igazolása	75
4.10.1 <i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 3</i> (EML3)	75
4.10.2 <i>ATM interactor</i> (ATMIN)	77
5. Diskusszió	80
5.1 Humán LC8 paralógok partner-specifitása	80
5.2 Az LC8 dinein könnyűlánc kölcsönhatása különböző motívumokkal	81
5.3 Aviditás, avagy a dimerizáció hatása a kötőerősségre. Az LC8 egy általános dimerizáló, szerkezetstabilizáló csomóponti szabályozó fehérje	83
5.4 LC8 motívumának átfogó elemzése irányított evolúciós megközelítéssel, fág-bemutatóval	85
5.5 A humán LC8 interaktom felderítése a kötőmotívum mintázata alapján	87
5.6 EML3 és az ATMIN fehérjék, mint kísérletesen is igazolt új humán LC8 partnerek	89
5.7 Tctex-1 dinein könnyűlánc	90
6. Összefoglaló	91
7. Summary	93
8. Publikációs lista	95
9. Függelék	96

10. Hivatkozások..... 112

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Fehérje-fehérje kapcsolatok kialakulása és hálózatba rendeződése

A sejtekben lezajló különféle biológiai folyamatok működéséhez elengedhetetlen a fehérjék, mint a szervezet effektor molekuláinak összehangolt, szabályozott működése. A sejtekben egyidejűleg megtalálható több tízezer féle fehérje nem izoláltan, hanem egymás sejtbeli lokalizációját, működését szabályozva, több alegységes fehérjekomplexekbe szerveződve működik. Az azonosított fehérje-fehérje kapcsolatok száma napjainkban rohamosan növekszik az olyan nagy-áteresztőképességű módszereknek köszönhetően, mint például a tandem affinitásos tisztítás, az élesztő kéthibrid módszer vagy az immunprecipitáció (**1. ábra**) (Rigaut et al. 1999; Li et al. 2004). A doktori munkám során vizsgált LC8 dinein könnyűlánc sokféle, igen változatos tulajdonságú partnerrel lép kölcsönhatásba. Mielőtt részletezném az LC8 tulajdonságait, azért, hogy pontosabb képet kapjunk működéséről, a bevezető részben röviden összegzem a fehérje-fehérje kapcsolatok kialakulásának, szabályozásának molekuláris jellemzőit, illetve hálózatba rendeződésének szabályszerűségeit. Áttekintem az eukarióta lineáris motívumok, az azokat felismerő domének általános jellemzőit, továbbá a fehérje-fehérje kölcsönhatások során történő szerkezetváltozások alapjait.

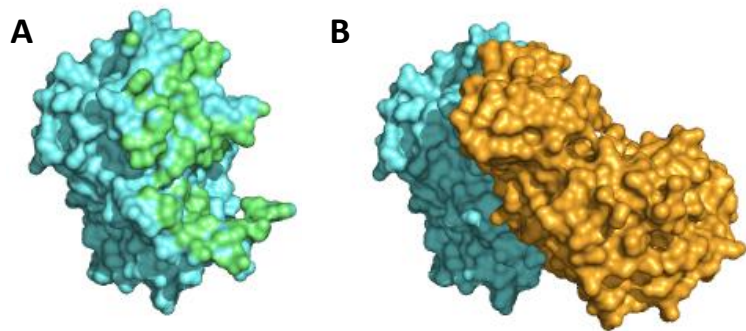


1. ábra: Nagy-áteresztőképességű, élesztő kéthibrid módszerrel eddig feltárt *Caenorhabditis elegans* fehérje interakciója közel 5500 fehérje-fehérje kapcsolatot tartalmaz. Az egyes pontok a különböző fehérjéket jelölik, míg a vonalak a fehérjék közötti lineáris kapcsolatot mutatják. A kinagyított rész a hálózat egy darabját részletezi. Forrás: (Li et al. 2004).

1.1.1 Domén-domén közötti kölcsönhatás

Két fehérje között kialakuló kapcsolat egyik lehetséges módja, amikor harmadlagos szerkezettel jól definiált globuláris fehérjék vagy a fehérjék doménjei nagy felületen keresztül ($\sim 1000\text{-}2000 \text{ \AA}^2$) kötődnek egymáshoz és alakítanak ki homo- vagy heterokomplexeket (Chakrabarti et al. 2002). A domén-domén között kialakuló kapcsolatot gyakran kiterjedt, nagy felszín közvetíti (**2. ábra**). Két globuláris fehérje kapcsolatára jó példa a ciklin-függő kináz 2-nek (CDK2, Uniprot: P24941) a ciklin-A2 fehérjével kialakított komplexe (PDB: 3QHW).

2. ábra: A ciklin-A2 fehérjének (türkiz) (A) és a ciklin-függő kináz 2-vel (sárga) alkotott komplexének (B) kristályszerkezete (PDB kód: 3QHW). A két globuláris fehérje között kialakuló kapcsolatot a ciklin-A2 molekulán zöld színnel kiemelt kiterjedt kötőfelszín biztosítja. Az ábrát PyMOL segítségével készítettem.



1.1.2 Domén-lineáris motívum közötti kölcsönhatás

Eukariótákban a fehérjék közötti kapcsolat másik lehetséges módja, amikor egy globuláris fehérje vagy egy globuláris domén kötőárka és egy úgynevezett rövid lineáris motívum (továbbiakban ELM, angol nyelvű leírata: *Eukaryotic Linear Motif* vagy *Short Linear Motif* (SLiM)) között alakul ki a kölcsönhatás. Mára már több mint 180 féle domén-ELM kapcsolatot azonosítottak. (ELM adatbázis forrása: http://elm.eu.org/elms/browse_elms.html).

1.1.2.1 Eukarióta lineáris motívumokat felismerő fehérje interakciós domének

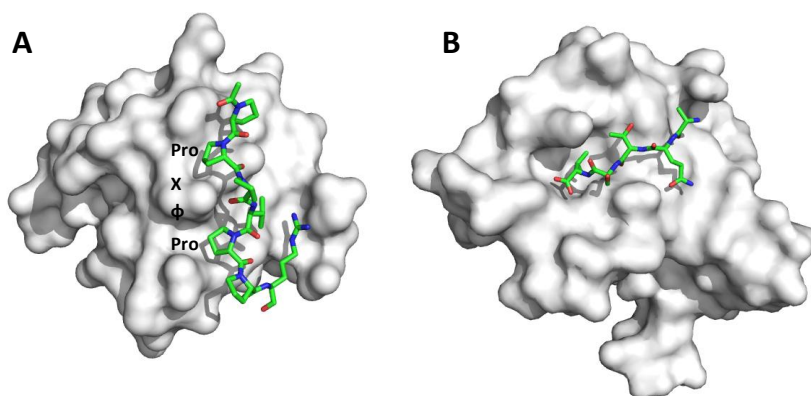
Az alábbiakban néhány, széles körben vizsgált fehérje interakciós domén általános jellemzőit mutatom be.

A legintenzívebben kutatott és legáltalánosabb interakciós domének közé tartozik a PDZ domén (Doyle et al. 1996; Harris et al. 2001) (**3 B ábra**). Nagyjából 250 féle PDZ domént azonosítottak körülbelül 100, igen változatos multi-domén felépítésű humán fehérjében, azaz gyakran egy fehérjében több kópiában is megtalálhatóak. Számos membrán-asszociált, illetve állványfehérjének a része (például PSD-95, GRIP). Leginkább a

több alegységes szupramolekuláris fehérje komplexek összeszerelődésének közreműködésében játszanak kulcsszerepet. Léteznek nem kanonikus PDZ domének is, melyek foszfolipideket vagy a fehérjék belsejében található motívumokat ismernek fel, de általában a fehérjék karboxil terminálisánál található 6-7 aminosav hosszúságú, hidrofób karakterű szekvenciákhoz kapcsolódnak mikromólos disszociációs állandójú affinitással (Harris et al. 2001; Sheng et al. 2001).

Egy másik széles körben vizsgált interakciós domén az Src homology 3 (SH3) domén, ami egy prolinokban gazdag Φ -Pro-X- Φ -Pro motívumot ismer fel (a Φ hidrofób, míg az X bármilyen aminosav lehet) (**3 A ábra**). A kis komplexitású Φ -Pro-X- Φ -Pro motívum bár kis affinitással ($K_d = 1-200 \mu\text{M}$), de nagy szelektivitással kötődik az SH3 doménhez. Az SH3 domén ezen tulajdonságai miatt széles körben megtalálható különböző jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérjékben, mint például a Gbr2 kinázban vagy az Src tirozin kinázban (Nguyen et al. 1998).

3. ábra: Az A ábrán a *Caenorhabditis elegans* Sem5 fehérje (humán ortológja a Gbr2 kináz) karboxil terminálisának SH3 doménje (szürke színnel és térkitöltött módon ábrázolva) és a Sos kináz PPPVPPR (az kölcsönhatásban fontos



prolinok aláhúzva) kötőmotívumának komplexe látható (PDB: ISEM). B: A PSD-95 fehérje harmadik PDZ doménjének (szürke színnel és térkitöltött módon ábrázolva) a Cript karboxil-terminális KQTSV peptidjével alkotott komplex kristályszerkezete (PDB: IBE9). Az ábrát PyMOL program segítségével készítettem.

A fentebb példaként említett két interakciós domén (PDZ és az SH3) inkább a szupramolekuláris fehérje komplexek szerveződéséért felel. A szupramolekuláris fehérje komplexek kialakulásával az egyes fehérjék sejten belüli pontos előfordulási helye is szabályozott lehet. Ez a szabályozottság megnövelheti a jelátviteli folyamatokban adott sejtválasz irányított tovaterjedésének hatékonyságát és megbízhatóságát (Harris et al. 2001; Sheng et al. 2001; Tonikian et al. 2008; Scott et al. 2009).

Léteznek olyan interakciós domének, melyek megfelelő működéséhez az ELM-ek valamelyik aminosavmaradék oldalláncának poszt-transzlációs módosítása szükséges (például foszforiláció, acetiláció vagy ubiquitináció) (lásd 1. táblázat) (Seet et al. 2006). Ezek a

domének a jelátviteli folyamatok során a sejtválasz közvetítésében játszanak szerepet. A kizárólag többsejtű élőlényekben előforduló SH2 domén tipikusan egy foszfo-tirozin tartalmú 3-6 aminosav hosszúságú motívumot ismer fel. A 14-3-3 fehérje foszfo-szerin tartalmú motívumra specifikus. A hisztonok acetilált lizinjét felismerő bromo domént általában a gén, illetve a kromatin szerkezetének szabályozásában részt vevő fehérjék tartalmazzák.

módosítás	aminosav	interakciós domén
foszforilálás	tirozin	SH2, PTB
	szerin, treonin	14-3-3, WD40, WW, MH2
acetilálás	lizin	bromo
metilálás	lizin	chromo
hidroxilálás	prolin	VHL β -domén
ubiquitilálás	lizin	UIM, UBA

1. táblázat: Különböző aminosavmaradék oldalláncok poszt-transzlációs módosítását felismerő interakciós domének.

1.1.2.2 Eukarióta lineáris motívumok általános jellemzői

Az ELM-ek mérete általában 3 és 8 aminosav között változik. A domén és ELM közötti kötése erősség a pár mikromólostól a nanomólos disszociációs állandójú tartományon belül változhat. A rövid motívumokra azonban a komplexben kialakuló kevés kölcsönhatás miatt inkább a gyengébb, mikromólos disszociációs állandójú affinitás jellemző (Neduva et al. 2005). A fehérje-fehérje kölcsönhatások jelentős részében a komplex létrejötte több független, önmagában alacsony affinitású ELM részvételével is megvalósulhat. A számos, egyenként kis affinitású kölcsönhatás eredményeként gyakran nagy kötőerősséggel jellemezhető, tehát időben stabil komplex jöhet létre (lásd később az „Az eukarióta fehérjék modularitásából adódó interakciós domén- és ELM felhalmozódás” című 1.1.2.5 fejezetben). Például a szupramolekuláris komplexek kialakulásáért felelős domének közötti kölcsönhatás kevésbé dinamikus, ezek esetében az asszociációs és disszociációs sebességi állandók általában alacsonyabbak. Például a bromo és a chromo domének az acetilált és a metilált motívumokat 10 μ M vagy annál nagyobb disszociációs állandóval kötik. Ezek a domének általában nagy, mutidomén szerkezetű fehérjékben találhatóak, amelyekben különféle fehérje-fehérje kölcsönhatások sora erősíti meg a negyedleges szerkezetet (Seet et al. 2006). A jelátvitel során gyakran fontos szerepet játszanak az ELM-ek. A kinázok, foszfatázok dokkoló motívumai vagy például az SH2 domén esetében a kölcsönhatások nagy asszociációs és

disszociációs sebességi állandóval jellemezhetőek, ennek megfelelően ezek a kölcsönhatások átmeneti jellege biztosítja a jelátvitel megfelelő működését (Seet et al. 2006).

Az ELM-ekben általában egy-két kitüntetett pozíció („*hotspot*” vagy „*core*” motívum) található. A kitüntetett pozíciók mutációja gyakran elégséges a kölcsönhatás megszűnéséhez vagy a drasztikus affinitáscsökkenéshez. A határoló aminosavak inkább a kötődés finomhangolásáért, a specificitás kialakításáért felelősek, illetve gyakran távtartó funkciót tölthetnek be. A motívumok kis méretük és viszonylagos egyszerűségük miatt konvergens evolúcióval, tehát egymástól függetlenül is létrejöhetnek az egyes fehérjékben. Az ELM-ek gyakran a fehérjéknek nem a globuláris, hanem az úgynevezett funkcionálisan rendezetlen régióiban találhatóak („*Intrinsically disordered region*”, azaz IDR) (Tompa 2012). Gyakran megfigyelhető, hogy ezért az ELM-ek – főleg azok kitüntetett pozíciói – nagyobb konzerváltsági fokot mutatnak a környező, evolúciósan kisebb nyomásnak kitett, evolúciós szempontból kevésbé stabil határoló szekvenciáktól (Neduva et al. 2005; Chica et al. 2009).

1.1.2.3 Fehérje komplexek kialakulása során történő szerkezetváltozások

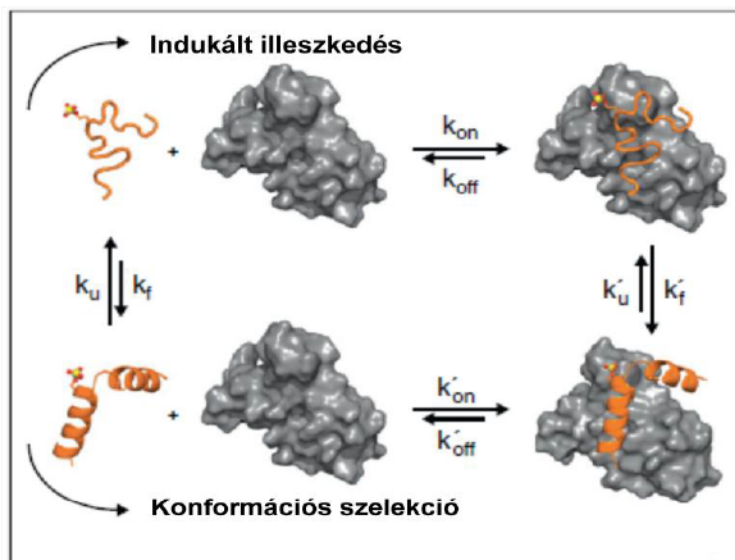
Az enzimek és szubsztrátjaik között kialakuló specifikus kölcsönhatást 1894-ben Fischer az úgynevezett „kulcs-zár” modellel magyarázta (Fischer 1894). A modell mind az enzimet (zár), mind a szubsztrátját (kulcs) merev szerkezetűnek feltételezte. A modellben az enzim aktív centruma vagy szubsztrátkötő zsebe egyértelműen definiálja szubsztrátja méretét és szerkezetét. Napjainkra azonban egyre több információval rendelkezünk a fehérjék szerkezetének dinamikájáról. A fehérjék nem merev, hanem állandóan fluktuáló szerkezettel, széles időskálán mérhető dinamikával jellemezhetőek. A fehérjék közötti kölcsönhatást ez a kezdeti „kulcs-zár” modell így csak igen speciális esetekben írja le jól.

1958-ban Koshland a „kulcs-zár” hipotézist továbbfejlesztette, és bevezette az „indukált illeszkedés” modellt, amelyben egy merev szerkezetű partner vagy szubsztrát kötődik egy fehérje vagy enzim kötőárákába, szubsztrátkötő zsebébe (Koshland 1958). A partner vagy szubsztrát kötése során a felszabaduló kötési energia a fehérje vagy az enzim szerkezetében konformációs változást idéz elő (**4. ábra**).

Az indukált illeszkedés modellt követte Straub Brunó, valamint Závodszy Péter fluktuációs fit elmélete, mely 25 évvel később Frauenfelder által konformációs szelekció néven tört be a köztudatba (Straub 1964; Zavodszy 1966; Frauenfelder et al. 1991). A modell szerint egyes fehérjék nem komplexáltak, azaz szabad formájukban több, egymással összemérhető szabadentalpia szintű konformációs állapotban léteznek. Az eltérő

konformációs állapotokban a fehérje eltérő kinetikai illetve termodinamikai paraméterekkel köt ligandumokat, ami meghatározhatja a fehérje ligandumkötésének specifitását. Az egyes konformerek egyensúlyi arányait a szabadentalpia szintjük különbsége, tehát termodinamikai összefüggés szabja meg. Amikor egy olyan ligandum is jelen van, amely az egyes konformerekhez eltérő affinitással kötődik, bekötése során a termodinamikai egyensúlyt a hatékonyabban kötő konformer irányába tolja el (**4. ábra**).

4. ábra: A fehérje-fehérje kölcsönhatások során bekövetkező szerkezetváltozásokat leíró konformációs szelekció- és indukált illeszkedés modellek. Konformációs szelekció során a partner fehérje (narancssárga) nem komplexált formában különböző, de termodinamikailag összemérhető konformációs állapotban található. Az egyik konformációs állapotának szubsztrátjával, ligandumával való kölcsönhatása azonban jóval



kedvezőbb. Az indukált illeszkedés esetében a kölcsönhatás során felszabaduló kötési energia szerkezetváltozást eredményez a partner fehérjében (narancssárga). Forrás: (Kiefhaber et al. 2012).

1.1.2.4 Szerkezetváltozások az eukarióta lineáris motívumok kötődése során

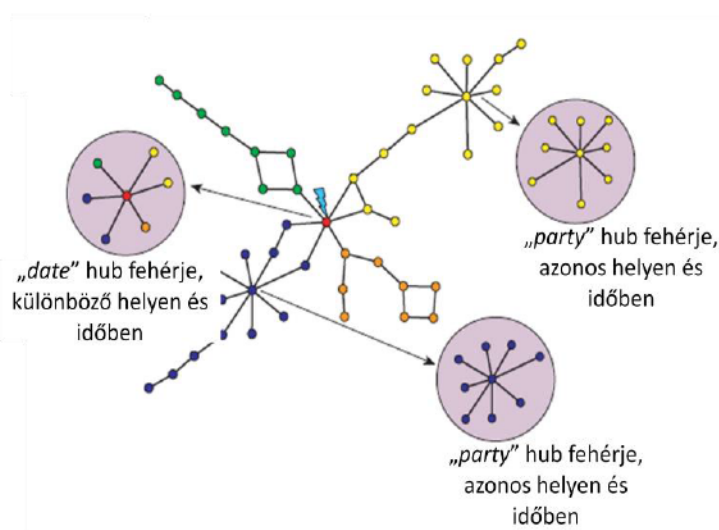
Az ELM-ek szabad formában általában rendezetlen szerkezetűek (IDR), azonban komplex képződése közben gyakran alfa hélix vagy béta szál konformációjú másodlagos szerkezetet vesznek fel. Ez alapján alfa és béta típusú ELM-eket különböztetünk meg (Mohan et al. 2006; Vacic et al. 2007). Számos esetben azonban nehéz megállapítani, hogy a kölcsönhatás során tapasztalt konformáció változás indukált illeszkedés vagy konformációs szelekció elvén történik-e. Mágneses magrezonancia vizsgálatok kimutatták, hogy számos IDR esetében a komplexált formában fellelhető másodlagos szerkezet már a szabad formában is megfigyelhető (Fuxreiter et al. 2004). Megjegyzendő, hogy az indukált illeszkedés és a konformációs szelekció két szélső esetként is értelmezhető, és a valóságban ezek kombinációja is megvalósulhat.

1.1.2.5 Az eukarióta fehérjék modularitásából adódó interakciós domén- és eukarióta lineáris motívum-felhalmozódás

Eukarióta fehérjék esetében gyakran tapasztalható, hogy kazetta-szerűen egymással összeépülő több azonos vagy különböző másodlagos szerkezetű interakciós domént is tartalmazhatnak. A fehérjék funkcionálisan rendezetlen régióiban gyakori az ugyanolyan vagy különböző ELM-ek feldúsulása (Pawson et al. 2003). Az eukarióta fehérjék fenti modularitásból adódóan igen változatos kapcsolatrendszerrel, más szóval összetett, több alegységes fehérje komplexeket képesek kialakítani.

5. ábra: A skálafüggetlen fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatokra jellemző csomóponti fehérjék közül a „party” típusúak az azonos sejtfolyamatokban szerepet játszó partnerekkel hatnak kölcsön, míg a „date” típusúak a különböző sejtfolyamatokat kapcsolják össze. Az ábrán azonos színű pontok azonos sejtfolyamatban szereplő fehérjéket ábrázolnak.

Forrás: (Han et al. 2004).



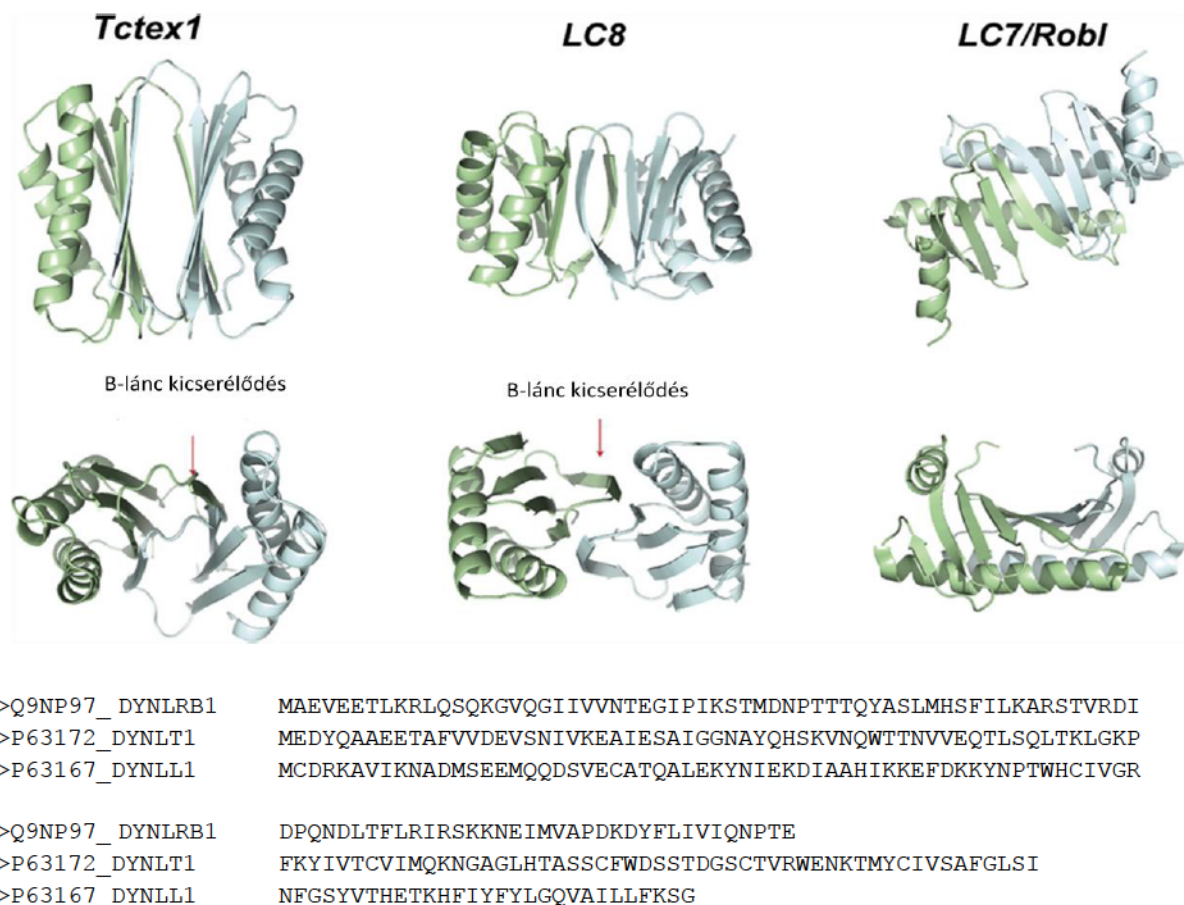
1.1.3 Fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózat felépítése

A fehérje-fehérje kapcsolatok úgynevezett skálafüggetlen fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatokat alkotnak (SFFKH). A SFFKH-ra jellemző, hogy a legtöbb fehérje kevés kölcsönható partnerrel rendelkezik, azonban a fehérjék egy kisebb csoportja, az úgynevezett csomóponti fehérjék, több tíz vagy akár száz másik fehérjéhez is kötődhetnek. A SFFKH általában ellenálló a véletlen mutációkkal szemben, de igen érzékeny a csomóponti fehérjéket érintő mutációkra. Ebből következően a csomóponti fehérjék feltűnően konzerváltak (Winzeler et al. 1999; Giaever et al. 2002). Összességében elmondható, hogy a csomóponti fehérjék alapvető fontosságúak a SFFKH globális szerkezetének kialakításában, ezáltal a különböző sejtleletani folyamatok működésében. Hagyományosan két csoportra osztják őket: „party” (például Sec17, Sec22 és Vti1) és „date” (például kalmodulin) (5. ábra) típusra. A „party” csomóponti fehérjéknek jellemzően egy adott sejtleletani funkcióban szereplő partnerei vannak, és azokat egyidejűleg, akár egy adott sejt-kompartmeneten belül kötik. A

„*date*” csomóponti fehérjék ezzel szemben inkább igen változatos sejtélettani funkcióhoz köthető partnereket kötnek különböző helyeken és időben. Ezáltal összekapcsolják a különböző biológiai folyamatokat (Han et al. 2004). Általánosságban elmondható, hogy a „*party*” kapcsolatok időben inkább állandóak, míg a „*date*” kapcsolatok inkább átmenetiek.

1.2 Dinein könnyűláncok

Gerincesekben eddig három dinein könnyűlánc családot azonosítottak¹. Ezek az LC8 család (DYNLL1 paralóg, a humán ortológ Uniprot kódja: P63167; DYNLL2 paralóg, a humán ortológ Uniprot kódja: Q96FJ2), a t-complex asszociált család – (Tctex-1/DYNLT1 paralóg, a humán ortológ Uniprot kódja: P63172; Tctex-3/DYNLT3 paralóg, a humán ortológ Uniprot kódja: P51808) és a Roadblock család (DYNLRB1, a humán ortológ Uniprot kódja: Q9NP97; DYNLRB2, a human ortológ Uniprot kódja: Q8TF09) (Pfister et al. 2006). Mindegyik család tagjai enzimaktivitással nem rendelkező, homodimer fehérjék.



6. ábra: Az LC8 (DYNLL1), a Tctex-1 (DYNLT1) és a Roadblock (DYNLRB1) dinein könnyűláncok szekvenciái és szerkezetei. A három dinein könnyűlánc szekvenciális eltérései ellenére szerkezetük nagyfokú hasonlóságot mutat. Forrás: (King 2012).

¹ Mindhárom család megtalálható mind az axonális, mind a citoplazmatikus dinein komplexben, ami alapján gyűjtőnevet kapták. Az egyes könnyűlánc családokat a felfedezésük (Roadblock), mutációjuk okozta hatásuk (t-complex asszociált – „t-complex testis-expressed”), illetve a méretük alapján (LC8 – , megjegyzendő, hogy mérete a felfedezést követően pontosabb meghatározás után 10,3 kDa-nak bizonyult) nevezték el.

² Radnai László, Rapali Péter, Bodor Andrea, Perczel András és Nyitray László eddig nem

Az egyes dinein könnyűlánc családok az aminosav sorrendjük tekintetében meglehetősen eltérnek egymástól, de érdekes módon térszerkezetük (főleg az LC8 (DYNLL1 és DYNLL2) és a Tctex-1) igen hasonló (**6. ábra**). Mint nevük is mutatja, mindegyiket először a dinein motorkomplex alegységeként írták le (Bell et al. 1979; Pfister et al. 1982; Vallee et al. 1983). Mára azonban kiderült, hogy a dinein könnyűláncok – azon belül is a DYNLL1 és a DYNLL2, illetve a Tctex-1 – számos, a dinein motorfehérjétől független, változatos sejtélettani folyamatban is részt vesznek. A Bevezetés fejezet további részeiben a dinein könnyűláncok közül –, a doktori munkám során is vizsgált – LC8 dinein könnyűlánc, illetve paralógjainak tulajdonságait részletezem bővebben.

```

P63167_Human      MCDRKAVIKNADMSEEMQQDSVECATQALEKYNIEKDIAAHIKKEFDKKNPTWHCIVGR 60
P63170_Rat       MCDRKAVIKNADMSEEMQQDSVECATQALEKYNIEKDIAAHIKKEFDKKNPTWHCIVGR 60
P61285_Bovine    MCDRKAVIKNADMSEEMQQDSVECATQALEKYNIEKDIAAHIKKEFDKKNPTWHCIVGR 60
Q24117_Drosophila MSDRKAVIKNADMSEEMQQDAVDCATQALEKYNIEKDIAAYIKKEFDKKNPTWHCIVGR 60
Q22799_C. elegans MVDRKAVIKNADMSDMQQDAIDCATQALEKYNIEKDIAAYIKKEFDKKNPTWHCIVGR 60
* *****:****:*****:*****

P63167_Human      NFGSYVTHETKHFIFYFLGQVAILLFKSG 89
P63170_Rat       NFGSYVTHETKHFIFYFLGQVAILLFKSG 89
P61285_Bovine    NFGSYVTHETKHFIFYFLGQVAILLFKSG 89
Q24117_Drosophila NFGSYVTHETRFHIFYFLGQVAILLFKSG 89
Q22799_C. elegans NFGSYVTHETKHFIFYFLGQVAILLFKSG 89
*****:*****

```

7. ábra: LC8 ortológ szekvenciák. Az LC8 az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje. *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, szarvasmarha, patkány és a humán LC8 ortológok szekvenciái 90 %-os egyezést mutatnak.

1.2.1 LC8 dinein könnyűlánc általános jellemzői

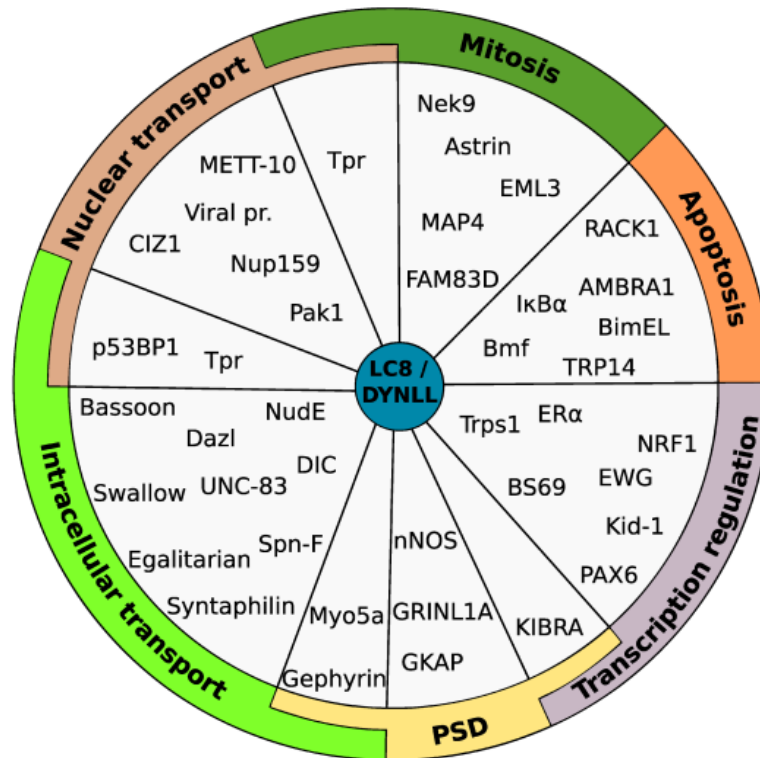
Az LC8 (humán ortológja: DYNLL) a leginkább tanulmányozott dinein könnyűlánc. Nyolcvankilenc aminosavból áll, 10 kDa molekulatömegű, rendkívül konzervált eukarióta fehérje. A *Caenorhabditis elegans*, a *Drosophila melanogaster*, a szarvasmarha, a patkány és az ember LC8 szekvenciája több mint 90 %-ban megegyezik (**7. ábra**). Az LC8 minden szövetben, de kiváltképpen az agyban és herében expresszálódik (King et al. 1996). Citoszólikus és sejtmagi frakcióban egyaránt megtalálható. Az LC8 gén csendesítése illetve kiütése *Drosophila melanogaster*-ben illetve *Caenorhabditis elegans*-ban embrionális letalitást, illetve drasztikus elváltozásokat okoz igen változatos sejtélettani folyamatokban (például pronukleáris migrációban, neurogenesisban, sejtosztódásban, a mitotikus orsó kialakulásában vagy az apoptózisban) (Dick et al. 1996; Phillis et al. 1996; Gonczy et al.

2000). Az LC8-nak két gerinces paralógját azonosították (DYNLL1 és DYNLL2), amelyek nagyfokú szekvenciális és szerkezeti homológiát mutatnak (bővebben az 1.2.5. „LC8 dinein könnyűlánc paralóg fehérjék összehasonlítása” című fejezetben részletezem) (12. ábra).

Az LC8 dinein könnyűláncot először a *Chlamidomonas* axonémális dinein komplex alegységeként azonosították, későbbiekben a citoplazmatikus dinein motor komplexben is megtalálták (King et al. 1995; King et al. 1996). Az LC8 dinein könnyűlánc– a másik két dinein könnyűláncsal, a Tctex-1-gyel és a Roadblock-kal egyetemben – homodimerként kötődik a szintén homodimer dinein intermedier könnyűláncához, ami állványfehérjeként működik a kargó motorfehérjéhez való kapcsolódásakor. Később azt is kimutatták, hogy az LC8 a miozin-5a motorfehérjének is alegysége (Espindola et al. 2000). Kutatócsoportunkban Hódi Zsuzsa azonosította a miozin-5a fehérjében a pontos LC8-kötőszekvenciát (Hodi et al. 2006; Wagner et al. 2006). Ezen kívül számos, a dinein- és a miozin-5a motorfehérjék által szállított molekuláról leírták, hogy partnere az LC8 fehérjének (**2. és 3. táblázat, 8. ábra**). Jelenleg a dinein- és a miozin motorfehérje-kutatás egyik legvitatottabb területe a szállítmányok megkötésének és a céltartományig juttatásának a szabályozása. A fentiek alapján feltételezték, hogy az LC8 fehérje a dinein- és a miozin-5a motorfehérjék egyfajta szállítmány-közvetítőjeként (*cargo adapter*) működik, azaz egyszerre köti az aktuális motorfehérjét és a szállítandó fehérjét (Puthalakath et al. 1999; Fan et al. 2001; Rodriguez-Crespo et al. 2001; Navarro et al. 2004; Lo et al. 2005; Lee et al. 2006). Az LC8 nagyobbik hányada azonban nem dinein- vagy miozin-5a fehérjével alkot komplexet, hanem a citoplazma egyéb részeiben található. Megjegyzendő, hogy az LC8 megtalálható növényekben is, melyekből hiányzik a dinein motorkomplex (Vale et al. 2000). Termodinamikai és szerkezeti (kristályszerkezet és NMR mérések) adatok arra engednek következtetni, hogy valószínűleg az LC8 nem tudja egyszerre kötve tartani a dinein motorfehérjét és szállítmányait (lásd a *Az LC8 peptidekkel komplexben alkotott szerkezete* című 1.2.3 fejezetben). Jelenleg az LC8-at inkább egy olyan csomóponti fehérjének tartják, mely egyfajta általános „molekuláris ragasztóként” működhet, azaz stabilizálja partnerei dimer szerkezetét, ezáltal szabályozza azok működését (Hodi et al. 2007; Barbar 2008).

Doktori munkám során az LC8 kísérletesen azonosított partnereinek száma rohamosan emelkedett, mára már meghaladja a 60-at (**2. és 3. táblázat**). A 8. ábrán található LC8 partnerek igen változatos sejtleletani funkciókban játszanak szerepet. Megtalálhatóak a preszinaptikus aktív zóna (Bassoon) és a poszt-szinaptikus denzitás állványfehérjéi között

(GKAP, KIBRA), szerepet játszanak a sejtmagi transzport (Nup159), a transzkripció szabályozásában (NRF-1), a mitózis (EML3) és az apoptózis (Bim és Bmf) folyamataiban.



8. ábra: Az LC8 partnerek funkcionális csoportosítása. A partnerek a poszt-szinaptikus denzitás (PSD) állványozó szerepétől kezdve a mitotikus folyamatokig igen változatos sejtleletani folyamatokban vesznek részt.

2. táblázat: Ismert kötőmotívummal rendelkező ismert LC8 partnerek listája. A táblázat csak azokat a partnereket tartalmazza, amelyek kötődését legalább két különböző kísérletes módon igazolták. A motívumban a legkonzerváltabb 0. pozíciót pirossal emeltem ki.

¶: Dimer motívum esetében mért kötőerősség.

D,I: IUPred és Disprot programmal rendezetlen szerkezetűnek jóslott régió.

‡: Kísérletesen igazolt, hogy a motívum rendezetlen szerkezetű régióban található.

C: Coils programmal coiled coil szerkezet jóslható a fehérjében.

E: Kísérletesen igazolt, hogy a fehérje dimer vagy trimer szerkezetű.

fehérje neve	szervezet	Uniprot kód	Paralog/Ortolog	szekvencia	1. pozíció	K _d (μM)	PDB kód	IDR	CC/Dimer	hivatkozás
Adenain (ADE41)	HAV 41	P11826	DYNLL1	CITLVKSTQTV	104			-	-	(Martinez-Moreno et al. 2003)
AIBC1 (BCAS1)	Human, Rat	O75363/ Q3ZB98	DYNLL1	KRMLDAQVQTD	563			D,I	C	(Lo et al. 2001; Ninomiya et al. 2005; Ewing et al. 2007)
ATMIN	Human	O43313	DYNLL1	LESLDIETQTD	665	1,7		D,I	-	
p54 (E183L)	ASF virus	Q4TWM2	DYNLL1	VTTQNTASQTM	139			D,I	-	(Alonso et al. 2001; Hernaez et al. 2004; Garcia-Mayoral et al. 2010)
Bassoon (Bsn)	Rat	O88778	DYNLL1/2	PTFANYGSQTE SPMVAQGTQTP RATAEFSTQTP	1423 1527 1499			D,I	C	(Fejtova et al. 2009)
BimEL (BCL2L11)	Human	O43521	DYNLL1	PMSCKDKSTQTP	107	0,8	1F95	D,I†	-	(Puthalakath et al. 1999; Lo et al. 2001; Lajoix et al. 2004; Hinds et al. 2007)
Bmf	Human	Q96LC9	DYNLL2	TSQEDKATQTL	63	0,7 0,004†		D,I	-	(Puthalakath et al. 2001; Rodriguez-Crespo et al. 2001; Radnai et al. 2010)
BS69 (ZMYND11)	Human	Q15326	DYNLL1	PRMLHRSTQTT	408			D,I	C	(Lo et al. 2001)
CHICA (FAM83D)	Human	Q9H4H8	DYNLL1	RKAIDAATQTE LSVSEVGTQTS IWSRSTTTQTD	384 402 435				D,I	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011), (Dunsch et al. 2012)
DIC (sw)	Fruit fly	Q24246	ddlc1	TLVYTKQTQTT	125	8; 3,0 0,2†	2P2T, 3FM7, 2PG1	D,I†	C	(Nyarko et al. 2004; Benison et al. 2007; Hall et al. 2009)
DIC1 (Dync1l1)	Mouse	O88485	DYNLL1	VVSYSKETQTP	146			D,I	C	(Lo et al. 2001; Lajoix et al. 2004)
DIC2 (Dync1l2)	Rat	Q62871	DYNLL1	IVTYTKETQTP	153			D,I	C	(Varma et al.)
DNMT3A	Human	Q9Y6K1	DYNLL1	LVLKDLGIQVD	648			-	-	(Rodriguez-Crespo et al. 2001; Navarro-Lerida et al. 2004)
Egalitarian	Fruit fly	P92030	ddlc1	VKLVDAESQTL	947			D,I	C	(Navarro et al. 2004)
EML3	Human	Q32P44	DYNLL1/2	PSLVSRGTQTE	78	0,1 0,05†	2XQQ, 3P8M	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
Gephyrin (Gphn)	Rat	Q03555	DYNLL1/2	KQTEDEKGVQCE	216			D,I	C	(Rodriguez-Crespo et al. 2001; Fuhrmann et al. 2002; Lajoix et al. 2004; Maas et al. 2006; Garcia-Mayoral et al. 2010)
GKAP (DLGAP1)	Human, Rat	O14490/ P97836	DYNLL2	NRCLSIGIQVD	647	2,4		D,I	C	(Haraguchi et al. 2000; Naisbitt et al. 2000; Rodriguez-Crespo et al. 2001; Lajoix et al. 2004)
Grin1A (GCOM1)	Human	P0CAP1	DYNLL1	SKFQSVGVQVE	672			D,I	-	(Garcia-Mayoral et al. 2010)
E4	HPV 8	P06425	DYNLL1	TEVETREIGVG	423			D,I	C	(Martinez-Moreno et al. 2003)
Hsc73 (Hspa8)	Rat	P63018	DYNLL1	DHHQDKQTQTP	18			D,I	-	(Martinez-Moreno et al. 2003)
KIBRA	Human	Q8IX03	DYNLL1	TTTPKQQTFF KQYLDVSSQTD ALKVDKETNTE	418 275 884	0,45; 4,0		D	C	(Rayala et al. 2006)
KID-1 (Znf354a)	Rat	Q02975	DYNLL1	SHRTTKSTQIQ	94			D,I	-	(Rodriguez-Crespo et al. 2001; Navarro-Lerida et al. 2004)
Phosphoprotein	Lyssavir. 2	O56780	DYNLL1	KSTEDKSTQTP	139			D,I	C	(Rodriguez-Crespo et al. 2001)
MAP4	Human	P27816	DYNLL1	SRSGSKSTQTV	797			D,I	-	(Rodriguez-Crespo et al. 2001)
Mark3	Rat	Q8VHF0	DYNLL1	VVAYPKRSQTS	429			D,I	-	(Navarro-Lerida et al. 2004)
METT-10	<i>C. elegans</i>	Q09357	dlc-1	LNAWNDAQAY	416			D	E	(Dorsett et al. 2009)
Myosin 5a (MYO5A)	Human	Q9Y4I1	DYNLL2	QPKDDKNTMTD	1281	8,8 0,04†		D,I†	C	(Hodi et al. 2006; Wagner et al. 2006; Radnai et al. 2010)
NEK9	Human	Q8TD19	DYNLL1	VGMHSGKGTQTA	940			D,I	C	(Lo et al. 2001; Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
nNOS (NOS1)	Human	P29475	DYNLL1	AEMKDTGIQVD	226	7; 2,0	1F96, 1CMI	D,I†	E	(Fan et al. 1998; Liang et al. 1999; Rodriguez-Crespo et al. 2001; Lajoix et al. 2004; Radnai et al. 2010)
NRF1	Human	Q16656	DYNLL1	MEEHGVTQTE	1			D,I	C	(Herzig et al. 2000; Lajoix et al. 2004)
NUP159	Yeast	P40477	DYN2	SASADFDVQTS DNYAESGIQTD 1115 VETCNFSVQTF 1164 IPVKHNSSTQTV 1140 KEAVDNGLQTE 1152 PSQNNIGIQTM 1147 ETVVSAAQTII 1164	1102 1115 1164 1140 1152 1147 1164			D,I D,I D,I D,I D,I D,I	C	(Stelter et al. 2007)
Tp53BP1 (TP53BP1)	Human	Q12888	DYNLL1	PSQNNIGIQTM	1147	4,5		D,I	C	(Lo et al. 2005)
PAK1	Human	Q13153	DYNLL1/2	TPTRDVATSPI	212	42	3DVT	D,I†	E	(Vadlamudi et al. 2004; Lightcap et al. 2008; Radnai et al. 2010)
P protein	Rabies virus	P15198	DYNLL1	RSSEDKSTQTT	142			D,I	-	(Raux et al. 2000; Lo et al. 2001; Rodriguez-Crespo et al. 2001)
RACK1 (GNB2L1)	Human	P63244	DYNLL1	LGVCYKTVQDE	135			-	-	(Zhang et al. 2008)
RASGRP3	Human	Q8IV61	DYNLL1	RATTSQATQTE	607			D,I	-	(Okamura et al. 2006)
UL9	HHV-6b	P10193	DYNLL1	GVQMAKSTQTF	744			D,I	C	(Martinez-Moreno et al. 2003)
Spice1	Mouse	Q8K317	DYNLL1	QDVLRRVTQTR	555			D	C	(Navarro-Lerida et al. 2004)
Swallow	Fruit fly	P40688	ddlc1	SATSAKATQTD	286	1,0; 0,62	3E2B	D	C	(Schnorrer et al. 2000; Rodriguez-Crespo et al. 2001; Wang et al. 2004; Benison et al. 2007; Hall et al. 2008)
Syntaphilin (Snph)	Rat	B5DF41	DYNLL1	SCMQERAIQTD	307			D	C	(Chen et al. 2009)
TRPS1	Human	Q9UHF7	DYNLL1	TEKVDKSTQDE	1202			D	E	(Kaiser et al. 2003; Hutchins et al. 2010)
UNC-83	<i>C. elegans</i>	Q23064	dlc-1	DSISDRHIQTM	643			D,I	C	(Fridolfsson et al. 2010)
VP35	Ebolavirus	Q05127	DYNLL1	PKTRNSQIQTD	66			D,I	C	(Kubota et al. 2009)

fehérje neve	szervezet	Uniprot kód	Paralog/ Ortholog	szekvencia*	pozíció	rendezetlenség	CC/ Dimer	hivatkozás
AMBRA1	Human	Q9C0C7	DYNLL1	TSVTSQGT Q TL	1097	D,I	-	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
Astrin (SPAG5)	Human	Q96R06	DYNLL1/2	PETQDSST Q TD	467	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Schmidt et al. 2010)
C20orf117	Human	O94964	DYNLL1	VGLASVGT Q TI	1135	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
p26 CP	BIV	P19558	DYNLL	VQLIESKVREKENA	214	D,I	-	(Su et al. 2010)
CIZ1	Human	Q9ULV3	DYNLL1	KLQKQA Q TS	340	D,I	C	(den Hollander et al. 2006; Hutchins et al. 2010)
Dazl	Mouse	Q64368	DYNLL1	KKSVDRS I QTV	245	D	E	(Lee et al. 2006)
ERα (ESR1)	Human	P03372	DYNLL1	?		D [†]	E	(Rayala et al. 2005)
Ewg	Fruit fly	Q24312	Ddcl1	LSDVDYTT Q TV	536	D,I	E	(Herzig et al. 2000)
Gag	HFV	P14349	DYNLL1	?		D,I	-	(Petit et al. 2003)
Gag	Rice Sirevirus	Q109L4	LC8	IDVGI S CDLLD	467	D	C	(Havecker et al. 2005)
GLCC11	Human	Q86VQ1	DYNLL1	SSTRS I D T Q T P	343	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
gurken mRNA	Fruit fly		Ddcl1	n/a		n/a	n/a	(Rom et al. 2007)
IκBα (NFKBIA)	Human	P25963	DYNLL1	?		D,I [†]	-	(Crepieux et al. 1997; Herzig et al. 2000; Jung et al. 2008)
KIAA0802	Human	Q9Y4B5	DYNLL1	NGSRTMG T Q T V	1622	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
MORC3	Human	Q14149	DYNLL1	DQGNTAAT Q T E	633	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
NudE	Mouse	Q9CZA6	DYNLL1	?		D,I	E	(Feng et al. 2000; Stehman et al. 2007; Kardon et al. 2009)
Phototropin	Vicia	Q8H934	LC8	?		-	-	(Emi et al. 2005)
PKIα	Human	P61925	DYNLL1	?		D,I [†]	-	(Yu et al. 2002)
PTH mRNA	Human		DYNLL1	n/a		n/a	n/a	(Epstein et al. 2000)
RSP3	Chlamy.s	P12759	LC8	KYREDETT Q TL	26	D,I	C	(Yang et al. 2001)
				LPADAT Q T Q TK	58	D,I		
				VPEADT S T Q TD	112	D,I		
Spn-F	Fruit fly	Q9V9Y9	dcl1	?		-		(Giot et al. 2003; Abdu et al. 2006)
								(Hutchins et al. 2010; Nakano et al. 2010)
TPR	Human	P12270	DYNLL1/2	TATVMPT Q VE	1714	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
UHRF1BP1L	Human	A0JNW5	DYNLL1	QRSVT Q AT Q TS	1392	D,I	C	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)
ZMYM3	Human	Q14202	DYNLL1	VEMKSKGS Q T E	848	D,I	-	(Hutchins et al. 2010; Rapali 2011)

3. táblázat: LC8 partnerek, melyekben a kötőmotívumot eddig kísérletes úton még nem határozták meg.

* Feltételezett, de kísérletes úton nem igazolt kötőmotívum.

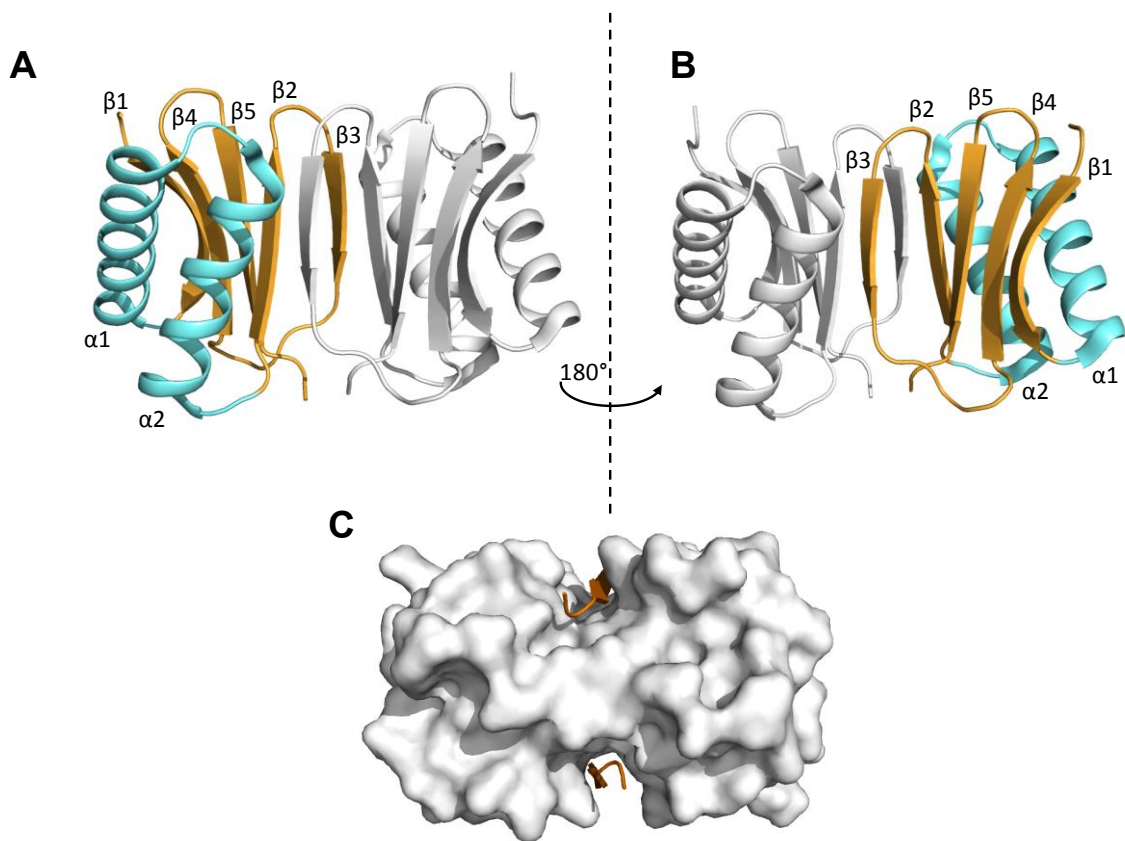
D,I: IUPred és Disprot programmal rendezetlen szerkezetűnek jóslt régió.

C: Coils programmal coiled coil szerkezet jóslható a fehérjében.

E: Kísérletesen igazolt, hogy a fehérje dimer vagy trimer szerkezetű

1.2.2 LC8 szerkezetének ismertetése

Az LC8 két antiparallel α -hélixből ($\alpha 1$ és $\alpha 2$) és négy antiparallel β -lánc ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ és $\beta 5$) alkotta β -redőből felépülő fehérje (Benison et al. 2008). Fiziológias körülmények között általában homodimer formában található, amelynek disszociációs állandója 200 nM alatti (Lightcap et al. 2008). A kialakuló szimmetrikus, homodimer fehérjét egy új β -lánc ($\beta 3'$) kialakulásával járó β -lánc kicserélődés stabilizálja, azaz a kialakuló ötödik $\beta 3'$ -lánc a másik LC8 molekulától származik. A dimerizálódás során a dimerizálódás felszínén két parallel, szimmetrikus kötőárok alakul ki, ezekbe illeszkednek a partnerek lineáris motívumai (ELM) (9. ábra).



9. ábra: LC8 és peptiddel alkotott komplexének szerkezete. A és B ábra: Két határoló α -hélixből ($\alpha 1$ és $\alpha 2$, ciánnal kiemelve) és négy β -láncból ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ és $\beta 5$, narancssárga színnel kiemelve) felépülő LC8 egy újabb β -lánc kialakulása mellett β -lánc kicserélődéssel dimerizálódik. A dimer LC8 molekulák tökéletesen forgásszimmetrikusak. A C ábrán látható, hogy a dimerizálódási felszínén kialakuló parallel kötőárkokba illeszkednek a β -lánc szerkezetű lineáris kötőmotívumok. Az LC8-at szürkével, míg a peptideket sárga színnel kiemelt ki. PDB kód: 1F95. Az ábrát PyMOL segítségével készítettem.

1.2.3 LC8 peptidekkel komplexben alkotott szerkezete

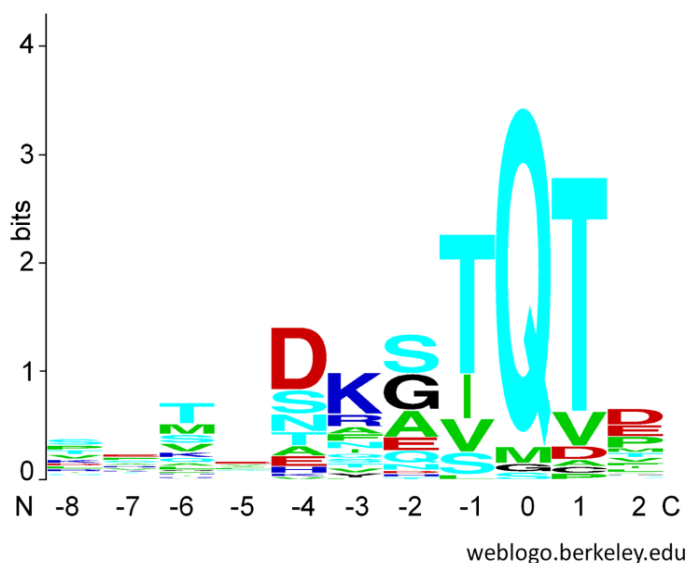
Az LC8 fehérje peptidekkel alkotott komplexeinek kristály- és NMR szerkezetei feltárták, hogy a legkülönbözőbb eredetű peptidek (nNOS, Bim, Pak1, DIC, Swallow stb.) mind a dimerizálódás során kialakuló parallel kötőárkokba kötődnek (**10. ábra**) (Tochio et al. 1998; Liang et al. 1999; Fan et al. 2001; Wang et al. 2003; Makokha et al. 2004; Benison et al. 2007; Williams et al. 2007; Benison et al. 2008). A kötőárkokat az LC8 dimerizálódásának határán található β -láncok és az α 2-hélix hozzák létre. A rendezetlen szerkezetű lineáris kötőmotívumok a kötődés során β -lánc szerkezetet vesznek fel folytatva az LC8 központi β -redő rendszerét (β -Morf lineáris motívum). A motívumok 0-ikként definiált pozíciójában lévő legkonzerváltabb glutamin az LC8 α 2-hélixvégződésénél található Glu35 főlánc NH- és oldallánc karboxil-csoportjával alakít ki hidrogén hidat, ezáltal úgymond „sapkát húz” (*capping*) az α 2-hélixre. A -1. és az első pozícióban található aminosavak (treonin, valin, izoleucin) metil-csoportjai a Phe62, Tyr75 és Leu84, illetve Phe62, Tyr77 és Ala82 aminosavmaradékok által kialakított hidrofób zsebbe illeszkednek. A treoninok hidroxil csoportja a peptidgerinc alatt található szerkezeti vizek által közvetített hidrogénkötésekkel lép kölcsönhatásba az LC8-cal.

Megjegyzendő, hogy az LC8 forgásszimmetrikusan elhelyezkedő kötőárkai és a parallel módon bekötő motívumok lehetővé teszik, hogy dimer-dimer komplex jöjjön létre (Williams et al. 2007). A legtöbb partner esetében valóban kimutatták, hogy ezek vagy stabil dimerek vagy képesek dimerizálódni (**2. táblázat**). Ennek ellenére ezidáig nem vizsgálták részletesen, hogy a dimerképzés képessége hogyan befolyásolja a dimer LC8 különböző partnerekkel létrejövő kölcsönhatását.

1.2.4 Az LC8 által felismert lineáris motívum jellemzői

Mára már különböző szerkezeti (NMR, röntgenszórás) és mutációs vizsgálatokkal (pepscan (Lajoix et al. 2004)), illetve fragmentum analízissel számos, igen különböző partner LC8-kötő régióját meghatározták (**2. táblázat**). Az eddig vizsgált összes esetben az LC8 egy körülbelül nyolc aminosav hosszúságú lineáris motívumot (ELM) ismer fel. Az LC8 motívumok mindig a partnerfehérje rendezetlen régiójában helyezkednek el (IDR) és gyakran valamilyen dimerizáló alegységgel, például szuperhélixszel (*coiled-coil*) határosak. Az ismert partnerek motívumaiból készített LOGO ábrázolás a **10. ábrán** látható. A szekvenciák a **2. táblázatban** találhatóak. A motívum legkonzerváltabb pozíciójában, amit 0. pozíciónak definiálnak, leggyakrabban glutamin található. A 0. pozíciótól amino- és karboxil-terminális

irányban (-1. és 1. pozícióban) leggyakrabban metil- vagy hidroxil-csoportot illetve mindkettőt tartalmazó aminosav, például treonin, szerin, valin vagy izoleucin fordul elő. Mutációs vizsgálatok szerint az 1., 0. és a -1. pozíciókban található aminosavak alaninra cserélése mindig a kölcsönhatás megszűnésével jár, függetlenül attól, hogy a többi pozícióban milyen aminosav található (Lajoix et al. 2004). A -2. pozícióban leggyakrabban valamilyen kis oldalláncú aminosav fordul elő, például szerin, alanin vagy glicin. A -3. pozícióban a pozitív töltésű arginin vagy lizin a leggyakoribb.



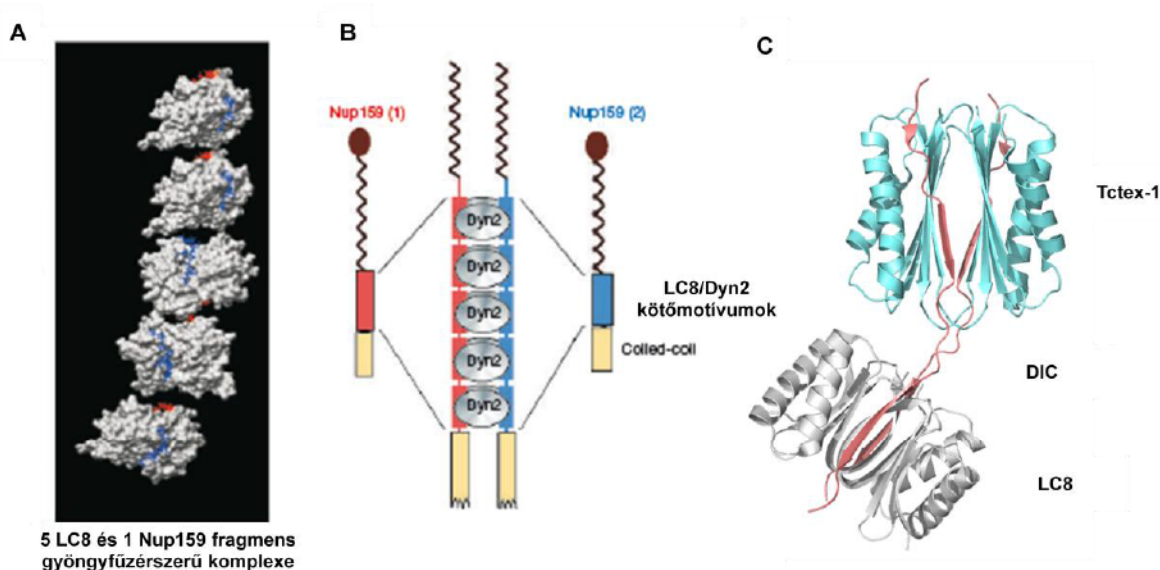
10. ábra: 51 ismert partner motívumaiból készített LOGO szekvencia. Az adott pozíció magassága a konzerváltságot, míg az aminosavak nagysága az adott aminosavnak az adott pozícióban való előfordulási gyakoriságát tükrözi. Az aminosavak színekódja a fizikai-kémiai tulajdonságot jelöli. A motívum legkonzerváltabb pozíciója, melyet 0. pozícióként definiálunk, általában glutamint tartalmaz, melyet a legtöbb esetben izoleucin, valin és treonin aminosavak határolnak. Az ábrát WebLOGO programmal készítettem (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Schneider et al. 1990; Crooks et al. 2004).

A motívumokat szekvenciájuk alapján tradicionálisan két osztályra különítik, $K_{-3}X_{-2}T_{-1}Q_0T_1$ és $I/V_{-1}Q_0V_1D_2$ (ahol az X bármilyen aminosav lehet) (Lo et al. 2001; Rodriguez-Crespo et al. 2001). A $K_{-3}X_{-2}T_{-1}Q_0T_1$ osztályba tartoznak például a Bim és a Bmf pro-apoptotikus fehérjék $P_{-8}M_{-7}S_{-6}C_{-5}D_{-4}K_{-3}S_{-2}T_{-1}Q_0T_1P_2$ és $T_{-8}S_{-7}Q_{-6}E_{-5}D_{-4}K_{-3}A_{-2}T_{-1}Q_0T_1L_2$ vagy a dinein intermedier lánc (DIC) $T_{-8}L_{-7}V_{-6}Y_{-5}T_{-4}K_{-3}Q_{-2}T_{-1}Q_0T_1T_2$ motívumai. Az $I/V_{-1}Q_0V_1D_2$ osztály tagjai például az nNOS enzim $A_{-8}E_{-7}M_{-6}K_{-5}D_{-4}T_{-3}G_{-2}L_{-1}Q_0V_1D_2$ vagy a GKAP fehérje $N_{-8}R_{-7}C_{-6}L_{-5}S_{-4}L_3G_{-2}L_1Q_0V_1D_2$ motívumai. Kevés partner esetében ugyan, de azonosítottak olyan úgynevezett „nem kanonikus” motívumokat is, melyek 0-ik pozíciójában nem glutamin található, sőt olyat is,

amely szekvenciális alapon egyáltalán nem sorolható be a $K_3X_2T_1Q_0T_1$ vagy az $I/V_1Q_0V_1D_2$ osztályokba. Ilyenek például a miozin-5a $Q_8P_7K_6D_5D_4K_3N_2T_1M_0T_1D_2$, a GRNL1 $T_8E_7V_6E_5T_4R_3E_2I_1G_0V_1G_2$, a KIBRA $A_8L_7K_6V_5D_4K_3E_2T_1N_0T_1E_2$ vagy a Pak1 $T_8P_7T_6R_5D_4V_3A_2T_1S_0P_1I_2$ motívumai. NMR- és kristályszerkezeti tanulmányokban meghatározták, hogy ezek a „nem kanonikus” motívumok is ugyanazokba az LC8 kötőárkokba kötődnek, mint a „kanonikus” motívumok (Hodi et al. 2006; Lightcap et al. 2008; Garcia-Mayoral et al. 2010)². Még a „kanonikus” motívumoktól leginkább eltérő Pak1 kötőszekvencia is ugyanide köt, bár ebben az esetben a kölcsönhatás a megszokottól eltérően, szerkezeti vizek által közvetített hidrogénhid hálózaton keresztül valósul meg (Lightcap et al. 2008). Ez a megfigyelés cáfolni látszik azt a korábbi feltételezést, hogy az LC8 a „kanonikus” és „nem kanonikus” motívumokat egyidejűleg kötve heterotrimer komplexet alakíthat ki, ami magyarázhatná az LC8 szállítmány-adapter funkcióját.

Ismertek olyan partnerek, melyek egyszerre több LC8 molekulát is képesek megkötni. A Tp53bp1 és a GKAP1 fehérjén egymás után két felismerő hely is található. Az egyik legújabban azonosított LC8 partnerben, a Chica fehérjében – ami a mitotikus orsó pozicionálásában játszik kulcsszerepet – egymás után három motívum található. A sejtmagi transzportban szerepet játszó Nup159 rendezetlen régiójában tandem módon öt LC8 kötőmotívum helyezkedik el (Stelter et al. 2007). A komplex gyöngyfűzér-szerű szerkezetet alakít ki. Bár a DIC-en csak egy LC8 felismerő hely van, de annak közvetlen közelében egy másik dinein könnyűlánc, a Tctex-1 is kapcsolódik (Williams et al. 2007). Az így kialakuló szerkezet hasonló a Nup159 esetében említett gyöngyfűzér-szerű szerkezethez (**11. ábra**).

²Radnai László, Rapali Péter, Bodor Andrea, Perczel András és Nyitray László eddig nem publikált eredményei.



11. ábra: A Nup159 rendezetlen régiójában egymás után öt LC8 kötőmotívum helyezkedik el. A kialakuló LC8-Nup159 komplex gyöngyfűzés-szerű szerkezetet vesz fel, melynek elektronmikroszkópos felvételéből rekonstruált képét mutatja az A ábra. A B ábra a teljes hosszúságú Nup159 és LC8 komplex sematikus modelljét mutatja. A C ábrán Tctex-1-DIC-LC8 hármas komplex látható. A DIC-en a két dinein könnyűlánc, a Tctex-1 és az LC8 a Nup159-LC8 gyöngyfűzés-szerű szerkezetéhez hasonló módon helyezkedik el. A C ábrát PyMOL programmal a 2PG1 PDB kóddal jelzett kristályszerkezet alapján készítettem el. Forrás: (Stelter et al. 2007).

1.2.5 LC8 dinein könnyűlánc paralóg fehérjék összehasonlítása

Az LC8-nak két gerinces paralógiát azonosították, DYNLL1 és DYNLL2. A két, 83 aminosavas paralóg fehérje mindössze 6 pozícióban tér el egymástól (93 %-os az egyezés) (12. ábra). Figyelemreméltó módon mindegyik különbség a molekula két α -hélixében, a kötőárokktól távol található (12. ábra). Az LC8 ortológok összehasonlítása során feltárt különbségek szintén a fehérje felszínén lokalizálódnak, míg a partnerek megkötéséért felelős kötőárok konzerváltak.

A kötőárok konzerváltságának ellenére egyes fehérjék esetében az irodalom csak a DYNLL1-et vagy csak a DYNLL2-t jelöli meg partnerként. Például a Bmf esetében a DYNLL2-t, míg az nNOS esetében a DYNLL1-et azonosították kizárólagos partnerként (Jaffrey et al. 1996; Puthalakath et al. 2001). Day és munkatársai a két paralóg *in vivo* partnerspecificitása között különbséget találtak. *In vivo* a DYNLL1 csak a dineinnel, míg a DYNLL2 csak a miozin-5a motorfehérjével együtt alkotott komplexet. Ha a két paralóg között található 6 eltérés közül az egyik különbséget megszüntették, nevezetesen ha a 41. pozícióban található Tyr illetve His csoportokat egymással felcserélték, akkor az *in vivo* partnerspecificitás is felcserélődött (12. ábra) (Day et al. 2004).

DYNLL2 M^SDRKAVIKNADMSE^DMQQDA^VDCATQAM^EKEYNIEKDIAA^YIKKEFDKKYNPTWHCIVGR 60

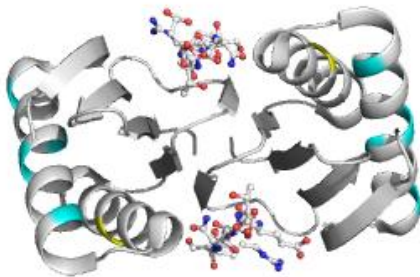
DYNLL1 M^CDRKAVIKNADMSE^EMQQDS^VECATQAL^EKEYNIEKDIAA^HIKKEFDKKYNPTWHCIVGR 60

* .*****:*****:*:*****:*****:*****

DYNLL2 NFGSYVTHETKHFIFYLQVAILL^FFKSG 89

DYNLL1 NFGSYVTHETKHFIFYLQVAILL^FFKSG 89

B



12. ábra: A DYNLL1 és a DYNLL2 humán LC8 paralógok szekvencia összehasonlítása (A). A 83 aminosav hosszúságú LC8 fehérje csak hat pozícióban mutat eltérést, azonban ezek a különbségek mind a kötőárkokon kívül, az α -hélixekben találhatóak (B). Az *in vivo* észlelt partnerspecificitásért felelőssé tett 41-es pozíciót sárga színnel, míg a többi citránnal emeltem ki. A B ábrát a PyMOL program felhasználásával készítettem PDB adatbázisban található 1F95 szerkezet felhasználásával.

1.2.6 Az LC8 és partnerei között kialakuló kölcsönhatás szabályozása

Az LC8 dimerizációs felszínén található His55 oldalláncok alacsony pH értéken ($\text{pH} < 6$) protonálódnak. A protonálódás során az extra pozitív töltések elektrosztatikus taszítása miatt monomer irányba tolódik az LC8 monomer-dimer egyensúlya. A monomer LC8 a kötőárkok hiánya miatt nem képes partnerei kötésére (Barbar et al. 2001; Wang et al. 2003; Makokha et al. 2004; Nyarko et al. 2005). Hasonló hatása van a 88. pozícióban található szerin oldallánc foszforilálásának, illetve az ezt mimikáló szerin-glutamát cserének (Song et al. 2007; Song et al. 2008). A foszfo-szerin vagy a glutamát oldallánc extra negatív töltései miatt fellépő taszítóerő növeli a dimer LC8 disszociációs állandóját. Bár az egyelőre nem ismert, hogy melyik kináz foszforilálja a 88-as szerin oldalláncot³ (Lightcap et al. 2008), mindkét mechanizmus, azaz a sejtben előforduló lokális pH csökkenés vagy a 88-as szerin

³ Korábban a Pak1 kinázzról feltételezték, hogy foszforilálja az LC8-at, azonban a legújabb eredmények ennek ellentmondanak.

foszforilációja hatásosan szabályozhatja az LC8-nak, mint csomóponti fehérjének partnerkötését.

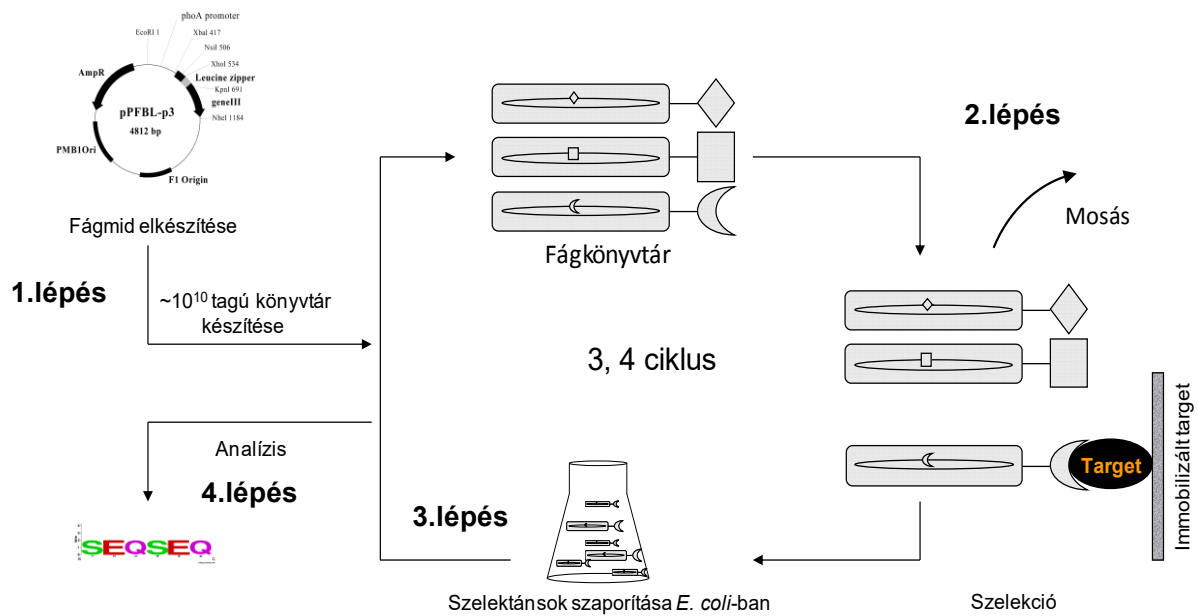
Az LC8 és partnereinek kölcsönhatása a partner oldaláról is szabályozható. Lei és munkatársai kimutatták, hogy a Bim pro-apoptotikus fehérje *in vivo* szubsztrátja a JNK szerin-treonin kináznak, amely foszforilálja az LC8 kötőmotívum 1. pozíciójában található treonint (P₈M₇S₆C₅D₄K₃S₂T₁Q₀T₁P₂P₃). Ez a poszt-transzlációs módosítás teljesen megszünteti az LC8 és a pro-apoptotikus fehérje közötti kölcsönhatást és megnöveli vesesejtek UV kezeléssel szembeni apoptotikus hajlamát (Lei et al. 2003).

1.3 Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata irányított evolúciós megközelítéssel; fág-bemutató módszerének részletezése

Doktori munkám túlmutat az LC8 könnyűlánc és a természetből ismert kötőpartnerei között kialakuló kölcsönhatások általános biofizikai és biokémiai jellemzésén. A ma már klasszikusnak számító, egyedi mutánsok összehasonlításán alapuló fehérjemérnöki vizsgálatokon felül ugyanis egy átfogó, nagy-áteresztőképességű megközelítést, az irányított fehérjeevolúciót is alkalmaztam. Egy hatalmas peptidkönyvtárból, amelyet M13 fág felszínén jelenítettem meg, LC8-kötő peptideket szelektáltam, és így feltártam, hogy az LC8 kötőárkához milyen kötőszekvencia mintázat evolválódik. A könnyebb megértés kedvéért ebben a fejezetben röviden összegzem a fág-bemutató lényegét, főbb alapelveit (**13. ábra**).

Az irányított fehérjeevolúciónak számos konkrét megvalósítási módja ismert. Ilyen például a fág-bemutató, a riboszóma-bemutató, a baktérium-bemutató vagy az *in vitro* kompartmentáció. Ezen módszerek mindegyikére igaz, hogy nem egyedi mutációk hatását vizsgálják. E helyett kombinatorikus mutagenézissel létrehozott, akár milliárdos méretű variáns könyvtárból evolválnak. Egy-egy esetben, amikor egyszerre csak 6-7 aminosav pozíciót vizsgálunk, akár az összes lehetséges mutáns létrehozható. Közös jellemzőjük továbbá, hogy a vizsgálandó fehérje és az azt kódoló gén fizikailag összekapcsolódik egymással. A génből könyvtárat létrehozva, és minden kódolt fehérjevariánst a saját génjéhez kapcsolva irányított evolúciós rendszer jön létre. A fehérje valamely tulajdonsága alapján kisselektálva a megfelelő fehérje variánsokat, azokkal együtt szelektálódik a kódoló gén. A kisselektált géneket felszaporítva pár szelekciós ciklus alatt egy adott tulajdonságra evolválódott fehérje variáns sereg birtokába kerülünk. Ezek szekvenciája a kódoló DNS-en keresztül könnyen meghatározható, és statisztikai analízis alá vethető. A három lépés (diverzifikáció, szelekció és a szelektált könyvtártagok felszaporítása) ciklikus ismétlésével laboratóriumi körülmények között mimikálható a természetes evolúció. Csakhogy, míg a természetes evolúcióban egyidejűleg számos szelekciós tényező van, és ezért gyakran nehéz magyarázni, hogy egy-egy tulajdonság miért evolválódott, az irányított eljárásban általában egyetlen tulajdonság mentén evolválunk, így az értelmezés is egyszerűbb. Kideríthető, hogy a vizsgált tulajdonság kialakításában az egyes pozícióknak mekkora a szerepük. Az is meghatározható, hogy az egyes pozíciókban melyek a tulajdonság szempontjából optimális aminosavak (ezek felszaporodnak), és melyek azok, amik károsak (ezeket a szelekció eltávolítja) (Bonsor et al. 2011). Végül soron meghatározható, hogy a szelektált tulajdonságnak mely aminosav sorrend mintázat felel meg. Ebből az átfogó jellegből adódóan

a nagy-áteresztőképességű irányított evolúciós megközelítések során kevesebb előítélettel terhelt a kísérlettervezés, mint amikor egyedi mutációkat visznek be. Ez utóbbi esetben ugyanis csak kevés variáns vizsgálatára kerül sor, és óhatatlanul valamilyen prekonceptió alapján kerül be egy-egy variáns a vizsgálandók körébe.



13. ábra: Fág-bemutató sématis magyarázó ábrája.

1. lépés: **Randomizáció.** A fág-bemutató során a fágok felületén „bemutató” fehérjét géntechnológiai módszerek segítségével a fág saját burokféhrjéhez fuzionáljuk. Géntechnológiai módszerekkel történő randomizálási lépés után a fágmid könyvtárból közvetlenül 10¹⁰-es nagyságrendű fág-könyvtárat készítünk.

2. lépés: **Szelekció.** Minden egyes fág egyfajta fehérjét kódol és jelenít meg a felszínén. A fágok genotípusa és fenotípusa tehát fizikailag kapcsolt. Affinitáson alapuló szelekciós lépés során a célmolekulához nem kapcsolódó fágokat eltávolítjuk, lemossuk.

3. lépés: **Felszaporítás.** A szelektált könyvtáragokat *E. coli* baktériumban sokszorozítjuk.

Az 1-től a 3-ik lépés 2-5-ig tartó ismétlésével a target molekulához specifikusan kötődő könyvtáragok feldúsulnak.

4. lépés: **Analízis.** A specifikusan kötődő könyvtáragok „bemutató” fehérjéinek DNS szekvenciája, így aminosav sorrendje is meghatározható.

Az irányított evolúciós módszerek segítségével jellemezhetőek a természetben létrejött fehérje-fehérje kölcsönhatások, illetve létrehozhatók újfajta, a természetből nem ismert, vagy a természetből ismertnél hatékonyabb kölcsönhatások. Ezáltal például újfajta inhibitorok, vagy az eredeténél hatásosabb enzimek is ki fejleszthetőek. A fág-bemutató kiválóan alkalmas ELM-ek tanulmányozására, jellemzésére és ezek alapján új fehérje-fehérje kölcsönhatások létrehozására is (Sidhu et al. 2000; Sidhu et al. 2007; Bonsor et al. 2011). A módszert eddig sikeresen alkalmazták már a PDZ (Fuh et al. 2000; Laura et al. 2002; Zhang et

al. 2006; Tonikian et al. 2007; Zhang et al. 2007; Tonikian et al. 2008), a PTB (Dente et al. 1997), az SH3 (Feng et al. 1995; Rickles et al. 1995; Sparks et al. 1996) és a WW domének esetében (Kasanov et al. 2001).

Fág-bemutatók esetében leggyakrabban az M13 fágot alkalmazzák, a vizsgálandó fehérjét vagy peptidet ennek a fonális bakteriofágnak a felületén, a p3 vagy p8 burokfehérjéjéhez fuzionáltatva jelenítik meg. A p3 fehérje 3-5, míg a p8 körülbelül 2700 kópiában fordul elő fágként. A bemutatás módja ettől, és a burokbaépülés hatékonyságától függően lehet monovalens (fágként átlagosan egy, vagy kevesebb), illetve polivalens (fágként átlagosan egynél több). A polivalens bemutatás során szimultán több kötőhelyen keresztüli kötésre nyílik lehetőség, ezért az aviditás (látszólagos kötéserősség növekedés) jelensége miatt a gyengén kötődő fágok is szelektálódhatnak. Polivalens bemutatás használatával szélesebb spektrumú kötémintázatot kaphatunk (Sidhu et al. 2000). A fágokon mind lineáris peptidok, mind meghatározott szerkezettel rendelkező teljes fehérjék kifejezhetőek. Utóbbiak az irányított evolúció során egyfajta hordozó állványként is használhatóak. A vizsgálandó fehérje diverzifikációja géntechnológiai módszerekkel („*error-prone*” PCR, DNS „*shuffling*” vagy szintetikus oligonukleotiddal irányított mutagenézis) történik. Bármelyikről is legyen szó, a könyvtár méretének korlátot szab a fágokkal egyidejűleg fertőzhető baktériumok száma. Emiatt legfeljebb $\sim 10^{10}$ tagszámú fágmid könyvtár hozható létre (Labrou 2010; Dalby 2011). A könyvtár létrehozható úgy is, hogy M13 fág genomba építjük a vizsgálandó fehérje vagy peptid génjét. Bár ilyen fág-alapú vektorokat is használnak, manapság elterjedtebbek a fágmid-vektorok. Ezek a fág genomból csak azt a részt tartalmazzák, ami lehetővé teszi, hogy az összes fágfehérje jelenlétében fág genomként szaporodjanak, és fág burokba pakolódjanak. A fág-bemutatóra használt fágmidok csak azt a fágfehérjét kódolják, amely fúziós tagként szolgál a bemutatásnál. Az összes többi fágfehérjét egy párhuzamosan beadott segítő (*helper*) fág biztosítja. A fágmid vektorok a sejtben alapesetben plazmidként szaporodnak, de amint a sejtek M13 helper faggal fertőződnek, a fágmid fág részecskébe pakolódik, és fertőzőképes formában hagyja el a sejtet. Így készíthető fágmid DNS könyvtárból kiindulva fágkönyvtár. Az egyes pozíciókat lehet akár teljesen – azaz mind a 20 természetes aminosav előfordulását megengedve – vagy részlegesen randomizálni. Az egyes pozíciókat akkor érdemes teljesen randomizálni, azaz naiv könyvtárat készíteni, ha nincs kiindulási információnk, ami alapján szűkíthetnénk a pozíciókenti variációk számát, vagy ha nem akarunk előzetes – esetleg téves – információkat figyelembe venni. Ebben az esetben egy pozíciót DNS szinten 32 különböző NNK vagy NNS kodon kódolhat (ahol az N mind a 4 bázispárt kódolja és a K csak guanint és timint, az S csak guanint és citocint enged meg) (Sidhu et al. 2000). A teljes szekvenciater

lefedése érdekében a gyakorlatban elérhető 10^{10} tagszámú fágmid könyvtár használatával legfeljebb 6-7 pozíció randomizálható teljesen ($32^7 = 3,4 \times 10^{10}$).

A szelekciós lépés során a fágkönyvtárat szilárd felülethez rögzített célfehérjére visszük. A felülethez nem kapcsolódó könyvtártagokat mosási lépések során eltávolítjuk. A specifikusan a célfehérjével kölcsönható fágokat eluálhatjuk, majd *E. coli*-ban szaporíthatjuk. A szelekciós ciklus 2-4 alkalommal történő ismétlésével a specifikusan kötődő fágok feldúsulnak. Az egyes fágokon bemutatott fehérje szekvenciája a kódoló gén DNS-szekvenálásával azonosítható.

2. Célkitűzések

2.1 Előzmények és kérdések

Az LC8 dinein könnyűlánc egy univerzálisan előforduló, konzervált eukarióta csomóponti fehérje. Doktori tanulmányaim kezdetén már tucatnál is több partnerét azonosították, melyek igen szerteágazó folyamatokban vesznek részt (**2. és 3. táblázat**). Számos esetben a közvetlen kötőmotívumot is azonosították. A motívumok igen változatos aminosav összetétellel rendelkeznek. Szekvencia hasonlóság alapján $K_3X_2T_1Q_0T_1$, $L_1Q_0V_1D_2$ és nem-kanonikus családokat definiálnak.

Az LC8 fehérjének ezen felül két gerinces paralógiát is azonosították (DYNLL1 és DYNLL2). A 89 aminosav hosszúságú izoformák között csupán 6 aminosavnyi eltérés azonosítható. Bár a DYNLL1 és a DYNLL2 paralógok szekvenciája és szerkezete is nagy hasonlóságot mutat, illetve mindkettő mindenhol megtalálható a sejtekben, Day és munkatársai kimutatták, hogy *in vivo* specifikusan kötik partnereiket (Day et al. 2004). Ezen felül vannak olyan fehérjék, melyeket az irodalom csak DYNLL1 vagy csak DYNLL2 partnerként említ. A Bmf esetében a DYNLL2-t, míg az nNOS esetében a DYNLL1-et azonosították partnerként (Jaffrey et al. 1996; Puthalakath et al. 2001). A két partner eltérő motívumcsaládba tartozik (Bmf: $K_3A_2T_1Q_0T_1D_2$, nNOS: $T_3G_2L_1Q_0V_1D_2$). Felmerül a kérdés, hogy a két paralóg a hasonló motívummal rendelkező partnerek között milyen módon tud különbséget tenni. Esetleg az egyes motívumcsaládokat a paralógok más-más módon kötik? Mi az alapja az *in vivo* tapasztalt partner-specifitásnak?

Annak ellenére, hogy az irodalom elkülöníti az egyes motívumcsaládokat, korábban nem vizsgálták, hogy a különböző családok funkcionálisan, a kötődés mechanizmusát tekintve is elkülönülnek-e. Mi dönti el, hogy az LC8 a sejtekben egy időben megtalálható nagyszámú partner közül vajon melyikhez kötődik? Az irodalomban számos tanulmány foglalkozik az LC8 és a motívumok között kialakuló kölcsönhatással. A különböző módszerekkel, különböző fajokból származó fehérjéken meghatározott affinitás értékek a hasonló motívumok esetében is a 100 nM értéktől a 100 μ M értékig terjedően nagy változatosságot mutatnak (Hodi et al. 2006; Wagner et al. 2006; Hall et al. 2008; Lightcap et al. 2008; Song et al. 2008). Megjegyzendő, hogy az LC8 funkcionális egysége homodimer, ami két, parallel elhelyezkedő kötőárkot tartalmaz. A legtöbb partner esetében kimutatták, hogy vagy dimer, vagy képes dimerizálódni. Annak ellenére, hogy az LC8 és partnerei nagy valószínűséggel

dimer-dimer komplexet alkotnak, kvantitatív módon még nem vizsgálták a dimerizációnak a kölcsönhatásra kifejtett hatását. Felmerül a kérdés, hogy milyen mechanizmussal kötődnek az egyes motívumok. Azonosítható-e különbség az egyes családok között? A partnerek dimerizációja befolyásolja-e a kölcsönhatást? Előfordulhat-e, hogy az irodalomban fellelhető, azonos, vagy nagyon hasonló motívumokra vonatkozó nagyon eltérő affinitási értékek annak tudjhatók be, hogy az egyik esetben monomer, a másik esetben dimer volt az LC8 kötőpartnere?

Az LC8 csomóponti fehérje működése többféle poszt-transzlációs módosítás révén szabályozható. Az LC8 88-as szerinjének foszforilációja eltolja a fehérje dimer-monomer egyensúlyát a monomer állapot irányába. A monomer LC8 a kötőárok hiányában nem képes megkötni partnereit (Song et al. 2007; Song et al. 2008). Vajon a partnerek dimerizációja hatással van-e az LC8 monomer-dimer egyensúlyára?

2.2 Célok pontokba foglalva

Doktori munkám során célul tűztem ki az LC8 és fehérjepartnerei közötti kölcsönhatás tanulmányozását, továbbá ezek alapján kölcsönhatási hálózatának feltárását:

- Az LC8 dinein könnyűlánc humán paralógok (DYNLL1 és DYNLL2) összehasonlítása a hozzájuk kötődő motívumok specificitásának *in vitro* meghatározásával
- Az LC8 dinein könnyűlánc kötésének termodinamikai és kinetikai jellemzése, a különböző motívumcsaládokra fókuszálva
- Annak vizsgálata, hogy a partnerek dimer szerkezete miként befolyásolja a kötése erősséget, a kötés kinetikáját, illetve ezeknek van-e szerepe az LC8 szabályozásában
- A kötőmotívum átfogó elemzése nagy-áteresztőképességű, *in vitro* irányított evolúciós megközelítéssel, fág-bemutató módszerrel
- A fág-bemutató során meghatározott kötőszekvencia-mintázat alapján nagy affinitású, kompetitív gátlószerként használható peptid kifejlesztése
- A fág-bemutató során meghatározott kötőszekvencia-mintázat alapján LC8 partnerek jóslása a humán proteomban, eddig nem azonosított partnerek keresése
- A jóslott partnerek egy részének kísérletes ellenőrzése

3. Anyagok és módszerek

3.1 *E. coli* heterológ expresszióhoz szükséges DNS konstrukciók elkészítése⁴

Ezeket a konstrukciókat részben én magam, részben mások készítették az alábbiak szerint.

A humán DYNLL2-t kódoló DNS szakaszt (Uniprot kód: Q96FJ2) Hódi Zsuzsa amplifikálta PCR-rel agyi cDNS-ből (*RevertAid First cDNA synthesis kit*, Fermentas). A PCR terméket *NdeI* és *EcoRI* restrikciós endonukleázzal való emésztés után pET-15b vektorba klónoztta (Novagen).

Ugyancsak Ő sokszorozta PCR segítségével a humán miozin-5a 1275-től 1297-ig tartó fragmentumát (Uniprot kód: Q9Y4I1) kódoló DNS szakaszt human hasnyálmirigy cDNS könyvtárból, amit *BamHI* és *EcoRI* restrikciós enzimek segítségével pGEX4T-1 expressziós vektorba klónozott (Amersham). A leucin-cipzár által stabilizált dimer miozin-5a fragmentum előállításánál a miozin fragmentumot kódoló DNS-t (1209-1320) PCR segítségével sokszorosította. Az így előállított DNS-nek mind az 5', mind a 3' végéhez a GCN4 élesztő transzkripciós faktor (Uniprot kód: P03069) leucin-cipzár szekvenciáját illesztette megaprimert PCR módszer segítségével. A végső PCR terméket pET-15b vektorba klónoztta *NdeI* és *BglII/BamHI* restrikciós enzimek segítségével.

A DYNLL2 Ser88Glu mutáns változat esetében a szerin-glutamát cserét szintén Hódi Zsuzsa készítette mutáns oligonukleotid és templátként vad típusú DYNLL2 DNS-ének felhasználásával.

A humán DYNLL1 (Uniprot kód: P63167), a humán Bmf (Uniprot kód: Q96LC9) és a humán Pak1 (Uniprot kód: Q13153) DNS templátokat Dr. Ignacio Rodríguez-Crespo-tól, Mark G. Hindstől és Rakesh Kumartól kaptuk. A DYNLL1 (1-89), a Bmf (1-159) és a Pak1 (203-268) megfelelő DNS szakaszait Hódi Zsuzsa sokszorosította PCR-rel és *NdeI*, *EcoRI* restrikciós enzimek segítségével pET-15b vektorba szubklónoztta. Szintén Ő klónoztta a DYNLL1-t kódoló DNS-t *EcoRI* és *SalI* restrikciós enzimek használatával pmCherry-C1 vektorba (Clontech).

⁴ A kísérletekhez használt *DYNLL1-pET-15b*, *DYNLL2-pET-15b*, *DYNLL1-pGEX4T-1*, *monomer miozin-5a (1275-1297)-pGEX4T-1*, *dimer miozin-5a (1275-1297)-pET-15b*, *Bmf-pET-15b*, *Pak1-pET-15b* konstrukciókat Hódi Zsuzsa készítette el (3. táblázat) (Hodi et al. 2006). A dimerizált *Bmf (64-73)*, az *ATMIN (475-823)*, illetve a *VSRGTQTE*, *GSRGTQTE*, *VDKSTQTD* és *GDKSTQTD* peptidek klónozását magam végeztem.

Glutation-S-transzferáz (GST) fuzionált DYNLL1 elkészítése során templátként a korábban említett pET-15b vektorba klónozott szekvenciát használta, majd *BamHI* és *NdeI* restriktív enzimek segítségével pGEX4T-1 (Amersham) vektorba klónozza.

Fehérje	Uniprot	Szakasz	Vektor	Cimke	Restriktív enzimek
dinein könnyű lánc 1 (DYNLL1)	P63167	1-89	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
dinein könnyű lánc 1 (DYNLL1)	P63167	1-89	pmCherry-C1	mCherry	<i>EcoRI, SalI</i>
Atmin	O43313	475-823	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
dimer GSRGTQTE, VSRGTQTE, GDKSTQTD, VDKSTQTD	-	-	módosított pET	GST	<i>BamHI, BglII</i>
dinein könnyű lánc 2 (DYNLL2)	Q96FJ2	1-89	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
dinein könnyű lánc 2 S88E (DYNLL2 S88E)	Q96FJ2	1-89	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
monomer miozin 5a	Q9Y4I1	1275-1297	pGEX4T-1	GST	<i>BamHI, EcoRI</i>
dimer miozin 5a	Q9Y4I1	1209-1320	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, BamHI/BglII</i>
Bmf (Bcl-2-modifying factor)	Q96LC9	1-159	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
dimer Bmf (Bcl-2-modifying factor)**	Q96LC9	64-73	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, BamHI/BglII</i>
EML3	Q32P44	8-94	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>
Pak1 (p21-activated kinase 1)	Q13153	203-268	pET-15b	6xHis	<i>NdeI, EcoRI</i>

3. táblázat: A kísérletek során használt DNS konstrukciók.

A dimerizált Bmf (64-73) fragmentumot és a VSRGTQTE, GSRGTQTE, VDKSTQTD és GDKSTQTD szekvenciákat tartalmazó konstrukciókat magam készítettem el, ennek során a peptideket kódoló DNS-t PCR segítségével a GCN4 élesztő transzkripció faktor (Uniprot kód: P03069) leucin-cipzár szekvenciájának (250-281) 5' végéhez illesztettem. A GCN4 leucin-cipzárt kódoló DNS élesztő cDNS könyvtárból származik. A Bmf fragmentum esetében a PCR termékét *NdeI* és *BglII/BamHI* restriktív enzim felhasználása után pET-15b vektorba ligáltam. A többi peptid esetében a PCR terméket *BamHI* és *BglII* enzimek használata után módosított pET vektorba ligáltam. A módosított pET vektor amino-terminális glutation-S-transzferáz fúziós címkét, illetve a címke és az inszert között TEV proteáz felismerő helyet tartalmaz.

A humán ATMIN (Uniprot kód: O43313) 475-től 823-ig tartó szakaszát kódoló DNS szakaszokat az ATMIN (1-823)-peGFP-C1 konstrukciót templátként felhasználva PCR segítségével sokszorozítottam, majd *NdeI* és *EcoRI* restriktív enzimek felhasználásával pET-15b vektorba klónoztam. Az ATMIN (1-823)-peGFP-C1 konstrukciót Dr. Behrens kutatócsoportjától kaptuk. (Cancer Research Institute, London).

3.2 E. coli heterológ fehérje expresszió és a rekombináns fehérjék tisztítása

Az amino terminálison 6xHis címkét tartalmazó DYNLL1-, DYNLL2 Ser88Glu- és DYNLL2 fehérjéket BL21-(DE3) Rosetta (Novagen), míg a GST-t és az amino-terminálison

GST címkét tartalmazó, GCN4 leucin-cipzárral fuzionált VSRGTQTE, GSRGTQTE, VDKSTQTD és GDKSTQTD peptideket *E. coli* BL21-(DE3)Star sejtekben (Novagen) termeltetem túl. A sejteket 100 µg/ml ampicillin antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban 37°C-on 1.5 OD₆₀₀ értékig növesztettem, majd 0.5 mM IPTG-vel indukálva 18°C-on 12 órán át rázattam. A 6xHis fúziós fehérjét ProfinityTM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-RAD), a GST fúziós fehérjét GST-BindTM Resin (Novagen) gyöngyök segítségével affinitás kromatográfiával tisztítottam. A címkéket proteolitikus úton távolítottam el. Ehhez a GST címkés GCN4 leucin-cipzár fuzionált peptidek esetében TEV proteázt, míg a 6xHis címkés többi fehérje esetében egy dialízis lépést követően (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM Na-azid, 3 mM 2-merkaptotanol, pH = 8,4) trombint használtam. A DYNLL1, a DYNLL2, DYNLL2 Ser88Glu és a GST fuzionált DYNLL1 fehérjét 10 mM Tris-t, 10 mM NaCl-t tartalmazó pufferben (pH = 8,4) dializáltam, majd anioncsere kromatográfia során, HiTrapQ ion-exchange oszlop (Amersham) használatával tovább tisztítottam. Az elúció lineáris sókoncentráció gradienssel történt, a fehérjék 100 mM NaCl koncentráció körül eluálódtak. A GCN4 leucin-cipzárral fuzionált VSRGTQTE, GSRGTQTE, VDKSTQTD és GDKSTQTD peptidek esetében a lehasított GST fehérjét 10 percig tartó forralással, majd centrifugálással távolítottam el. A felülúszóban maradt GCN4 leucin-cipzárral fuzionált peptideket fordítottfázisú HPLC segítségével, Jupiter 300 C18 300 E 10x250 oszlopon (Phenomenex) tisztítottam tovább. A fehérjék tömegét minden esetben tömegspektrometriás méréssel ellenőriztem Kékesi Katalin közreműködésével. A fehérjéket folyékony nitrogénben történő fagyasztás után -80°C-on tároltam. A fehérjék koncentrációját a 280 nm mért fényelnyelés alapján, a számított moláris extinkciós állandó alapján határoztuk meg.

3.3 Szilárd fázisú peptid szintézis

A szilárd fázison történő peptidek szintézisét (Bmf (Uniprot kód: Q96LC9, 64-TSQEDKATQTL-73), nNOS (Uniprot kód: P29475, 232-EMKDTGIQVDRDL-244, GKAP (Uniprot kód: O14490, 671-PSKFQSVGVQVEEEy-684), ATMIN (Uniprot kód: O43313, 667-ySLDIETQTDFLL-678) és TP53bp1 (Uniprot kód: Q12888, 1165-yETVSAATQTIKNV-1177)), illetve VSRGTQTE, GSRGTQTE, VDKSTQTD és GDKSTQTD peptidek) Dr. Patthy András készítette el ABI 431A Peptide Synthesizer segítségével Fmoc (9-fluorenil-metiloxi-karbonil-) védőcsoport használata mellett az ELTE Biokémiai Tanszéken. A VSRGTQTE, GSRGTQTE, VDKSTQTD és GDKSTQTD peptidek amino-terminálisát acetilálással blokkolta. Az amino-terminálisán fluoreszcenciával jelölt Bmf

peptid esetében a szilárd fázisról való lehasítás előtt az amino-terminális amino-csoportjára 5(6)-karboxyfluoreszceint kapcsolt.

A szintézis után a peptideket fordítottfázisú HPLC segítségével, Jupiter 300 C18 300 E 10x250 oszlopon (Phenomenex) tisztítottuk. A tisztított peptidek tömegét Kékesi Katalinnal közreműködve tömegspektrométerrel ellenőriztem. Liofilizálás után a peptideket -20°C-on tároltam. Tirozin és triptofán aminosavak hiányában a peptid oldatok pontos koncentrációját aminosav analízis segítségével határoztam meg. A TP53bp1, az ATMIN és a GKAP peptideket extra tirozinnal láttam el (a plusz tirozint kis betűvel jelöltem). Ezekben az esetekben a peptidek koncentrációját a tirozin oldalláncok 280 nm mért fényelnyelése alapján, a számított moláris extinkciós állandó felhasználásával határoztam meg.

3.4 Izotermális titráló kalorimetria⁵

Az izotermális titráló kalorimetriás mérések (ITC) Microcal VP-ITC műszerrel történtek. A DYNLL1- és a DYNLL2, valamint az ATMIN (475-823) fehérjéket 3 mM 2-merkaptoetanollal kiegészített PBS pufferben (pH = 7,4) dializáltam. A liofilizált peptideket szintén ugyanebben a pufferben oldottam fel. A titrálás során bekövetkező hőváltozást 299 K hőmérsékleten követtem. Az LC8 és a peptidek kölcsönhatásának vizsgálatok a K_d és a peptid koncentráció függvényében (500-1500 μ M) 30-40-szer 3-5 μ l térfogatú peptid oldatot injektáltam 15-30 μ M DYNLL1 vagy DYNLL2 fehérjéhez. A cella térfogata 2 ml volt. Az ATMIN (475-823) fragmentum DYNLL1-gyel való kölcsönhatásának vizsgálatok 5 μ M ATMIN (475-823) fragmentumot titráltam 660 μ M DYNLL1-gyel. A mérések végén 2-5-szörös peptid ligandum (ATMIN (475-823)-DYNLL1 esetében 1:15) felesleget értünk el. Két injektálás között 900 másodpercet vártunk, hogy az alapvonal tökéletesen visszaálljon. A hígulásból eredő hőváltozást párhuzamos kísérlet során határoztuk meg, majd ezzel az értékkel korrigáltuk a mérési adatainkat. Az első 2 μ l-es injektálást nem használtuk az értékelésnél. A termodinamikai paramétereket Origin 5.0 program (OriginLab) segítségével határoztuk meg. Különböző kötésmodellek (szekvenciális, egy kötőhely, két kötőhely) kipróbálása után azt tapasztaltuk, hogy a mérési adatokra a legegyszerűbb, egy kötőhelyes

⁵ Az LC8 paralógok és az nNOS, a Bmf, a Pak1, a miozin-5a peptidek és dimer formáik között lezajló reakciók ITC méréseit Radnai László kollégámmal közösen végeztük. Ezeknek a méréseknek a kivitelezésében és kiértékelésében továbbá Dr Kardos József volt segítségünkre.

modell ($A + B = AB$) is megfelelően illeszkedett, így adatainkat ezzel a modellel elemeztük ki. A feltüntetett hibahatárok a meghatározott modellhez elméletileg legjobban illeszkedő pontsortól való átlagos eltérést jelentik.

3.5 Fluoreszcencia anizotrópia spektroszkópia⁶

A fluoreszcencia anizotrópiás mérések FLS920 spektrofluoriméterrel (Edinburgh Instruments) történtek 23°C hőmérsékleten 3 mM 2-merkaptóetanollal kiegészített PBS (pH = 7,4) pufferben. A mérések során állandó koncentrációjú fluoreszcein-jelölt Bmf peptidet (64-TSQEDKATQTL-73, $c = 818$ nM) titráltunk DYNLL2 és DYNLL2 Ser88Glu fehérjékkel. A fluoreszcein 494 nm-en történő gerjesztéséhez CW 450 W xenon ívlámpát használtunk. Az emissziós értékeket 540 nm-en detektáltuk. Az anizotrópia értékeket a DYNLL2, DYNLL2 Ser88Glu koncentrációinak függvényében ábrázoltuk, majd a disszociációs állandót (K_d) az alábbi függvény illesztésével kaptuk meg:

$$A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) \frac{(K_d + [D]_0 + [B]_0) - \sqrt{(K_{d,eq} + [D]_0 + [B]_0)^2 - 4[D]_0[B]_0}}{2[B]_0}$$

ahol az A a mért anizotrópia érték, az A_{\min} és az A_{\max} az az anizotrópia érték, ahol a fluoreszcein jelölt Bmf peptid szabad, illetve komplexált állapotban van, a K_d a disszociációs állandó, a D_0 az összes DYNLL2 vagy az összes DYNLL2 Ser88Glu koncentrációja, a B_0 az összes fluoreszcein-jelölt Bmf peptid koncentrációja.

3.6 Felületi plazmon rezonancia⁷

Felület plazmon rezonancia („*Surface Plasmon Resonance*” (SPR)) mérések kivitelezéséhez Biacore 3000 műszert használtunk. A dimer miozin-5a fragmentumot (1209-1320) és a teljes hosszúságú Bmf (1-159) fehérjét CM5 sensor chip felületére, aspecifikus módon amino-csoportokon keresztül kovalens kötéssel (*amino-coupling*) N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimide (EDC), N-hidroxysuccinimide (NHS),

⁶ A mérések kivitelezését és kiértékelését Radnai László kollégámmal együtt végeztük.

⁷ A méréseket Radnai Lászlóval közösen végeztük. A kivitelezésben és az adatok kiértékelésében Bécsi Bálint segédkezett.

1 M ethanolamine-HCl (pH = 8,5) vegyszerek használatával rögzítettük. A felület felett először 6 percig 50 mM NHS és 200 mM EDC oldatot áramoltattunk aktiválva a felületet. 50 µg/ml dimer miozin-5a fragmentumot 10 mM Na-acetát (pH = 5,0) oldatban hígítva 7 percen keresztül 10 µl/min áramlási sebességgel injektáltuk a felszínre. A fennmaradó aktív felületet 35 µl 1 M etanol-amin oldattal (pH = 8,5) blokkoltuk. A fehérjék asszociációjának nyomonkövetése érdekében az etanol-ammal blokkolt, a dimer miozin-5a-t, illetve a Bmf fehérjét tartalmazó felületre futtató pufferben (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, és 0,005 % Surfactant P20, pH = 7,4) különböző koncentrációjú hígított DYNLL2-t és DYNLL2 Ser88Glu fehérjét áramoltattuk 15 percig 10 µl/min áramlási sebesség mellett, majd folyamatosan követtük az RU érték („*response unit*”) változását. A komplexek disszociációjának nyomonkövetése 15 percig tartó, futtató pufferrel való mosással történt. A megfigyelt RU értékeket az etanol-ammal blokkolt felszínen mért RU értékekkel korrigáltuk. A szenzogramokat BIAevaluation 3.1 program segítségével értékeltük ki. A kinetikai paraméterek (k_{on} és k_{off}) és a disszociációs állandó (K_d) meghatározásához az adatsorokra a legegyszerűbb, 1:1 Langmuir modellel ($A+B=AB$) illesztettük.

3.7 Megállított áramlású fluoreszcencia spektroszkópia kinetikai mérések⁸

A mérések 296 K-en történtek, melyekhez Kintek SF-2004 stopped flow műszert használtunk. Az A injektorban található DYNLL2 koncentrációja minden esetben 3 µM volt. A B injektorban található peptidek koncentrációját 1-1000 µM koncentráció tartományon belül változtattuk. A fehérjét 3 mM 2-merkaptóetanollal kiegészített PBS pufferben (pH = 7,4) oldottuk. A keverési arány minden mérés esetében 1:1 volt. A DYNLL2 54-es triptofánjának fluoreszcencia intenzitás változását követtük a komplexképződés során. A triptofán specifikus gerjesztéséhez Xenon lámpa segítségével előállított 297 nm hullámhosszúságú fényt (4 nm résszélesség mellett) használtunk. Az emittált fényt 340 nm-es interferenciaszűrő közbeiktatásával detektáltuk. Komplexképződés során a triptofán

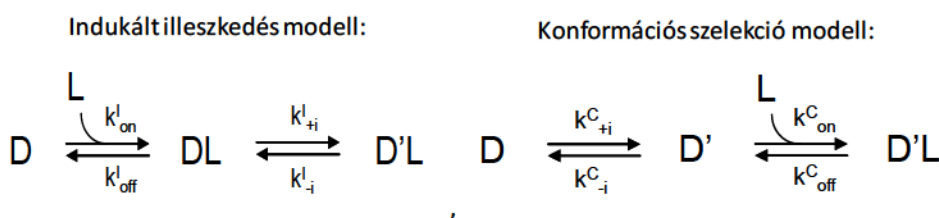
⁸ Bár a mérések kivitelezéséhez hozzájárultam, az adatok kiértékelését Radnai László egyedül végezte. A dolgozatomban szereplő eredmények megértéséhez csak az LC8 komplex képződésének sebességi állandóit használtam fel (k_{on}^c és k_{off}^c), ezért a dolgozat átláthatósága érdekében a kétlépéses kötődés (konformációs átalakulás és komplexképződés) elemzését csak a függelékben részletezem (függelék ábra 1 és függelék táblázat 1).

fluoreszcencia intenzitásának növekedését tapasztaltuk. Minden egyes peptid koncentráció esetében legalább 3 mérést végeztünk, melyeket átlagoltunk és korrigáltunk a fothalványodással („*photobleaching*”). Az adatsorokra a következő:

$$I = A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} + C$$

kettős exponenciális egyenletet illesztettük, ahol az I a fluoreszcencia intenzitása, az A_1 és az A_2 a két fázis intenzitás változásának amplitúdója, a k_{obs1} és a k_{obs2} a két fázis megfigyelt sebességi állandója.

Az adatok további kiértékeléséhez a KinTek Global Kinetic Explorer 2.2.563 szoftvert használtuk. A két lehetséges modell közül a konformációs szelekció modell illeszkedett jobban az adatsorunkra (**4. ábra**, 1.1.2.3 fejezet, lásd **függelék 1. ábrája és 1. táblázata**):



ahol a D az alap állapotú DYNLL2, a D' a megnövekedett fluoreszcencia intenzitású DYNLL2, az L a peptid ligand, az egyes k jelölések pedig a sebességi állandók.

3.8 Kunkel-féle mutagenézis eljárás

A fágmidok és a fág-könyvtár létrehozása során gyakran alkalmaztam a manapság ritkábban használt, Kunkel által leírt mutagenézis eljárást, ezért az elterjedtebb géntechnológiai módszerekkel (PCR, restrikciós emésztés) ellentétben az alábbiakban részletezem az eljárást (Kunkel 1985). A módszer során a kiindulási fágmid plazmidot CJ236 K12 *E. coli* (DUT-, UNG-, F pilus +) sejtvonalba transzformáltam. Ez a törzs a dUTPáz és az uracil N-glikozidáz génekben mutációit hordoz. A sejtek M13 helper fággal való fertőzés után a fágmid fágreszecsékbe pakolódva hagyta el a sejteket. A fágokat a sejtek centrifugálással történő ülepítése után a felülúszóból izoláltam. A fágokból Qiaprep spin M13 (Qiagen) kit használatával egyszálú DNS-t tisztítottam. Az uracilt is tartalmazó tisztított egyszálú DNS szolgált templátként az *in vitro* irányított mutagenézis során. A mutációt hordozó fágmidok elkészítéséhez olyan oligonukleotidokat használtam, amik hordozták a kívánt mutációt, és ettől mind 5', mind 3' irányban legalább 15 bázispárnyi szakaszon tökéletesen

komplementerek voltak a templáthoz. Az *in vitro* szintetizálendő, mutációt hordozó szálát T7 DNS polimeráz (NEB, kat.: M0274S) és T4 ligáz (NEB, kat.: M0202L) segítségével állítottam elő. A vad típusú és mutáns szálakat egyaránt tartalmazó kétszálú, köralakú heteroduplex DNS-t *E. coli* XL1Blue (DUT+, UNG+, F pilus +) sejtekbe transzformáltam. Az uracil tartalmú vad típusú DNS a DUT+, UNG+ XL1Blue sejtekben az uracil-N-glikoziláz enzim hatására preferenciálisan lebomlik, míg a mutáns változat jóval nagyobb arányban fennmarad, így növelve meg a mutációs rátát. A sejtekből mutáns fágmid tisztítható, illetve M13 helper fág használatával fág termelhető.

3.9 Fágmid vektor konstrukciók

Az általam létrehozott, a kísérletek során használt fágmidokat részben saját magam állítottam össze, ezért az alábbiakban részletezem előállításuk folyamatát. Az általam használt fágmidok kiindulási alapjául a pS1602a fágmidot használtam, amit eredetileg a Genentech-ben fejlesztettek ki kiindulási vektorként pBluecript II KS(-) fágmidot használva (Sidhu et al. 2000). A pS1602a fágmid az M13 fág p3 burokfehérje amino terminálisához fuzionált humán növekedési hormon (hGH) génjét tartalmazza. A fúziós fehérjét kódoló gén átírását a pTac promóter szabályozza. Egyik témavezetőm, Pál Gábor laboratóriumában Kunkel és PCR alapú mutagenézisek használatával a hGH génjét FLAG címkét kódoló szakaszra (DYKDDDD) és *KpnI* restrikciós enzim felismerőhelyre cserélték, így létrehozva a pG2B-Tag fágmidot. A peptidkönyvtár bivalens bemutatásának érdekében a GCN4 élesztő transzkripciós faktor (Uniprot kód: P03069, 250-281) leucin-cipzárját használtam, amely élesztő cDNS könyvtárból származott. A GCN4 leucin-cipzárját kódoló DNS szakasz (250-281) 5' végéhez *megaprimer* PCR módszerrel fuzionáltam a Bmf 8 aminosav hosszúságú LC8 kötőmotívumát (Uniprot kód: Q96LC9, 66-EDKATQTL-73) kódoló DNS-t, amelyhez mind az 5', mind a 3' vég esetében 4 aminosav hosszúságú glicin-szerin linkert kódoló DNS-t illesztettem. A PCR-rel elkészített termék a $SGGSG/EDKATQTL_{Bmf:66-73}/GGSG/MKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER_{GCN4:250-281}$ peptidet kódolja. Ezek után *XhoI* és *KpnI* restrikciós enzimek segítségével az inszertet pG2B-Tag fágmidba ligáltam, létrehozva a pTFBL-p3 fágmidot. A pTFBL-p3 fágmid tartalmaz tehát 5'-től 3' irány felé haladva egy pTac promótert, egy MalE szignál szekvenciát, egy FLAG címkét, glicin-szerin linkert, Bmf motívumot, glicin-szerin linkert és a p3 burokfehérjét. Később a pTFBL-p3 fágmidban található pTac promótert *EcoRI* és *NsiI* restrikciós enzimek használata során kazettacsere mutagenézissel hGHbp-29-238 vektorból (Genentech) származó

phoA promóterre cseréltem (Kikuchi et al. 1981). Az így létrehozott végső konstrukciót pPFBL-p3-nak neveztem el (**18. ábra**).

3.10 Fágmid- és fág-könyvtár készítés valamint fág-bemutató

A fágmid - és a fág-könyvtár készítése, a fágok kezelése, valamint a fág-bemutató során a Sachdev Sidhu és munkatársai által leírt protokoll szerint jártam el (Sidhu et al. 2000). A módszer részletes leírásának nagy terjedelme miatt csak a legfontosabb részleteket összegzem.

A fágmid könyvtár készítése során először Kunkel mutagenézis eljárással TAA stop kodonokra cseréltem a pPFBL-p3 fágmid Bmf motívumot kódoló DNS szakaszát létrehozva a pPF-STOP-L-p3 konstrukciót. A fágmid könyvtárakat a pPF-STOP-L-p3 konstrukciót templátként felhasználva állítottam elő. Az első könyvtár esetében a STOP kodonokat tartalmazó szegmenst Kunkel mutagenézis során NNK NNK NNK NNK NNK CAG NNK NNK szekvenciára (kódolt aminosav sorrend XXXXXQXX, ahol „X” = mind a 20 aminosav), míg a második könyvtár esetében NNK NNK GTG AGC CGT GGT NNK NNK NNK GAA NNK szekvenciára (XXVSRGXXXEX) cseréltem (**18. ábra**). Az N a négy bázis keverékét, míg a K a T és a G keverékét jelzi. Az NNK séma 32 féle kodon keverékét jelenti, amelyek együttesen mind a 20 természetben előforduló aminosavat kódolják.

A fágmid-könyvtárat SS320 *E. coli* (F pilus +) elektrokompetens sejtekbe elektroporáltam, majd a könyvtárméret meghatározása után M13 helper fág segítségével fág-könyvtárat készítettem. A fágokhoz 5-ször tömény kicsapó szert (20% PEG8000, 2,5 M NaCl) adtam, a leülepedő fág-részecskéket centrifugálással izoláltam. A fágokat 0,1 nM koncentráció értékre hígítottam. A hígításhoz 30 µg/ml rekombináns GST-t, 5 mg/ml BSA-t és 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS puffert (pH = 7,4) használtam. Az oldatban alkalmazott GST és BSA jelenléte csökkenti az esélyét annak, hogy a szelekciós során (lásd lejjebb) a GST fúziós fehérjére illetve a blokkoló fehérjeként használt BSA-ra is szelektálódjanak fágok.

A fág-bemutató során PBS (pH = 7,4) oldatban 3 µg/zseb GST-fuzionált DYNLL1-et (GST-DYNLL1) rögzítettem MaxiSorp (NUNC) ELISA lemezek felületére. A szabad lemezfelületet 5 mg/ml BSA oldattal blokkoltam.

Kontrollként és a szekvenciák statisztikai adatainak normálásához a fágokat immobilizált anti-FLAG antitestet (2 µ/ml, SIGMA, F3165) és blokkoló fehérjeként BSA-t hordozó felületen is szelektáltam. A szelekció 12 ELISA mintahelyben történt, egy-egy mintahelybe 100 µl hígított fág-könyvtárat raktam és 2 órát inkubáltam szobahőmérsékleten. A felületre

nem kötődő fágokat 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS pufferrel (pH = 7,4) többszöri mosást követően távolítottam el. A specifikusan kötődő fágokat 100 µl/cső 100 mM HCl oldattal eluáltam, majd az eluált oldatot 15 µl 1M Tris-base pufferrel semlegesítettem. Az eluátummal *E. coli* XL1Blue sejteket fertőztem és M13 helper fágok hozzáadása után ismét fágokat termeltem. Minden szelekciós ciklus után ellenőriztem a BSA-t, Anti-FLAG antitestet és GST-DYNLL1-et tartalmazó felületen szelektált fágok titerét. A célfehérjeként szelektált titer elosztva a BSA-n kapott titerrel megadja a dúsulás mértékét, másszóval a specifikusan és nemspecifikusan kötődő klónok arányát.

A szelekciós ciklusok után egyedi klónok GST-DYNLL1 felülethez való kötődését ellenőriztem ELISA kísérletben torma peroxidáz konjugált monoklonális Anti-M13 antitest (GE healthcare, kód: 27-9421-01, 5000-szer hígított) felhasználásával. Negatív kontrollként immobilizált BSA-t, pozitív kontrollként (mivel minden klónon kell, hogy legyen epitóp címke) anti-FLAG antitestet használtam. A BSA kontrollhoz képest háromszoros ELISA jelet adó klónok aminosavsorrendjét a kódoló DNS szakasz szekvenálásával határoztam meg. Ehhez Big Dye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kitet (Applied Biosystem) használtam. A statisztikai analízisbe csak olyan klónokat vontam be, amelyek DNS szinten egyediek voltak. Az egyes pozíciók aminosav gyakoriságát a fágokon való eltérő kifejeződési hatékonyság (*display bias*) miatt immobilizált Anti-FLAG antitesten történő párhuzamos szelekció eredményéből származó gyakorisági adatokkal normáltam. A kötésmintázatot WebLogo program segítségével határoztam meg (<http://weblogo.berkeley.edu>) (Schneider et al. 1990; Crooks et al. 2004).

3.11 LC8 dinein könnyűlánc kötőpartnereinek jóslása⁹

A humán LC8 partnerek jóslásához a UniProt adatbázisban található annotált humán proteomot használtuk. A szekretált, a transzmembrán és az extracelluláris doméneket tartalmazó fehérjerészeket eltávolítottuk a kiindulási adathalmazból. Nyolc, illetve 11 aminosav hosszúságú ablak használatával szkenneltük a fenti módon előszűrt humán fehérjeszekvenciákat, így állítottuk elő azt a peptidkészletet, amelyen belül kötőmotívumokat jósltunk. Csak azokat a peptideket használtuk, amelyeket az IUPred algoritmus használatával rendezetlennek (IDR) becsültük. Ha egy peptidnek egyetlen pozíciója sem kapott 0,5 értéknél

⁹ A bioinformatikai munka teljes részét Süveges Dániel készítette.

nagyobbat, akkor a további jóslási lépésekbe nem vontuk be. Feltételeztük, hogy az egyes pozíciók egymástól függetlenül járulnak hozzá az LC8-cal való kölcsönhatás kialakításához. A fág-bemutató során minden pozícióra egyenként meghatározott aminosav előfordulási százalékként megfelelő számértékkel pontoztuk a humán peptid minden egyes pozícióját annak megfelelően, hogy ott milyen aminosav fordul elő. Az egyes peptid pozíciók pontszámait az alábbi egyenlet alapján összesítettük:

$$S = \sum_{i=1}^8 v_i^N - 100 \quad , \quad S = \sum_{i=1}^{11} v_i^N$$

ahol az S az adott peptid összesített pontértéke, v az i. pozícióban található N aminosavnak a fág-bemutató során meghatározott százalékos előfordulása. Az első könyvtár eredményéből készült jóslás során az összpontszámból kivontunk 100-at, mert a 0-ik pozícióban a glutamint rögzítettük (ami a 100%-os aránya miatt abban a pozícióban 100 pontot ért volna).

Meghatároztuk a pontszámértékekre azt a küszöbértéket, amelynél magasabb pontszámú peptideket potenciális LC8 kötőmotívumoknak tekintettünk. Ennek meghatározásához az egyes pozíciókhoz tartozó aminosav előfordulási százalékokat rögzítettük, majd a pozíciókat 1000 különböző módon összekevertük. Az így kapott 1000 különböző mintázattal a szűrt humán adatbázis peptidjeit újrapontoztuk. A fág-bemutató eredményéből kapott, a pontszámokra vonatkozó sűrűségeloszlás értékeket elosztottuk a randomizálás során kapott sűrűségeloszlás értékekkel. Ahol ez az érték meghaladta az 1-et, ott definiáltuk a küszöbértéket.

3.12 Kristályosítás és röntgendiffrakció¹⁰

A komplexeket TBS pufferben (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 3 mM NaN₃, 5 mM DTT, pH = 7,6) mértük össze a következő végkoncentrációknak megfelelően: 1,5 mM

¹⁰ A kísérletek ezen részéhez való közvetlen hozzájárulásom a dinein könnyűlánc és a kölcsönható peptidjeinek elkészítésére és tisztítására korlátozódott. A fehérjekristályok növesztését és további kezelését Radnai László végezte. A szórási adatok gyűjtését, valamint az adatok kiértékelését Katona Gergő, Weixiao Y. Wahlgren, illetve Harmat Veronika csinálta.

DYNLL2 és 2 mM Ac-SRGTQTE, valamint 1,2 mM DYNLL2 peptid és 1,3 mM GCN4 leucin-cipzár által dimerizált VSRGTQTE peptid. A kristályosítás függőcsepp-módszerrel történt 293 K hőmérsékleten 2 μ l fehérjeoldat és 2 μ l kristályosító oldat összemérése után. A kristályosító oldat összetétele az Ac-SRGTQTE-komplex esetében 31% PEG4000, 400 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 100 mM CH_3COONa , pH 4,6, valamint dimer VSRGTQTE-komplex esetében 20% PEG8000, 200 mM MgCl_2 , 100 mM TRIS, pH 7,0 volt.

Az Ac-SRGTQTE-komplex esetében ESRF ID29 röntgensugár-forrást ($\lambda = 0,93 \text{ \AA}$) használtuk. Az adatgyűjtés ADSC Q315R CCD detektor használatával 100 K hőmérsékleten történt. Az adatok indexeléséhez, integrálásához és skálázásához 1,31 \AA felbontásig az XDS és az XSCALE (Kabsch 1993) programokat használtuk. A tércsoport $P2_12_12_1$, az elemi cella méretei $a = 35,6 \text{ \AA}$, $b = 64,0 \text{ \AA}$, $c = 151,8 \text{ \AA}$ voltak.

A dimer VSRGTQTE-komplex esetében Osmic konfokális optika által fókuszált Cu, $K\alpha$ sugárzást ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) használtunk. Az adatgyűjtés Rigaku R-Axis IV++ detektor használatával történt. Az adatok indexeléséhez, integrálásához és skálázásához 2,9 \AA felbontásig a CrystalClear (Kabsch 1993) programot (Rigaku) használtuk. A tércsoport $P2_12_12_1$, az elemi cella méretei $a = 53,8 \text{ \AA}$, $b = 68,4 \text{ \AA}$, $c = 101,7 \text{ \AA}$ voltak.

Az Ac-SRGTQTE-komplex szerkezetét molekuláris helyettesítés módszerrel oldottuk meg, melyhez a PHASER és a CCP4 6.1.2 programcsomagot használtuk. Keresőmodellnek a 1CMI PDB kóddal rendelkező szerkezetet használtuk. Az automatikus modellépítés Arp/wArp programmal történt a DYNLL2 monomer és a szintetikus peptidek szekvenciáinak felhasználásával. A modellt több iteratív lépésen keresztül építettük, és javítottuk a Coot és a Refmac5 program (CCP4 6.1.2 programcsomag) használatával. Utolsó lépésként az Ac-SRGTQTE-komplex esetében a fehérjeatomok esetén anizotróp hőmérsékleti faktorokat használtunk. Ez az R_{faktor} és R_{free} értékeket 2,4% és 1,5%-kal csökkentette. Az automatikus modellépítés során 419 vízmolekulát modelleztünk. A végső szerkezeti modellnek R_{cryst} értéke 12,1 %, R_{free} értéke 15,6 % volt.

A dimer VSRGTQTE-komplex szerkezetét a MOLREP program (CCP4 6.1.2 programcsomag) használatával oldottuk meg. Keresőmodellnek az Ac-SRGTQTE-komplex szerkezetet használtuk. A modell építéséhez a Coot és a Refmac5 programokat használtuk. A végső modell 1999 atomot és 40 vízmolekulát tartalmaz. A végső szerkezeti modellnek R_{cryst} értéke 25,0 %, R_{free} értéke 29,5 % volt. A szerkezet sztereokémiai kiértékeléséhez a WHATCHECK és a PROCHECK programokat használtuk.

A röntgenszórás és a modellépítés adatai a függelék **3. táblázatában** találhatóak.

3.13 Pepscan analízis¹¹

Az ATMIN 362-től 823-ig tartó fragmentumát 12 aminosav hosszúságú, átfedő peptidekre osztottuk. Az aminoterminálison acetilált peptideket automata csepp („spot”) szintetizálóval (Intavis, Cologne, Germany) állítottuk elő. A peptidek karboxilterminálisára polietilén glikol linkert tettünk, majd ezen keresztül nitrocellulóz membrán felületére rögzítettük őket. A peptideket tartalmazó felületet TBS pufferben (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH = 7,0) oldott 1 %-os zsírszegény tejporral blokkoltuk 4 órán keresztül szobahőmérsékleten. A felületet ezután rekombinánsan előállított, 6xHis címkével ellátott DYNLL1-gyel kezeltük 12 órán keresztül szobahőmérsékleten. Háromszor mostuk a membránt 0,05 % Tween-20-szal kiegészített TBS pufferrel, majd Anti-His antitesttel ECL reakció során UVI-tec digital image analyser (UVItec, Cambridge, UK) műszerrel detektáltuk a felületre kötődött 6xHIS-DYNLL1-et. Annak érdekében, hogy figyelembe tudjuk venni a peptidek és az Anti-His antitest közötti esetleges aspecifikus keresztreakciót, egy negatív kontroll kísérlet keretében az Anti-His antitestet 6xHIS-DYNLL1-gyel nem kezelt membránra is felvittem.

3.14 Élesztő kéthibrid¹²

A “csali” fehérjeként használt DYNLL1-et GAL4 élesztő transzkripciós faktort tartalmazó pGBT9 plazmidba (BD Clontech) klónoztuk, majd *Saccharomyces cerevisiae* Y190 sejtvonalba (MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^{r2}, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, MEL1; URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacz) transzformáltuk. Partnerek kereséséhez egy nagy komplexitású humán szív cDNS könyvtárat (MATCHMAKER Library (BD Clontech) használtunk. Ezt élesztő GAL4 aktivációs domént tartalmazó (AD) pACT2 vektorba klónoztuk, majd *Saccharomyces cerevisiae* Y187 sejtvonalba transzformáltuk (MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacz, MEL1). A könyvtár mérete 2x10⁶ volt. 150 pozitív klónt sikerült azonosítani Leu- / Trp- / His- / SD lemezeken 10 mM

¹¹ A pepscan analízist Ignacio Rodriguez-Crespo és Juan Pablo Albar kivitelezték.

¹² Az élesztő kéthibrid alapú partner „halászást” és a további fragmentumanalízist Ignacio Rodriguez-Crespo és Mónica Martínez-Moreno végezték el.

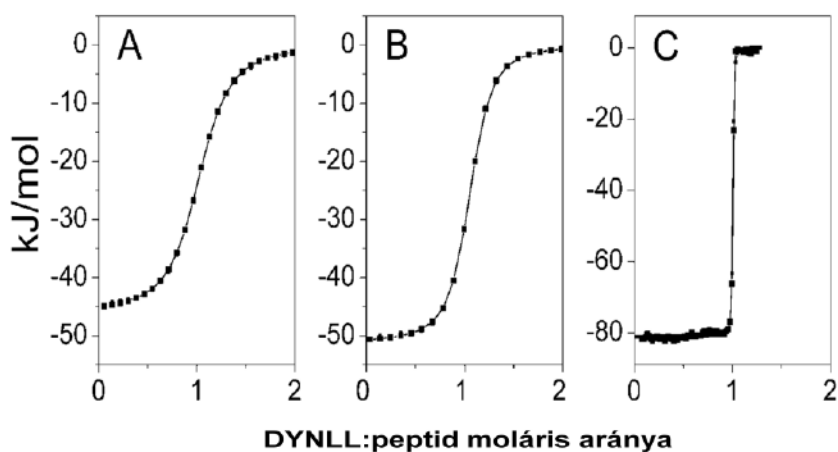
3-Amino-triazole jelenlétében. A pozitív klónokat kék-fehér szelekcióval igazoltuk X- β -Gal-t használva szubsztrátként. A klónok DNS-ét PCR-rel amplifikáltuk, majd szekvenciájukat automata szekvenálóval határoztuk meg. Az ATMIN fragmentumok DNS-ét pACT2 vektorba szubklónoztuk. A kölcsönhatások igazolása a fentiekhez hasonló módon történt.

4. Eredmények

4.1 Az LC8 dinein könnyűlánc humán paralógjainak, a DYNLL1 és DYNLL2 kötőspecifitásának *in vitro* vizsgálata és összehasonlítása

A két humán paralóg – DYNLL1 és DYNLL2 – nagyfokú szekvenciális és szerkezeti hasonlóságot mutat. Ennek dacára Day és munkatársai azt találták, hogy *in vivo* ezek a paralógok eltérő kötőpartner-specifitással rendelkeznek (Day et al. 2004). Ennek ellenére a szakirodalomban az LC8 partnereinek azonosítása során a legtöbb esetben nem jelölik, hogy a kísérleteket melyik paralóggal végezték el, vagy éppeséggel nem vizsgálták a kötődést mindkét paralóggal. Emellett számos esetben nem humán fehérjékkel, hanem *Drosophila melanogaster*-rel vagy más organizmusokkal dolgoztak, melyekben csak egy izoforma található. Munkám kezdetén, mielőtt részletesen elkezdtem volna a humán LC8 és partnerei, illetve a különböző motívumok közötti kölcsönhatás tanulmányozását, célul tűztük ki, hogy a két humán LC8 paralóg partner-specifitását tisztázzuk. Kíváncsiak voltunk, hogy a paralógoknak *in vitro* eltér-e a kötőspecifitása, azonosítható-e bármilyen különbség abban, hogyan kötődnek az eltérő motívumcsaládokhoz tartozó peptidekhez.

14. ábra: Az LC8 humán paralógok (DYNLL1 és DYNLL2) monomer (A és B) és dimer (C) Bmf peptiddel történő titrálási reakciója során fellépő hőváltozást izotermális titráló kalorimetriás (ITC) mérések segítségével határoztuk meg. A mérések során minden esetben 1:1 sztöchiometria figyelhető meg, azaz egy dimer LC8 két monomer peptidet, illetve egy



dimer peptidet köt meg. A DYNLL1-nek (A) és a DYNLL2-nek (B) a monomer Bmf peptiddel történő titrálása során tapasztalt hőváltozás profiljában lényegi különbség nem tapasztalható (DYNLL1-Bmf: $K_{d,eq} \approx 1 \mu M$, $\Delta H = -46,1 \text{ kJmol}^{-1}$, $-T\Delta S = 11,9 \text{ kJmol}^{-1}$; DYNLL2-Bmf: $K_{d,eq} = 0,7 \mu M$, $\Delta H = -51,3 \text{ kJmol}^{-1}$, $-T\Delta S = 16,1 \text{ kJmol}^{-1}$). A GCN4 leucin-cipzár által dimerizált Bmf peptid esetében a monomer peptidekhez képest a látszólagos disszociációs állandó közel 200-ad részére csökkent (DYNLL2-dimer Bmf: $K_{d,eq} = 0,7 \mu M$, $\Delta H = -51,3 \text{ kJmol}^{-1}$, $-T\Delta S = 16,1 \text{ kJmol}^{-1}$) (C).

Az irodalomban az nNOS fehérjét csak a DYNLL1, míg a Bmf fehérjét csak a DYNLL2 partnereként azonosították (Jaffrey et al. 1996; Puthalakath et al. 2001). Az nNOS fehérje kötőpeptidje (T₃G₂L₁Q₀V₁D₂) az L₁Q₀V₁D₂ motívumcsaládhoz, míg a Bmf fehérje kötőpeptidje (K₃A₂T₁Q₀T₁D₂) a K₃X₂T₁Q₀T₁ motívumcsaládhoz tartozik. A két peptidet szintetikusán előállítottuk és izotermális titráló kalorimetria, illetve triptofán fluoreszcencia alapú megállítási fluoreszcencia spektroszkópia segítségével meghatároztuk a DYNLL1-gyel és a DYNLL2-vel történő kölcsönhatásuk termodinamikai és kinetikai állandóit (**14. ábra**). A megállítási fluoreszcencia spektroszkópia használata során az LC8 54-es triptofánjának fluoreszcencia intenzitását követtük a komplex képződése során. A reakció során két részfolyamatot figyeltünk meg; az LC8 konformációjának változását, és magát a komplexképződést. A kölcsönhatás során bekövetkező LC8 konformációváltozás mindegyik peptid esetében hasonló kinetikai paraméterek mellett történt, ezért a dolgozatomban csak a komplexképződés sebességi állandóit használtam fel. A kétlépéses mechanizmus pontos elemzését a dolgozat könnyebb átláthatósága és megértése érdekében csak a függelékben részletezem (**függelék 1. ábra és függelék 1. táblázat**).

Első észrevételünk, hogy *in vitro* a két különböző motívumcsaládba tartozó peptid ugyanolyan 1:1 (1 LC8 dimer : 2 peptid) sztöchiometriával kötődött mindkét LC8 paralóghoz. A paraméterek meghatározása után megállapítható, hogy a DYNLL1 valamivel gyengébben és lassabban kötötte mindkét peptidet mint a DYNLL2 (DYNLL1-Bmf: $K_{d,eq} \approx 1 \mu\text{M}$, $\Delta H = -46,1 \text{ kJ M}^{-1}$, $-T\Delta S = 11,9$, $k_{on}^C = 10,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; DYNLL2-Bmf: $K_{d,eq} = 0,7 \mu\text{M}$, $\Delta H = -51,3 \text{ kJ M}^{-1}$, $-T\Delta S = 16,1$, $k_{on}^C = 21,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, DYNLL1-nNOS: $K_{d,eq} = 7 \mu\text{M}$, $\Delta H = -18,7 \text{ kJ M}^{-1}$, $-T\Delta S = -10,8$, $k_{on}^C = 46,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; DYNLL2-nNOS: $K_{d,eq} = 5,4 \mu\text{M}$, $\Delta H = -22,3 \text{ kJ M}^{-1}$, $-T\Delta S = -7,9$, $k_{on}^C = 58,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ugyanakkor a két paralóg kötési tulajdonságai a vizsgált két peptiden olyan csekély mértékben térnek el, hogy az nem magyarázza az *in vivo* tapasztalt partnerspecificitást (**4. táblázat**).

A DYNLL1 második aminosava cisztein, ami a már meghatározott kristályszerkezetekből jól láthatóan az oldatfázis felé néz. King és munkatársai kimutatták, hogy a DYNLL1 említett ciszteinje a sejt egyfajta redox állapotának érzékelőjeként is működhet (King 2008). Ha két dimer DYNLL1 molekula ciszteinjei között oxidáció során diszulfid híd alakul ki, az gátolhatja a DYNLL1 és partnerei közötti kölcsönhatást. A DYNLL1 ciszteinjének *in vitro* kísérleteink során tapasztalt redox aktivitása is alátámasztotta King megfigyeléseit. Erre utalt az is, hogy redukálószer alkalmazása nélkül a kísérleteinkben folyamatosan csökkent a kötőképes DYNLL1 mennyisége. Mivel a DYNLL1 és a DYNLL2 kötési paraméterei között számottevő különbséget nem tapasztaltunk, a cisztein okozta melléktermékek elkerülése és a

könnyebb kezelhetőség érdekében az *in vitro* kísérleteimhez a munkám nagy részében DYNLL2-t használtam.

Partner	Izoforma	$K_{d,eq}^{\ddagger}$ (nM)	ΔH^{\ddagger} (kJ mol ⁻¹)	$-T\Delta S^{\ddagger}$ (kJ mol ⁻¹)	k_{on}^C § (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off}^C § (s ⁻¹)
Bmf (DKATQTL)	DYNLL1	1050±40	-46,1±0.2	11,9	10400	-*
Bmf (DKATQTL)	DYNLL2	735±22	-51,3±0.1	16,1	21700	-*
Bmf (dimer)	DYNLL2	3,46±0,46	-81,1±0,1	32,7	13000	-*
EML3 (VSRGTQTE)	DYNLL1	80±6	-75,6±0,1	35,0	-	-
ATMIN (DIETQTD)	DYNLL2	1700±30	-64,7±0,1	31,7	-	-
TP53bp1 (SAATQTI)	DYNLL2	4500±34	-46,1±0,1	15,5	-	-
nNOS (DTGIQVD)	DYNLL1	7000±230	-18,7±0,1	-10,8	46800	4,22x10 ⁻¹
nNOS (DTGIQVD)	DYNLL2	5410±150	-22,3±0,1	-7,91	58400	4,37x10 ⁻¹
GKAP (SVGVQVE)	DYNLL2	2400±310	-9,1±0,2	-23,1	-	-
miozin-5a (DKNTMTD)	DYNLL2	8850±670	-23,9±0,4	-4,93	6590	1,03x10 ⁻¹
miozin-5a (dimer)	DYNLL2	37±5	-28,5±0,1	-13,9	4020	-*
Pak1 (DVATSPI)	DYNLL2	42700±5300	-21,5±4,1	-3,48	16400	6,41x10 ⁻¹

4. táblázat: LC8/DYNLL és különböző kötőpeptidjeinek komplexképződése során meghatározott termodinamikai és kinetikai adatai. A részletes kinetikai adatok és magyarázata a függelék 1. ábráján és 1. táblázatában megtalálhatóak.

$K_{d,eq}$: egyensúlyi disszociációs állandó

ΔH : reakció során bekövetkező entalpiaváltozás

T : hőmérséklet Kelvin fokban megadva

ΔS : reakció során bekövetkező entrópia változás

k_{on}^C : komplexképződés sebességi állandója

k_{off}^C : komplex disszociációjának sebességi állandója

‡: Izotermális titráló kalorimetria által egyensúlyi körülmények között meghatározott termodinamikai paraméterek.

§: Triptofán alapú megállított áramlású fluorimetriás spektroszkópia által meghatározott paraméterek.

*: A túl nagy bizonytalanság mellett meghatározható paramétereket nem tüntettük fel.

4.2 Az LC8 dinein könnyűlánc különböző motívumcsaládokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása

Az LC8 igen változatos szekvencia mintázatokat ismer fel. Szekvencia hasonlóság alapján ezeket három családba sorolják: K₃X₂T₁Q₀T₁, L₁Q₀V₁D₂ és az ezektől eltérő, nem-kanonikus családra (Lo et al. 2001; Rodriguez-Crespo et al. 2001). A motívumok ilyen, szekvenciális alapon történő felosztásának azonban eddig semmilyen funkcionális alapját nem bizonyították. Felmerül a kérdés, hogy létezik-e a különböző családok motívumai között

valamilyen kötődésbeli mechanisztikus különbség, ami közelebb vihet minket az LC8 fiziológiás szerepének megértéséhez.

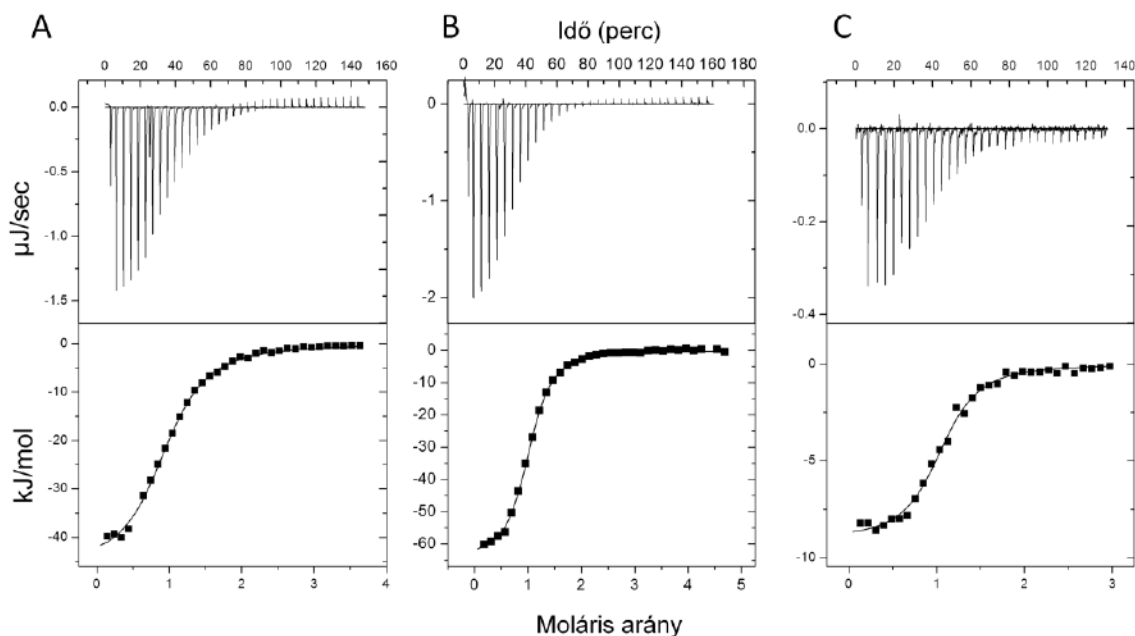
Ezért mindegyik motívumcsaládból kiválasztottunk egy-egy peptidet és szintetikusán előállítottuk őket. A $K_3X_2T_1Q_0T_1$ családból a Bmf fehérje ($K_3A_2T_1Q_0T_1D_2$), az $L_1Q_0V_1D_2$ családból az nNOS fehérje ($T_3G_2L_1Q_0V_1D_2$), míg a nem-kanonikus családból a miozin-5a ($K_3N_2T_1M_0T_1D_2$) és a Pak1 fehérjék kötőpeptidjeit ($V_3A_2T_1S_0P_1I_2$) választottuk. A kölcsönhatások termodinamikai és kinetikai paramétereit izotermális titráló kalorimetria és triptofán fluoreszcencia alapú megállítós fluoreszcencia spektroszkópia használatával határoztuk meg (**4. táblázat**).

Kontrollként a majdnem teljes hosszúságú Bmf fehérjét (1-159 fragmentum) használtuk annak érdekében, hogy feltárjuk, vajon a partnereken van-e másodlagos kötőmotívum is. Ez a fragmentum a Bmf fehérjének csak a karboxilterminálisnál található hidrofób szakaszát nem tartalmazza, ami valószínűleg a fehérje membránba való kihorgonyzásához szükséges (O'Connor et al. 1998). Az 1-159 fragmentummal végzett kísérletek eredményei nagyon hasonlítanak a peptides eredményekhez, így a Bmf fehérje esetében kizárhatjuk másodlagos kötőmotívum létezését.

Mindegyik kölcsönhatás esetében 1:1 (1 LC8 dimer : 2 peptid) sztöchiometriát tapasztaltunk. Egyik kísérletünkben sem figyeltünk meg sem negatív, sem pozitív kooperativitást a két kötőárok között. A $K_3X_2T_1Q_0T_1$ családhoz tartozó Bmf fehérje kötőpeptidje esetében tapasztaltuk a legnagyobb kötéseerősséget ($K_{d,eq} = 0,7 \mu M$) (**14. ábra**). Ennél valamelyest gyengébben kötődött az $L_1Q_0V_1D_2$ családhoz tartozó nNOS fehérje kötőpeptidje ($K_{d,eq} = 5 \mu M$). A $K_3X_2T_1Q_0T_1$ családhoz igen hasonló, de a legkonzerváltabb, 0-ik pozícióban nem glutamint, hanem metionint tartalmazó miozin-5a peptid még kisebb affinitással kötődött ($K_{d,eq} = 9 \mu M$). Az összes szekvenciától legjobban eltérő Pak1 fehérje peptidje kötődött leggyengébben ($K_{d,eq} = 40 \mu M$). Míg az nNOS, a miozin-5a és a Pak1 peptidek kötődése entalpiikusan és entrópiikusan is kedvező (nNOS: $\Delta H = -18,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = -10,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, miozin-5a: $\Delta H = -23,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 4,93 \text{ kJ mol}^{-1}$, Pak1: $\Delta H = -21,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = -3,48 \text{ kJ mol}^{-1}$), addig a Bmf peptid kötése entalpiikusan kedvező, de entrópiikusan kedvezőtlen ($\Delta H = -51,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 16,1 \text{ kJ mol}^{-1}$). A Bmf peptid esetében a kedvezőtlen entrópiikus tagot a többi peptidnél tapasztalt entalpiikus hozzájáruláshoz képest legalább kétszer akkora entalpiikus tag ellenpontozza.

Ha megvizsgáljuk a különböző motívumcsaládokhoz tartozó peptidek LC8-cal való komplexképződésének kinetikáját, akkor megállapíthatjuk, hogy a komplexképződés sebességi állandója $6 - 58 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ értékek között van, de az egyes motívumcsaládok között

csak párszoros különbség azonosítható. A komplex disszociációjának sebességi állandói az nNOS, a miozin-5a és a Pak1 peptidek esetében 0,1 és 0,6 s⁻¹ érték között voltak. Bár a konkrét értéket csak nagy bizonytalansággal lehetett meghatározni, a Bmf peptid körülbelül 100-szor lassabban disszociált ($k_{\text{off}}^{\text{C}} = 0,00185 \text{ s}^{-1}$) (függelék 1. ábra és függelék 1. táblázat).



15. ábra: A DYNLL2 TP53bp1 ($A_3A_2T_1Q_0T_1I_2$) (A), ATMIN ($I_3E_2T_1Q_0T_1D_2$) (B) és GKAP ($V_3G_2V_1Q_0V_1E_2$) (C) peptidekkel történő titrálása során lezajló hőváltozást ITC módszerrel határoztuk meg. A DYNLL2-GKAP peptid reakció entalpikusan és entrópikusan is kedvező ($K_d = 2,4 \mu\text{M}$, $\Delta H = -9,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = -23,1 \text{ kJ mol}^{-1}$), míg a DYNLL2- TP53bp1- és az ATMIN peptid reakciók entalpikusan kedvező, de entrópikusan kedvezőtlen folyamatok voltak (TP53bp1 $K_d = 4,5 \mu\text{M}$, $\Delta H = -46,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, ATMIN $K_d = 1,7 \mu\text{M}$, $\Delta H = -64,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 31,7 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Kíváncsiak voltunk, hogy mennyire általánosíthatóak a $K_3X_2T_1Q_0T_1$ és az $L_1Q_0V_1D_2$ családokhoz tartozó Bmf és nNOS motívumok eltérő komplexképződési tulajdonságai, ezért további motívumok kötésének termodinamikai állandóit is meghatároztuk ITC módszer segítségével (4. táblázat és 15. ábra). A tumor suppressor p53-binding protein 1 (TP53bp1) $K_3X_2T_1Q_0T_1$ kötőmotívum családba tartozó $A_3A_2T_1Q_0T_1I_2$ peptidet, illetve és a Disks large-associated protein 1 (GKAP) az $L_1Q_0V_1D_2$ motívum családhoz hasonló $V_3G_2V_1Q_0V_1E_2$ peptidet vizsgáltuk. A mérések során a peptidek a korábbiakkal megegyezően 1:1 sztöchiometriával kötődtek (15. ábra). A GKAP motívum kötésének affinitása és termodinamikai paraméterei nagyfokú hasonlóságot mutattak az nNOS peptid

esetében tapasztaltakhoz. A folyamat entalpikusan és entrópikusan is kedvező volt ($K_d = 2,4 \mu\text{M}$, $\Delta H = -9,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = -23,1 \text{ kJ mol}^{-1}$). A TP53bp1 peptidje valamivel gyengébben kötődött, mint a Bmf motívuma. A gyengébb kölcsönhatásra magyarázatot adhat, hogy a TP53bp1 esetében a konzervált -3. pozícióban a leggyakrabban előforduló lizin helyett alanin található. A komplexképződési folyamat termodinamikája azonban ebben az esetben is entalpikusan kedvező, de entrópikusan kedvezőtlen volt. A termodinamikai paraméterek értékei a Bmf peptid komplexképződése során tapasztalt értékekkel összemérhetőek ($K_d = 4,5 \mu\text{M}$, $\Delta H = -46,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

A dolgozatom későbbi részében részletezett módon új humán LC8 partnereket jósoltunk (*„Eddig nem azonosított humán LC8 kötőpartnerek jóslása az irányított evolúcióval meghatározott mintázat alapján„*, című 4.8 fejezet). Az ATMIN és az EML3 fehérje esetében a $K_3X_2T_1Q_0T_1$ családhoz hasonló, bioinformatikai módszerrel azonosított $L_3E_2T_1Q_0T_1D_2$ és $R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptidek LC8-kötését ITC módszerrel igazoltuk ($K_d_{\text{ATMIN}} = 1,7 \mu\text{M}$, $\Delta H = -64,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 31,7 \text{ kJ mol}^{-1}$; $K_d_{\text{EML3}} = 0,08 \mu\text{M}$, $\Delta H = -75,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 35,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) (4.10.2, illetve 4.10.1 és 4.7 fejezetek). A kölcsönhatás termodinamikája mindkét esetben hasonló volt a Bmf peptid esetében tapasztaltakéhoz, azaz entalpia-vezérelt, de entrópikusan kedvezőtlen folyamat volt.

4.3 A partnerek dimer szerkezetének hatása a kötése erősségre és a kötés kinetikájára: aviditás

Az eddig azonosított partnereket megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy nagy részük homodimer formában fordul elő. Az is bebizonyosodott, hogy az LC8 egyes esetekben stabilizálni is képes partnerei szerkezetét (például: miozin-5a, nNOS, Swallow) (Wang et al. 2004; Hodi et al. 2006; Williams et al. 2007). A kötőmotívum közelében sok esetben másodlagos szerkezeti elemeket jósoló programokkal, vagy kísérletesen is bizonyítottan coiled coil szerkezet azonosítható (2. táblázat). Figyelemreméltó, hogy az LC8 szerkezetében található két parallel kötőárok lehetőséget biztosít dimer-dimer komplex létrejöttéhez (9. ábra). Vajon a partnerek dimer szerkezete milyen módon hat ki az LC8 működésére, miként befolyásolja az LC8 és partnerei közötti kölcsönhatást? A fenti kérdés megválaszolására termodinamikai és kinetikai mérésekkel összehasonlítottuk a miozin-5a kötőpeptid monomer és dimer formájának LC8-kötését.

A miozin-5a fehérjében található motívumtól amino- és karboxilterminális irányban kis stabilitású *coiled coil* található. Hódi Zsuzsa kimutatta, hogy az LC8 kötődése a miozin-5a

szuperhélix (*coiled coil*) tartalmát növeli, illetve stabilizálja a miozin-5a dimer állapotát. Géntechnológiai módszerek felhasználásával az 1275-1297 fragmentum amino- és karboxil-végére egy-egy élesztőből származó GCN4 leucin-cipzárt illesztettünk, hogy stabilizáljuk a dimer állapotot. A DYNLL2-vel kialakuló kölcsönhatást ITC, SPR és triptofán fluoreszcencia alapú megállítós fluoreszcencia spektroszkópia segítségével követtük.

Az ITC mérések során tapasztalt 1:1-es sztöchiometriából megállapítható, hogy egy dimer LC8 kapcsolódott egy dimer miozin-5a fragmentumhoz. A monomer miozin-5a peptid (lásd a „Az LC8 dinein könnyűlánc különböző motívumokcsaládokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása” című 4.2 fejezetben) affinitásához képest a dimer miozin-5a fragmentum körülbelül 250-szer nagyobb affinitással kötődött (miozin-5a peptid: $K_{d, eq} = 9 \mu\text{M}$; dimer miozin-5a: $K_{d, eq} = 0,037 \mu\text{M}$). Megvizsgálva a monomer és a dimer miozin-5a kötődéseinek kinetikai tulajdonságait megállapíthatjuk, hogy a monomer és a dimer miozin-5a hasonló asszociációs sebességi állandóval kötődik (monomer miozin-5a $k_{on}^C = 6590 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dimer miozin-5a $k_{on}^C = 4020 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), azonban a dimer forma két nagyságrenddel lassabban disszociál (monomer miozin-5a $k_{off}^C = 0,1 \text{ s}^{-1}$, dimer miozin-5a $k_{off}^C = 0,0007 \text{ s}^{-1}$). A dimer miozin-5a LC8-cal való kölcsönhatását SPR spektroszkópiával is megmértük, ami az ITC és a stopped flow módszerekkel meghatározott értékekkel összemérhető eredményeket adott (**17. ábra, 5. táblázat**).

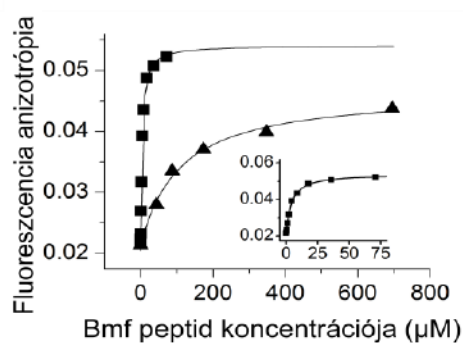
A monomer és a dimer miozin-5a esetében észlelt affinitás- és kinetikai különbségek legjobban az antitesteknél és sejtfelszíni receptoroknál gyakran tapasztalt aviditás hatással magyarázhatóak. Az aviditás lényege az, hogy (a monovalens ligandummal ellentétben) a bivalens ligandum a dimer kötőfehérjéről csak akkor távozik, ha a kötőfehérje mindkét kötőmotívumot „elengedte”. Ennek tulajdonítható, hogy amíg a monomer és a dimer ligandumok asszociációs sebességi állandója egymással összemérhető, addig a dimer ligandum esetében a látszólagos disszociációs sebességi állandó a monomerhez képest megnövekedik (O'Connor et al. 1998; Pabbisetty et al. 2007). Ennek eredményeként több nagyságrendes látszólagos affinitásnövekedés tapasztalható.

A fentiekben vizsgált dimer miozin-5a fragmentum a kötőmotívumon kívül egyéb természetes szekvenciát is tartalmazott. Nem zárható ki, hogy az aviditás jelenségén kívül egyéb tényező is hozzájárulhat a tapasztalt affinitásnövekedéshez (disszociációs sebességi állandó csökkenéshez). Annak érdekében, hogy egy korábban fel nem ismert másodlagos kötőszekvencia lehetőségét feltárjuk, egy teljesen mesterséges monomer-dimer (monovalens-bivalens) rendszert is megvizsgáltunk. Géntechnológiai módszerekkel a Bmf kötőpeptidjének karboxil-terminálisához hat aminosav hosszúságú GlyGlySerGlyGlySer linkert és élesztőből

származó GCN4 leucin-cipzárt illesztettünk. A miozin-5a esetéhez hasonlóan a mesterségesen dimerizált Bmf motívum is körülbelül 200-szoros affinitásnövekedést mutatott a monomer Bmf peptidhez képest (Bmf peptid: $K_d = 0,7 \mu\text{M}$; dimer Bmf 5a: $K_d = 0,003 \mu\text{M}$) (**14. ábra**). A disszociációs sebességi állandó olyan alacsonynak bizonyult, hogy nem tudtuk pontosan meghatározni. Ez nem meglepő annak fényében, hogy a monomer peptid disszociációs sebességi állandója már önmagában is alacsony ($k_{\text{off}}^C = 0,00185 \text{ s}^{-1}$) (**függelék 1. ábra és függelék 1. táblázat**).

4.4 Az aviditás hatása az LC8 fehérje Ser88-foszforiláción keresztüli szabályozására

Az LC8 egyik lehetséges poszt-transzlációs úton történő szabályozása, a 88-as szerin oldallánc reverzibilis foszforilációja. A foszforiláció hatására ionos és szterikus hatások miatt az LC8 monomer-dimer egyensúly a monomer irányába tolódik el. A monomer LC8 a kötőárok hiányában természetesen nem köt partnereket (Song et al. 2007; Song et al. 2008). A 88-as szerin foszforilációját *in vitro* kísérleteink során a szerin glutamatra való cseréjével mimikáltuk (LC8 Ser88Glu). Kíváncsiak voltunk, hogy a mutáció során bekövetkező, a monomer irányba történő egyensúly-eltolódás milyen mértékben befolyásolja a monomer motívumokkal kialakuló kölcsönhatás affinitását.



16. ábra: Vad típusú (\blacksquare) és Ser88Glu mutáns (\blacktriangle) DYNLL2/LC8 titrálása fluoreszcein-jelölt Bmf peptiddel fluoreszcein anizotrópia spektroszkópia mérés során. A belső ábra a vad típusú LC8 titrálása során bekövetkező fluoreszcencia anizotrópia-változást mutatja alacsonyabb Bmf peptid koncentrációk esetében. A Ser88Glu mutáns a vad típusú LC8-hoz képest 30-szor gyengébben köti a fluoreszcein-jelölt Bmf peptidet (vad $K_d = 3,5 \mu\text{M}$, Ser88Glu $K_d = 110 \mu\text{M}$).

Vad típusú és Ser88Glu mutáns LC8/DYNLL2 fehérjét titráltunk fluoreszcein-jelölt Bmf peptiddel, és fluoreszcencia anizotrópia spektroszkópia segítségével határoztuk meg a kötése erősségeket. A vad típusú LC8 és a fluoreszcein-jelölt Bmf közötti kölcsönhatás 30-szor erősebb volt ($K_d = 3,5 \mu\text{M}$), mint a Ser88Glu mutáns LC8 fehérje esetében ($K_d = 110 \mu\text{M}$) (**16. ábra**). A korábbiakban ITC segítségével meghatározott LC8/DYNLL2-Bmf kölcsönhatás csak kis mértékben volt erősebb, mint amit a fluoreszcein-jelölt Bmf esetében tapasztaltunk ($K_d = 0,7 \mu\text{M}$). A Ser88Glu esetében tapasztalt több mint 100 μM -os látszólagos disszociációs állandó (Song et al. 2007) megkérdőjelezi, hogy *in vivo* körülmények között

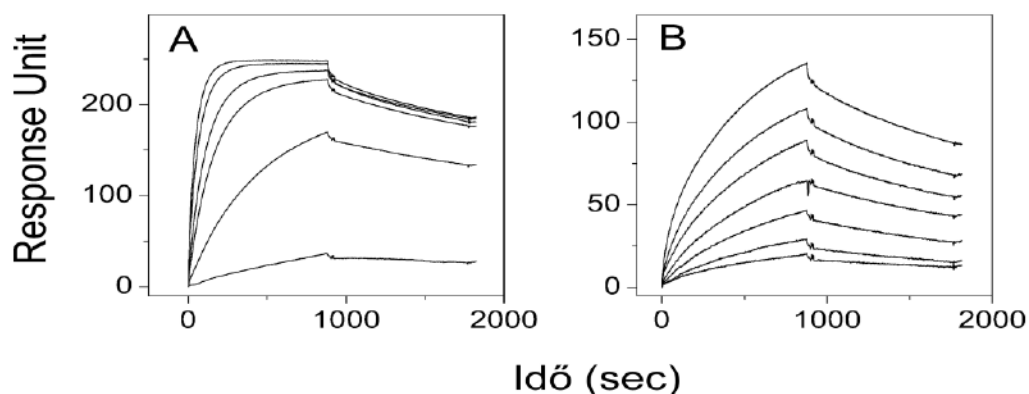
– ahol a fehérjék legfeljebb mikromólos koncentrációban vannak jelen – kialakul-e a komplex a 88-as szerinen foszforilált LC8 és a Bmf motívum között.

Partner	Izoforma	K_d (nM)	k_{on}^{\S} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off}^{\S} (s^{-1})
Bmf (DKATQTL)	LC8/DYNLL2	3580±400*	-	-
Bmf (DKATQTL)	LC8/DYNLL2 Ser88Glu	110.000±20.000*	-	-
dimer miozin-5a	LC8/DYNLL2	50±14,7 [§]	4840±1290 [§]	2,24x10 ⁻⁴ ±1,0x10 ⁻⁵ [§]
dimer miozin-5a	LC8/DYNLL2 Ser88Glu	2690±860 [§]	147±64 [§]	3,41x10 ⁻⁴ ±4,5x10 ⁻⁵ [§]

5. táblázat: Vad típusú LC8/DYNLL2 és Ser88Glu mutáns változatának komple képződési paraméterei monomer Bmf peptid és dimer miozin-5a fragmentum esetében

*: fluoreszcencia anizotrópia segítségével meghatározott paraméterek

§: Felszíni plazmon rezonancia spektroszkópia segítségével meghatározott paraméterek



17.ábra: Felszíni plazmon rezonancia spektroszkópiás mérések segítségével követtük az immobilizált dimer miozin-5a fragmentum és vad típusú (A), valamint Ser88Glu mutáns (B) LC8/DYNLL2 fehérje között lezajló komplexképződést. A mutáns változatnak körülbelül 50-szer volt kisebb affinitása a vad típusúhoz képest, ami egyértelműen a lecsökkent komplexképződési állandónak tudható be. A két változat esetében mért disszociációs sebességi állandó nagy egyezést mutatott (vad típusú LC8 $K_d = 0,05 \mu M$, $k_{on} = 4840 M^{-1}s^{-1}$, $k_{off} = 2,24 \times 10^{-4} s^{-1}$, Ser88Glu LC8 $K_d = 2,7 \mu M$, $k_{on} = 147 M^{-1}s^{-1}$, $k_{off} = 3,41 \times 10^{-4} s^{-1}$).

A kötőpeptidek dimerizációjakor tapasztalt aviditás-hatás 200-szorosára növelte a kötőerősséget. Vajon az aviditás hatás befolyásolja-e a Ser88Glu LC8 mutáns látszólagos kötőerősségét? Felszíni plazmon rezonancia spektroszkópia segítségével meghatároztuk az immobilizált dimer miozin-5a fragmentum (1209-1320) és a vad típusú, valamint a Ser88Glu mutáns LC8 komplexképződésének kinetikai állandóit (17. ábra). A vad típusú LC8 a korábbi ITC mérések során meghatározott affinitás értékhez hasonló erősséggel kötődött ($K_d = 50 \text{ nM}$), továbbá a kinetikai állandók is jó egyezést mutattak a fluoreszcencia alapú megállított áramlásos spektroszkópia során meghatározott értékekkel (5. táblázat). Bár a vad

típusú LC8 fehérjével összevetve a mutáns változatnak 50-szer kisebb volt az affinitása a dimer miozin-5a-hoz képest (Ser88Glu $K_d = 2,7 \mu\text{M}$), a $2,7 \mu\text{M}$ -os K_d már összemérhető az érintett fehérjék sejtbeli koncentrációjával, tehát a dimer miozina-5a esetében fiziológiás körülmények között is elképzelhető a komplexképződés. A disszociációs sebességi állandó a mutáns és a vad típusú fehérjék esetében hasonló volt (vad DYNLL2 $k_{\text{off}} = 2,24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, DYNLL2 Ser88Glu $k_{\text{off}} = 3,41 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). A kisebb affinitás egyértelműen a komplexképződés csökkent asszociációs sebességi állandójának tudható be (vad DYNLL2 $k_{\text{on}} = 4840 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, DYNLL2 Ser88Glu $k_{\text{on}} = 147 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

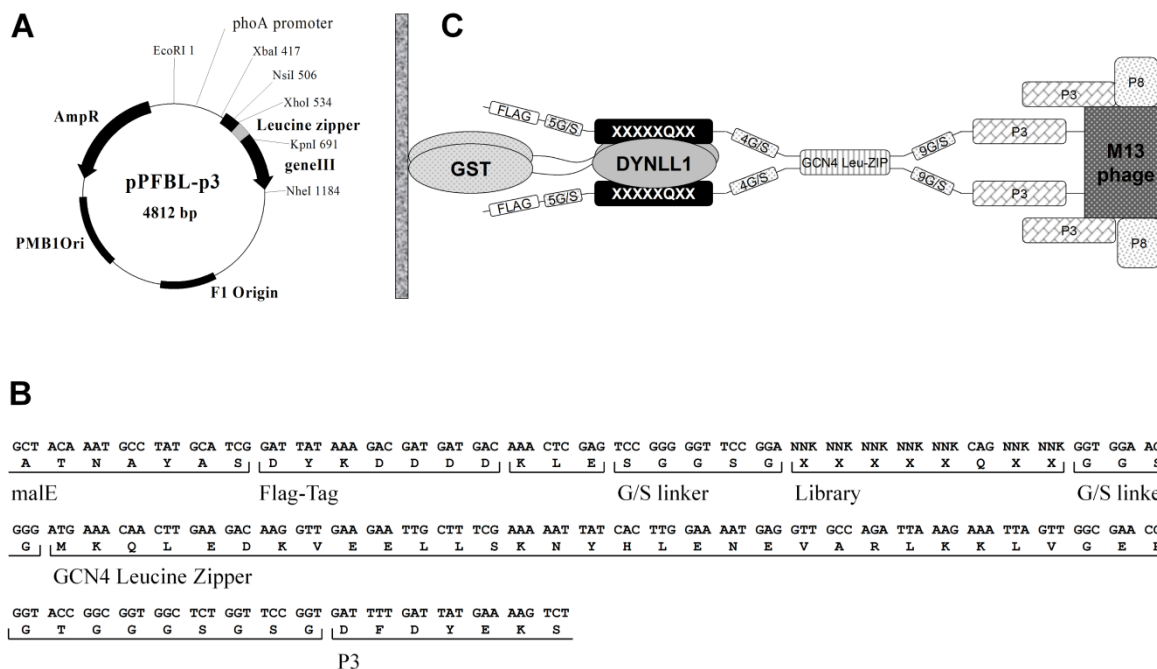
4.5 Az LC8 kötőmotívumának átfogó jellemzése nagy-áteresztőképességű, irányított evolúciós megközelítéssel, fág-bemutatással

Léteznek-e, illetve ha igen, akkor a mintázatnak melyek azok a kritikus pozíciói („core” motívum), amelyek kulcsfontossággal bírnak az LC8 fehérjével történő kölcsönhatások kialakítása során? Ezekben a pozíciókon melyek az optimális aminosavak? Léteznek-e az eddig azonosított motívumokon kívül egyéb alternatív megoldások? A motívum átfogó elemzésével azonosíthatóak-e az LC8-nak eddig fel nem tárt partnerei? Képesek vagyunk-e a természetben található motívumoknál erősebb kötőpeptidet előállítani? Ahelyett, hogy egyedi motívumokat, esetleg egyedi mutációkat vizsgálnánk, a feltett kérdések megválaszolásához irányított evolúciós módszert, a fág-bemutatást használtam. Ez a nagy-áteresztőképességű módszer lehetőséget ad az LC8 motívum átfogó, tisztán termodinamikai alapon való jellemzésére. A fág-bemutatás alapjait az irodalmi áttekintés fejezetében részleteztem („Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata irányított evolúciós megközelítéssel; fág-bemutatás módszerének részletezése” című 1.3 fejezet, **13. ábra**).

A fág-bemutatás során célfehérjeként amino-terminálison glutation-S-transzferázzal (GST) fuzionált DYNLL1¹³ fehérjét használtam. Ezt kötöttem ki Maxisorp ELISA lemez felületére (**18. ábra**). Kísérleteim elején a DYNLL1-et önmagában immobilizáltam különböző puffer és koncentráció viszonyok mellett, de ez csak nagyon kis hatásfokkal sikerült. A GST fúzió által megnövekedett immobilizációs hatásfoknak többféle oka lehet. A GST dimer jellege miatt

¹³ Az LC8 kötőmotívum mintázatának fág-bemutatás módszerrel történő feltérképezése a DYNLL1 paralóg vizsgálatával kezdődött. A kísérletsorozat közben a paralógok vizsgálata során partnerspecifitásban különbséget nem tapasztaltunk (4.1-ik „Az LC8 dinein könnyűlánc humán paralóggjainak, a DYNLL1 és DYNLL2 kötőspecifitásának in vitro vizsgálata és összehasonlítása”). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a DYNLL2 vizsgálata esetében is hasonló mintázatot kapnánk.

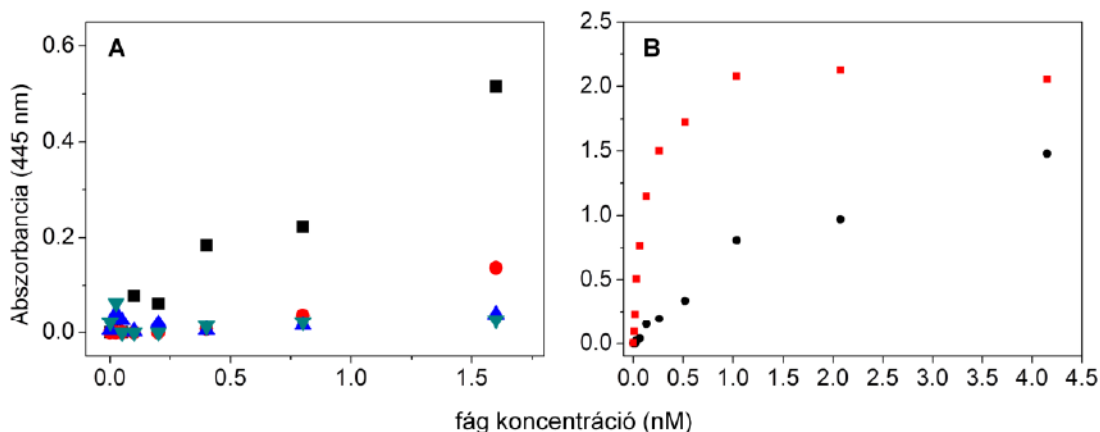
stabilizálhatja a dimer DYNLL1 molekulákat (Lyon et al. 2003). Az immobilizálás során az esetek zömében valószínűleg nem a DYNLL1, hanem a nagyobb méretű GST tapad ki a MxiSorp felszínhez, így több aktív DYNLL1, több effektív kötőárok maradhat szabadon.



18. ábra: A bivalens fág-bemutató konstrukció. Az A ábrán a pPFBL-p3 DNS konstrukció vektortérképe látszik. A Bmf EDKATQTL motívumát a p3 és a leucin-cipzárt kódoló gén elé klónoztam. A B ábra az XXXXXQXX bivalens fágmid könyvtár szekvenciáját p3 burokkészítményéhez fuzionálva mutatja. Mind a p3, mind a GCN4 leucin-cipzár és a könyvtártagok közé glicin-szerin linkert építettem be. A C ábrán egy bivalens könyvtártagot kifejező M13 fág és az immobilizált GST-LC8/DYNLL1 komplex sematikus modellje látható.

Első lépésként M13 fonalas bakteriofág felületén bemutatott Bmf fehérje motívumával optimalizáltam a kísérleti körülményeket. Korábbi kísérleteimben a Bmf motívumát a legerősebben kötődő peptidként azonosítottam ($K_d = 0,7 \mu\text{M}$, 4. táblázat). Az LC8 kötőmotívum mintázatára voltam kíváncsi, ezért célom volt a gyengébben kötődő könyvtártagok izolálása is. A könyvtártagokat ezért M13 bakteriofág p8 burokkészítményén polivalens formában terveztem bemutatni. A Bmf peptidet p8 burokkészítményén megjelenítő konstrukciót kívántam pozitív kontrollként használni. A konstrukcióban szereplő Flag-címke fágfelszínen történő kimutatásán keresztül igazoltam, hogy az M13 bakteriofágok sikeresen megjelenítették a felszínükön a Bmf peptidet. Ennek ellenére ez a kontroll ELISA kísérletben nem mutatott kölcsönhatást az LC8 fehérjével. A probléma megoldásaként az LC8 esetében tapasztalt aviditási hatást használtam ki („A partnerek dimer szerkezetének hatása a

kötéserősségre és a kötés kinetikájára: aviditás” című 4.3 fejezet). A Bmf peptidet élesztőből származó GCN4 leucin-cipzár segítségével dimerizáltam és az M13 fonalas fág p3 burokfehérjéjén bivalens formában mutattam be (18. ábra).



19. ábra: Bmf peptid M13 fonalas fágok p3 burokfehérjéjén való bivalens kifejeződésének hatékonysága ELISA kísérletekben. Immobilizált GST-DYNLL1/LC8 felületre növekvő koncentrációban injektáltam bivalens formában kifejezett Bmf peptidet hordozó M13 fágokat. A kötődött fágok mennyiségét anti-M13 antitest segítségével határoztam meg. Az A ábrán látható, hogy a pTac promóterrel rendelkező konstrukció esetében a bemutatás hatékonyságát 0 (■), 10 (●), 50 (▲) és 100 (▼) μM IPTG-vel való indukálással próbáltam fokozni. Már a 10 μM IPTG használata is drasztikusan lecsökkentette a Bmf peptid M13 fágok felületén történő kifejeződését. A B ábrán látható, hogy a PhoA promóterrel rendelkező bivalens Bmf peptideket kódoló konstrukciók (■) M13 fágok p3 burokfehérjéjén való kifejeződésének hatékonysága nagyjából tízszeresére növekedett a pTac promótert tartalmazó konstrukciókhoz képest (●). A PhoA promóter használatával így már a szelektív körülmények között is (0,1 nM fág koncentráció) megfelelő intenzitású jelet kaptam.

A dimerizált Bmf peptid M13 bakteriofágokon való bemutatása azonban nem volt megfelelően hatékony. ELISA lemezre immobilizált anti-FLAG antitest segítségével meghatároztam, hogy nagyjából minden tizedik fág hordoz egy Bmf-leucin-cipzár konstrukciót. A Bmf peptid-leucin-cipzár-p3 konstrukció előtt egy IPTG-vel indukálható, *E. coli* triptofán és lacUV5 promótereinek kimérájaként előállított erős pTac promóter található (De Boer et al. 1983). Annak érdekében hogy megnöveljem a bemutatás hatékonyságát, különböző koncentrációjú IPTG-vel indukáltam a Bmf-leucin-cipzár-p3 fehérje termelődését. Tapasztalataim azonban azt mutatták, hogy már 10 μM IPTG is drasztikusan lecsökkentette a peptid bemutatásának hatékonyságát. Ezek után a pTac promótert a bakteriális alkalikus foszfatáz PhoA promóterére cseréltem (Kikuchi et al. 1981). A PhoA a pTac-hoz képest gyengébb, azonban konstitutívan aktív promóter (Fuh et al. 1990; Beekwilder et al. 1999; Lee et al. 2004). A promóterek cseréje a dimerizált Bmf peptid

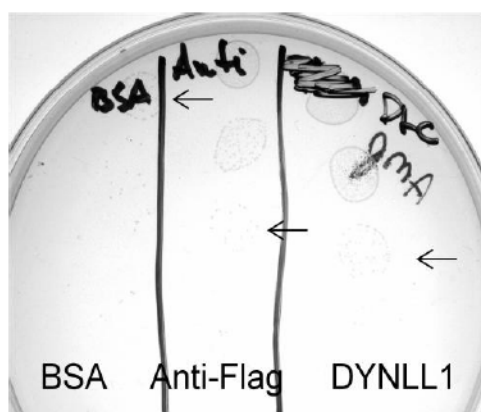
bemutatásának hatékonyságát körülbelül tízszeresére növelte, azaz nagyjából mindegyik fág hordozott egy peptidet. A így létrehozott fágokkal már az irányított evolúció körülményei között is (például a szelekció során használt fág koncentráció mellett, ami 0,1 nM volt) megfelelő intenzitású jelet tudtam detektálni ELISA kísérletben (**19. ábra**).

A GCN4 leucin-cipzár és a kötőmotívum között található glicin-szerin linker hosszúsága befolyásolja az aviditás jelenség hatásfokát. Belátható, hogy túl rövid a linker esetén sztérikus okok miatt nem valósulhat meg az egyszerre mindkét motívumon keresztüli kötődés. Ha pedig túl hosszú linkert használunk, akkor a peptidek túl nagy szabadsági foka miatt nem lesz maximális az aviditás hatásfoka. Gáspári Zoltán előzetes modellezése alapján feltételeztem, hogy a sztérikus gátlás elkerüléséhez legalább három aminosav hosszúságú linkert kell beépíteni a motívum és a leucin-cipzár közé. Ez alapján olyan p3-fuzionált, dimerizált Bmf konstrukciókat állítottam elő, amelyek rendre négy, hat illetve nyolc aminosav hosszúságú glicin-szerin linkert tartalmaztak. Anti-Flag-címke ellenanyaggal ellenőrizve mindhárom konstrukció azonos hatékonysággal mutatta be a peptidet. Immobilizált GST-DYNLL1-t használva ELISA kísérletben a négy és a hat aminosav hosszúságú linkereket tartalmazó konstrukciók között különbséget nem tapasztaltam, azonban a nyolc aminosav hosszúságú linkert tartalmazó konstrukció már valamelyest gyengébben kötődött. Ezek alapján a későbbiekben négy aminosav hosszúságú linkert tartalmazó könyvtárat készítettem.

A létrehozható fág-könyvtár méretének felső korlátját az elektroporálás hatékonysága szabja meg. Normál laboratóriumi baktériumtenyészet térfogatokat feltételezve az elérhető, illetve kezelhető könyvtárméret néhányszor 10^{10} klón. Ez egyben azt is jelenti, hogy a kezdeti diverzitásunk is legfeljebb ekkora lehet. Ha minden egyes randomizált pozícióban meg akarjuk engedni mind a 20 aminosav előfordulását, akkor a 10^{10} -es korlátot figyelembe véve legfeljebb 6-7 pozíció randomizálható úgy, hogy valóban az összes variáns létrejöjjön. Kristályszerkezetek elemzése és az eddig meghatározott motívumok alapján az LC8 kötőárkaiban hét-nyolc aminosav hosszúságú peptid fér el. Ezek alapján olyan naiv könyvtárat hoztam létre, melynek hét pozíciójában mind a 20 aminosav előfordulását megengedtem, míg az LC8 motívum legkonzerváltabb 0.-ként definiált pozíciójában a leggyakrabban előforduló glutamint rögzítettem ($X_5X_4X_3X_2X_1Q_0X_1X_2$). A rögzített 0. pozíció előnye, hogy a szelektált szekvenciák elemzésénél segít az egyes pozíciók azonosításában, azaz a szekvenciák egymáshoz illesztésében.

A létrehozott fág-könyvtár $2,1 \times 10^{10}$ klónt tartalmazott, ami majdnem teljesen lefedi a hét aminosav hosszúságú naiv könyvtár egész szekvenciaterét. A szelekció második körében már lényegesen több fág kötődött a DYNLL1 felszínhez, mint a csak BSA-t tartalmazó felszínhez,

más szóval már deketálható volt a dúsulás. A harmadik és a negyedik szelekciós körben a dúsulás már két nagyságrend körüli volt, de BSA-ra specifikus fágok is megjelentek (20. ábra). A harmadik és a negyedik szelekciós körből 36 olyan fág klónt választottam ki, amelyek ELISA kísérletben GST-DYNLL1-hez kötődtek, míg BSA-hoz nem. Ezek DNS szekvenciáját meghatározva 25, DNS-szinten is különböző szekvenciát azonosítottunk (2. függelék táblázat).

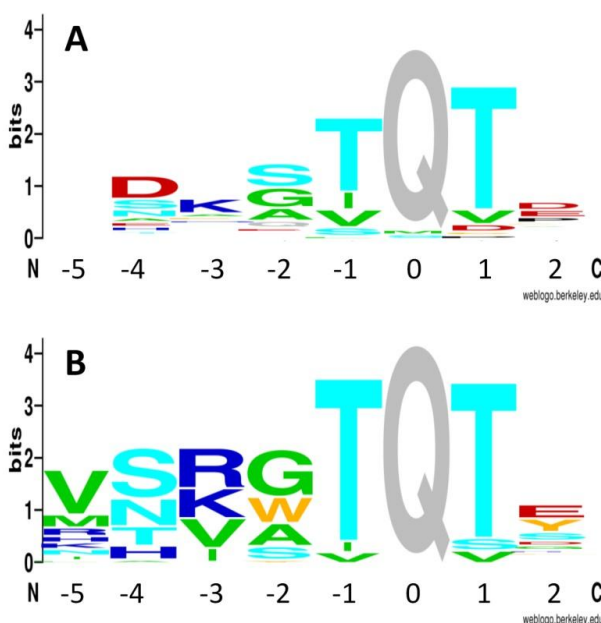


20. ábra: Minden szelekciós ciklus után meghatároztam a BSA-t (negatív kontroll), az anti-FLAG antitestet (pozitív kontroll) és a DYNLL1/LC8-at tartalmazó felületről eluálható fágok számát. Az eluált fágokból tízszeres hígítási sorozatokat csináltam, majd az ampicillin rezisztenciát hordozó fágokkal *E. coli* sejteket fertőztem. A sejteket ezután ampicillin tartalmazó táptalajon növesztettem. Ilyen körülmények között csak a fágokkal fertőzött sejtek képesek szaporodni. Egy sejtet csak egy fág képes fertőzni. A szelekció negyedik körében az anti-FLAG antitestet (a lemezen a második oszlop) és a DYNLL1/LC8-at (a lemezen a harmadik oszlop) tartalmazó felületről ugyanannyi fágot lehetett eluálni, azaz a DYNLL1/LC8-at tartalmazó felület a szelekció negyedik ciklusában gyakorlatilag az összes fágklónt megkötötte. A BSA-t tartalmazó felületről bár szintén lehetett fágokat eluálni, de számuk századannyi volt (a lemezen található első oszlop). Az észlelt, két nagyságrendű dúsulás előrevetíti, hogy DYNLL1/LC8-ra specifikusan kötődő könnyvtárgakat is sikerült szelektálni. Mivel a második és a harmadik ciklus után is megfelelő dúsulást tapasztaltam, a klónok nagy részét a harmadik ciklus után izoláltam és meghatároztam DNS szekvenciájukat.

Az izolált szekvenciákat felhasználva WebLogo program segítségével meghatároztuk az egyes pozíciók konzerváltság fokát és aminosav preferenciáját (21. ábra). Ha ezt a LOGO ábrát összehasonlítjuk az eddig azonosított partnerek (2. táblázat) felhasználásával készített LOGO ábrával, akkor megállapíthatjuk, hogy ezek nagyvonalakban hasonlítanak egymásra, azaz az általunk használt bivalens fág-bemutató működött, és az *in vitro* irányított evolúciós megközelítés a természethez hasonló eredményt hozott. A 0. pozíciót leszámítva, amit rögzítettünk, a legkonzerváltabb pozícióként a -1. és az 1. rajzolódik ki, melyekben leggyakrabban treonin és valin található. A 2. pozíció promiszkuus, azonban gyakran negatív töltésű aszpartát és glutamát szelektálódott. A -2., -3. és -4. pozíciók közepesen konzerváltak. A -2. pozícióban általában rövid oldalláncot tartalmazó aminosavak, mint például glicin, alanin vagy szerin fordulnak elő. Érdekes módon a természetben található partnerektől eltérően triptofánt is izoláltunk. A -3. pozíció főleg pozitívan töltött vagy kis, hidrofób oldalláncú aminosav maradékokat, mint valint vagy izoleucint tartalmazott. A -4. pozícióban

poláros aminosavak, treonin vagy aszparagin szelektálódott, melyek képesek H-híd kialakítására. A természetben tapasztaltaktól való legnagyobb eltérést a -5. pozíció konzerváltsági fokának megnövekedése jelentette. Itt leggyakrabban apoláros aminosavak, valin, metionin, izoleucin és leucin, vagy olyan poláros aminosavak szelektálódtak, amelyek hosszú hidrofób karakterű oldallánc részlettel rendelkeznek (arginin és lizin). A leggyakoribb aminosav a valin volt.

21. ábra: Ismert LC8 motívumok (A) és a fág-bemutató során XXXXXQXX bivalens könyvtár használatával szelektált motívumok (B) felhasználásával készített LOGO szekvenciák. Az adott pozíció magassága a konzerváltságot, míg az aminosavak nagysága az adott aminosavnak az adott pozícióban való előfordulás frekvenciáját tükrözi. A 0-ik pozícióban található Glu-t a randomizálás során rögzítettem (szürke). Az aminosavak színek jelölik a hasonló kémiai tulajdonságot. Az ábrát WebLOGO programmal készítettem (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).



4.6 Fág-bemutató eredményei alapján egy nagy affinitású motívum létrehozása

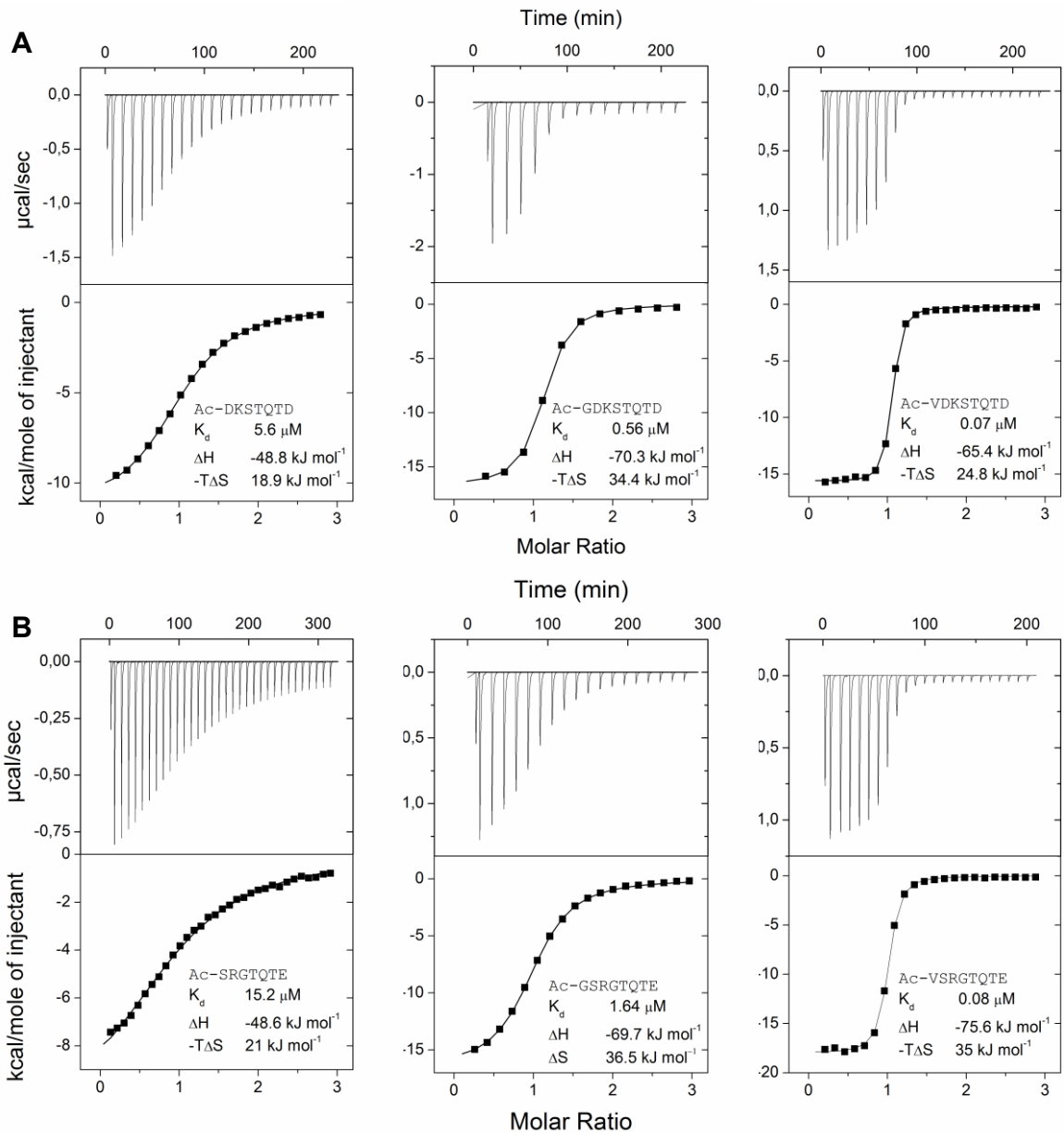
Az irányított evolúció nagyobb mértékben konzerválta a -5. pozíciót, mint a természetes evolúció. Kíváncsiak voltunk, hogy a -5-ös pozícióban leggyakrabban szelektált valin milyen módon járul hozzá a kötődéshez.

Konszenzus szekvenciának nevezem azt a szekvenciát, amikor abban minden egyes pozíció az adott pozícióban leggyakrabban előforduló aminosavat tartalmazza. Szintetikus úton előállítottuk mind az ismert partnerek által (D₋₄K₋₃S₋₂T₋₁Q₀T₁D₂), mind az irányított evolúció által meghatározott (V₋₅S₋₄R₋₃G₋₂T₋₁Q₀T₁E₂) konszenzus peptid monomer formájának olyan variánsait, melyek a -5. pozícióban rendre acetil-csoportot, glicint vagy valint tartalmaztak (Ac₋₅, Gly₋₅ és Val₋₅). A valin glicinre való cseréjével a valin oldallánc, míg a glicin acetil csoportra való cseréjével a peptidgerinc szerepét tudom nyomom követni. A kölcsönhatások termodinamikai paramétereit izotermális titráló kaloriméter használatával határoztam meg (22. ábra, 6. táblázat). Minden esetben 1:1 sztöchiometriát figyeltünk meg, azaz 2 peptid kötődött egy dimer DYNLL1-hez. Mindegyik motívum kötődése, hasonlóan a

K₃X₂T₁Q₀T₁ családhoz tartozó Bmf, Tp53bp1 és ATMIN fehérje kötőpeptidjéhez (K₃A₂T₁Q₀T₁D₂) entalpiikusan kedvező, de entrópiikusan kedvezőtlen folyamat volt („Az LC8 dinein könnyűlánc különböző motívumcsaládokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása” című 4.2 fejezet, **4. táblázat**). Mindkét Ac₅ variáns disszociációs állandója több mikromólos volt (Ac₅D₄K₃S₂T₁Q₀T₁D₂ K_d = 5,6 μM, Ac₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ K_d = 15,2 μM). Ha az acetyl csoportokat glicinre cseréltük, az affinitások mindkét esetben nagyjából tízszeresükre emelkedtek (G₅D₄K₃S₂T₁Q₀T₁D₂ K_d = 0,56 μM, G₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ K_d = 1,64 μM). A tapasztalt affinitásnövekedés entalpiavezérelt volt, ami alapján feltételezhető, hogy a -5-ös pozíció peptidgerince stabilizálja a kölcsönhatást. A glicin valinra való cseréje következtében az affinitás tovább emelkedett (V₅D₄K₃S₂T₁Q₀T₁D₂ K_d = 0,07 μM, V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ K_d = 0,08 μM), ami legalábbis az irányított evolúció által meghatározott konszenzus szekvenciájú peptid esetében a kedvező entalpiikus tagból eredt. Ez alapján feltételezhető, hogy a valin hidrofób oldalláncán keresztül további stabilizáló kölcsönhatások alakulnak ki.

Partner	K _d (μM)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	-TΔS (kJ mol ⁻¹)
Ac-DKSTQTD	5,6	-48,8	18,9
Ac-GDKSTQTD	0,56	-70,3	34,4
Ac-VDKSTQTD	0,07	-65,4	24,8
dimer- GDKSTQTD	< 0,007*	-76,2	< 29,4*
dimer- VDKSTQTD	< 0,009*	-88,0	< 42,0*
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-GSRGTQTE	< 0,003	-69,6	< 20,6
dimer-VSRGTQTE	< 0,007	-64,9	< 17,6

6. táblázat: Az ismert- és a fűg-bemutató során szelektált LC8 kötőmotívumok felhasználásával készített konszenzus szekvenciájú peptid variánsok DYNLL1/LC8-cal való komplexképződésének termodinamikai állandóit. A *-gal jelölt paraméterek az ITC mérések által meghatározható tartományon kívül esnek.



22. ábra: Az **A** ábra az ismert, míg a **B** a fág-bemutítás során szelektált LC8 kötőmotívumok felhasználásával készített konszenzus szekvenciájú peptid variánsok DYNLL1/LC8-cal való komplexképződésének izotermális titráló kalorimetria során meghatározott hőprofiljait mutatja.

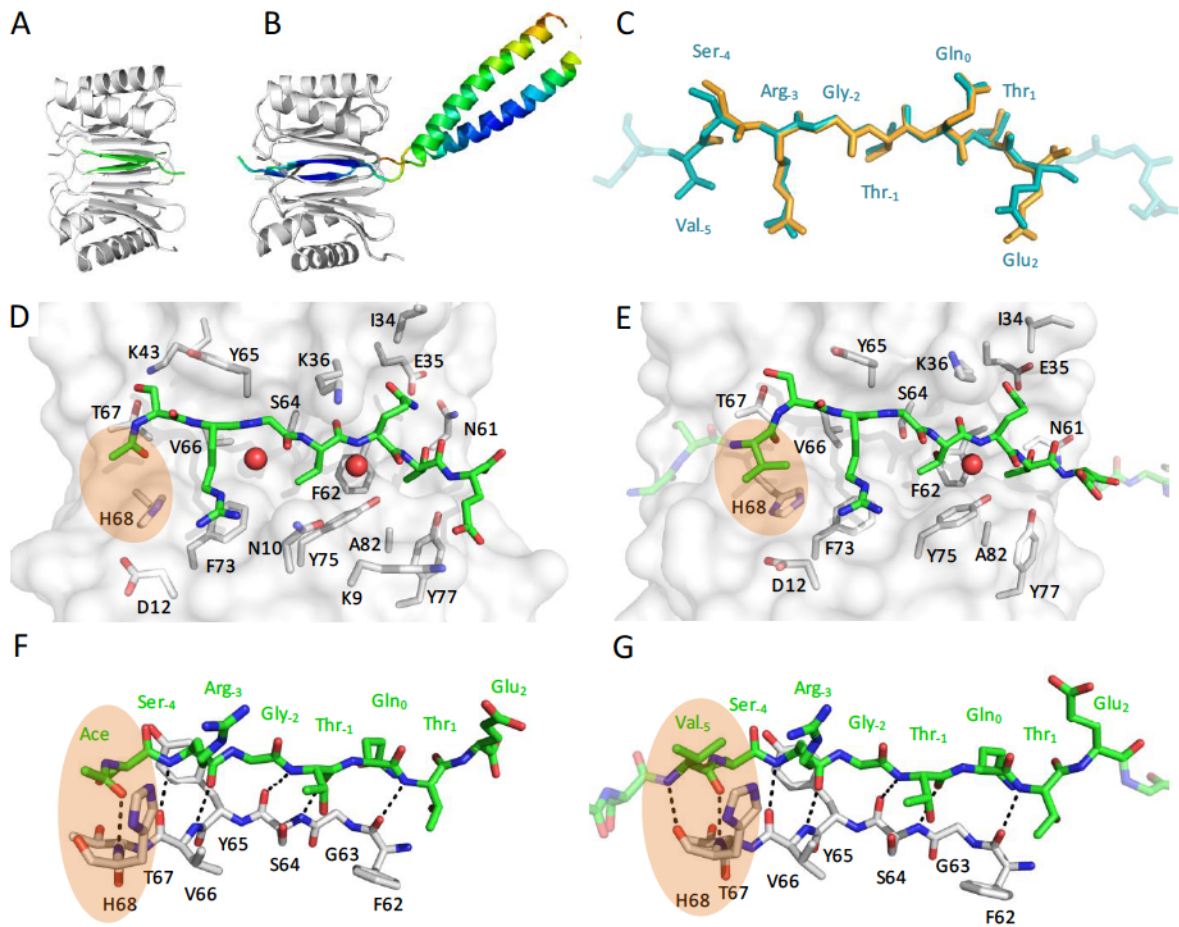
A -5. pozícióban valint tartalmazó konszenzus szekvenciájú peptidek affinitása egy nagyságrenddel meghaladta az addig legerősebben kötődőnek ($K_d = 0,7 \mu\text{M}$) ismert monomer Bmf peptid affinitását. Vajon tovább növelhető-e ez a kötőerősség a fág-bemutítás során is használt, a peptidek dimerizálásából származó aviditás hatása által? Rekombináns módon előállítottam és *E. coli* sejtekben heterológ expressziós rendszerben túlermeltettem a konszenzus szekvenciával rendelkező peptidek GCN4 leucin-cipzárral dimerizált Gly₅ és Val₅ változatait. A saját monomer formájához viszonyítva a dimer G₅D₄K₃S₂T₁Q₀T₁D₂

legalább 80-szor ($K_d \sim 0,007 \mu\text{M}$), a dimer $G_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ több mint 500-szor erősebben kötött ($K_d \sim 0,003 \mu\text{M}$). A dimerizált Val_5 peptidek affinitása vélhetőleg ezeket az affinitási értékeket is meghaladja, azonban a szubnanomólos disszociációs állandók a direkt titrálással történő ITC mérések által meghatározható affinitás tartományon kívül esnek (**6. táblázat**) (Turnbull et al. 2003).

Összességében elmondható, hogy rendkívül nagy affinitású monomer és dimer LC8 kötőmotívumokat állítottunk elő irányított evolúció segítségével. A nagy affinitásnak köszönhetően ezeket a jövőben az LC8 dinein könnyűlánc kompetitív inhibitoraként lehet majd alkalmazni.

4.7 A -5. pozíció szerepének szerkezeti alapjai

Annak érdekében, hogy feltárjuk a -5. pozícióban található valin affinitásnövelő szerepét a kölcsönhatásban, kristályosítottuk és megoldottuk az LC8/DYNLL2-Ac-S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ (PDB: 2XQQ) és az LC8/DXNLL2-dimer Ac-V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ komplexek (PDB: 3P8M) atomi felbontású szerkezetét (**23. ábra A és B része**). Először a DYNLL2-monomer Ac-V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ komplexet próbáltuk kristályosítani, de a komplex összemérése után azonnal vékony, tű alakú kristályok fejlődtek, melyek röntgenszórása csak 10 Å felbontást eredményezett. A kristályképződést hosszas próbálkozás után sem sikerült lassítani. A dimer Ac-V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptid esetében a kristályképződés valószínűleg a GCN4 leucin-cipzárok hatása miatt lassabb volt a monomer változat esetében tapasztaltnál. A lassabb kristályképződés miatt már olyan méretű kristályok növekedtek, melyek elegendőek voltak a röntgensugarak megfelelő szórásához.



23. ábra: A DYNLL2-monomer $Ac-S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid (A, PDB: 2XQQ) és a DYNLL2-dimer $Ac-V_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid (B, PDB: 3P8M) komplexek kristályszerkezetei és azok részletes összehasonlítása (C, D, E, F és G). Mind az $Ac-S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$, mind az $Ac-V_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid a DYNLL2 kötőárcaiban parallel módon β -konformációs állapotban találhatóak (A és B). A peptidek konformációs állapotai nagy egyezést mutatnak (C). A dimer $Ac-V_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid esetében a GCN4 leucin-cipzár lefutása a peptid és a DYNLL2 által meghatározott szimmetriasíktól eltér. A feszültségmentes torzulást a leucin-cipzár és az $Ac-V_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid között található, kellően flexibilis glicin-serin linker biztosítja. Az A és a B ábrákon a peptidek B-faktor szerint vannak színezve (kéktől: 48, piros: 131). Az E és a D ábrákon a DYNLL2-nek a peptidektől 4 Å távolságra található, a peptidekkel másodlagos kölcsönhatásokat kialakító oldalláncai vannak szürke színnel kiemelve. A -5-ös pozícióban található acetát és valin oldallánc, valamint a DYNLL2 68-as hisztidinje narancssárga színnel vannak kiemelve (D, E, F és G). Az F és a G ábrákon a peptidek főlánc (zöld) és a DYNLL2 között kialakuló H-híd hálózat látható. A $Ac-V_5S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ esetében a -5. pozícióban található valin a DYNLL2 68-as hisztidinjével hat kölcsön, ami az $Ac-S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ peptid esetében is megfigyelhető öt H-híd kölcsönhatáson felül további két H-híd kötés létrejöttét teszi lehetővé.

Sikerült megoldani az $Ac-S_4R_3G_2T_1Q_0T_1E_2$ -DYNLL2 komplex 1,31 Å felbontású röntgenszerkezetét (23. ábra A része). Az LC8 általunk meghatározott szerkezete hasonlít a

korábban meghatározott, különböző peptidekkel komplexben található LC8 szerkezetekhez. A szerkezetben található mindkét Ac₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptid a DYNLL2 dimerizációs felszínén kialakuló szimmetrikus, parallel kötőárkokban kinyújtott β-lánc szerkezetben található. Összehasonlítva az Ac₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptid szerkezetét a korábban meghatározott LC8-peptid komplexek szerkezeteiben található peptidekkel megállapíthatjuk, hogy a főlánc lefutásában és a kölcsönhatás kialakításában nagy szerepet játszó -4-es, -1-es, 0 és 1-es pozíciókban lévő arginin, treonin, glutamin és treonin oldalláncok konformációs állapotaiban szignifikáns különbség nem tapasztalható.

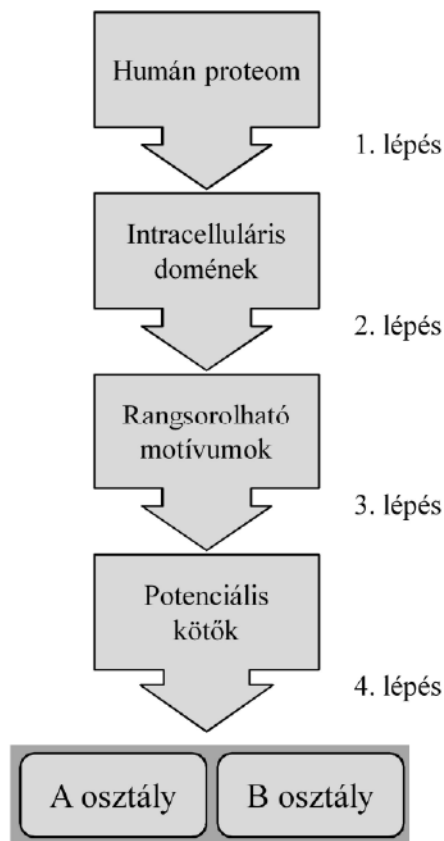
A GCN4 leucin-cipzár által dimerizált Ac-V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂-DYNLL2 komplex szerkezetét 2,9 Å felbontásban sikerült megoldani (**23. ábra B része**). A dimer DYNLL2 és kötőárkainak konformációs állapota jó egyezést mutat az Ac₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂-DYNLL2 komplexben lévő DYNLL2 szerkezetével (**23. ábra C része**). A dimer DYNLL2 és a kötőárkaiban található V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptidrészletek forgásszimmetrikusak, azonban a GCN4 leucin-cipzár *coiled coil* régiójának elhelyezkedése eltér ettől a szimmetriasíktól. Az eltérés valószínűleg a két hélix eltérő kölcsönhatási hálózatából ered. A leucin-cipzár és a V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptidrészlet között található hat aminosav hosszúságú glicin-szerin linker megnövekedett B-faktor értéke mutatja, hogy az megfelelően flexibilis, így a leucin-cipzár és a motívum közötti torzulás feszültségmentesen tud kialakulni (**23. ábra B része**). A fág-bemutató során optimalizált négy aminosav hosszúságú linkerhossz tehát valóban elegendő ahhoz, hogy a leucin-cipzár sztérikusan ne befolyásolja a peptid és a DYNLL2 kölcsönhatását. A rekombináns dimer konstrukciók esetében, a géntechnológiai előállítás következtében az amino-terminálisnál található extra glicin és szerin aminosavak nem hatnak kölcsön a DYNLL2-vel, így valószínűleg nem befolyásolják számottevően a kötődést.

Ha összehasonlítjuk a két komplexben található peptid szerkezetét és kölcsönhatási hálózatát, akkor megállapíthatjuk, hogy összességében a két peptid szerkezetében nagy eltérés nem azonosítható (**23. ábra C, D és E része**). A -5. pozícióban található valin a DYNLL2 68-as hisztidinjével hat kölcsön. A kialakult extra kölcsönhatás eredménye, hogy az Ac₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ peptid főláncá által kialakított öt H-hídon kívül további kettő alakul ki (**23. ábra G és F része**). A stabilizált β-lánc és a Val-5 His68-cal kialakított extra kölcsönhatása együttesen eredményezheti a -5. pozícióban valint tartalmazó peptidek megnövekedett affinitását.

4.8 Eddig nem azonosított humán LC8 kötőpartnerek jóslása az irányított evolúcióval meghatározott mintázat alapján

Fág-bemutató alkalmazása során számos esetben tapasztalták, hogy a lineáris motívumok pozícióinak irányított evolúció által meghatározott aminosav gyakorisága és a kötési energia között pozitív összefüggés van (Weiss et al. 2000; Pal et al. 2003; Pal et al. 2005; Pal et al. 2006; Szenthe et al. 2007; Kocsis et al. 2010). Ha feltételezzük, hogy az egyes pozíciók függetlenül járulnak hozzá a kölcsönhatás kialakításához, akkor a fág-bemutató segítségével meghatározott mintázat alapján megbecsülhetjük egy nyolc aminosav hosszúságú peptidnek az LC8-hoz való kötési energiáját. Ezek alapján eddig még nem azonosított LC8 partnereket jósolhatunk a humán proteom bioinformatikai elemzésével.

A jóslás folyamatábráját a **24. ábra** mutatja. Az irányított evolúció használatával meghatározott mintázaton kívül felhasználtuk, hogy az LC8 kötőmotívumai a partnerek intracelluláris részének rendezetlen régióiban találhatóak. Első lépésben eltávolítottuk a UniProt adatbázisban található humán fehérjék közül az extracelluláris vagy membránfehérjeszakaszként jellemzett fehérjéket, fehérjeszakaszokat. Az intracelluláris fehérjéknek és fehérjeszakaszoknak azokat a nyolc aminosav hosszúságú fragmentumait kerestük ki, amelyeket IUPred programmal rendezetlennek jósoltunk, és amelyek 0. pozíciójában glutamin található (a könyvtár 0. pozíciójában fixáltuk a glutamint). Ezek után az egyes pozíciókat minden konkrét szekvenciában a fág-bemutató során meghatározott aminosavak gyakorisága alapján pontoztuk („*position scoring matrix*”). Ezt követően az egyes pozíciók pontszámait összegeztük (a 0-ik pozícióban található glutamin 0 pontot ért). A peptideket a végső pontszámuk szerint sorba rendeztük. Az elérhető legmagasabb pontszám, melyet a V₅S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂ konszenzus szekvencia kapott, 367. Az oktapeptidek sűrűségeloszlása 0-tól 367 pontig folyamatos lefutású, exponenciális jellegű csökkenést mutat. Megvizsgálva az ismert partnerek elhelyezkedését, megállapítottuk, hogy azok a magas pontszámú régióban koncentráálódtak. Az ismert partnerek mellett azonban számos, eddig partnerként nem azonosított fehérjét is találtunk, ami eddig nem azonosított humán LC8 partnerek lehetőségét vetíti előre.



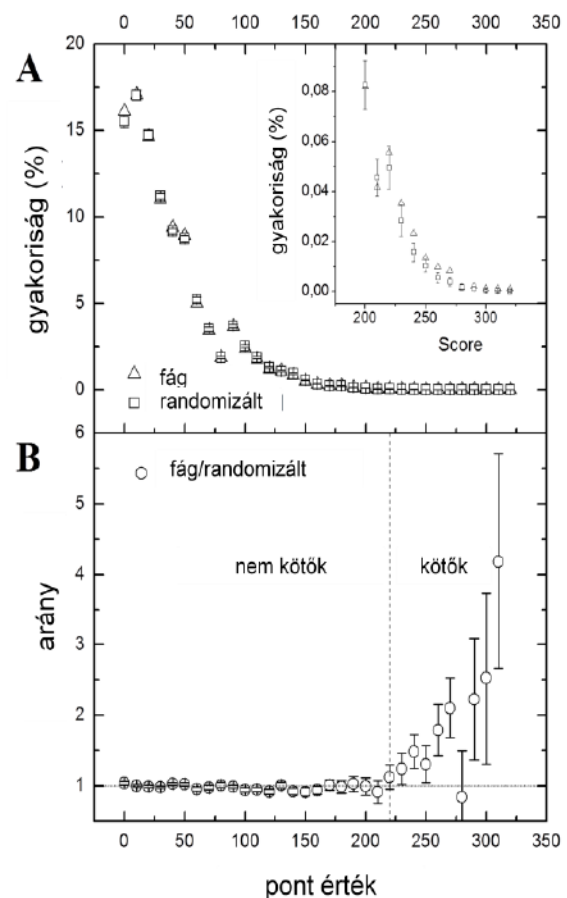
24. ábra: Humán LC8 partnerek jóslásának folyamatábrája. A jóslás során a UniProt adatbázisban található fehérjék intracelluláris részeit vizsgáltuk (1. lépés). Ezután a fehérjéknek azokat a nyolc aminosav hosszúságú szakaszait gyűjtöttük ki, melyek 0-ik pozíciója (lásd LC8 kötőmotívum számozás) glutamint tartalmazott, valamint legalább egy pozícióját IUPred program segítségével rendezetlennek találtuk (2. lépés). A jóslás harmadik lépésében a motívumokat a fág-bemutatók során meghatározott aminosav gyakoriság alapján pontoztuk (3. lépés). Statisztikai módszer segítségével küszöbértéket határoztunk meg (25. ábra). A küszöbérték felett található motívumokat nagyon megbízható (A osztály) és kevésbé megbízható csoportokba (B osztály) rendeztük. A kevésbé megbízható csoport tagjainak motívumai olyan aminosavakat is tartalmaznak, melyek sem a fág-bemutatók során nem szelektálódtak, sem az ismert partnerekben nem találhatóak meg.

A partnerek keresése során az volt a célunk, hogy minimalizáljuk a fals pozitív találatokat. Arra helyeztük a hangsúlyt, hogy olyan magas pontszám küszöbértéket határozzunk meg, ami felett az LC8 kötőpartnernek jóslott fehérjék nagy valószínűséggel valós partnerek. Ez szükségszerűen annak az árán történt, hogy a jóslásból kimaradnak küszöbértéknél kisebb pontszámú, valós kötőpartnernek is, azaz fals negatív találatok. Elemi fontosságú volt, hogy milyen alapon definiálunk küszöbértéket. Feltételeztük, hogy az LC8-kötés képessége a természetben lezajlott funkcionális pozitív természetes evolúció eredménye volt. Feltételeztük, hogy emiatt a humán proteomban nagyobb arányban fordulnak elő olyan 8-tagú szekvenciárszletek, amelyek beleillenek az irányított evolúcióval meghatározott LC8 kötőmintázatba, mint olyanok, amik valós funkcióhoz nem rendelhető, de azonos aminosav-statisztikájú 8-as motívumba illenek. E gondolatmenetet követve, annak érdekében, hogy meghatározzuk, mi az a küszöbérték, ami fölött indokolt egy fehérjét potenciális LC8 partnerként definiálnunk, az oktapeptidek sűrűségeloszlását statisztikai úton elemeztük (25. ábra).

Az analízis első lépéseként precízen definiált módon random mintázatokat készítettünk. Rögzítettük a fág-bemutatók során meghatározott mintázat pozícióinak aminosav

gyakoriságait, viszont magukat a pozíciókat ezer különböző módon összekevertük. Tehát 1000 olyan szekvenciasereget hoztunk létre, amelyek egyes pozícióira a fágselekcio eredményeként kapott aminosav gyakoriságok voltak számolhatók, de maguk a pozíciók a valós sorrendtől eltérő sorrendben követték egymást. Így a teljes 8-as ablakra nézve megőriztük a kumulált aminosav gyakoriságokat, de a random mintákban megszűnt az eredeti szekvenciainformáció. Belátható, hogy elenyésző annak a valószínűsége, hogy az így randomizált mintázatok valós humán fehérje kötőmotívumoknak feleljenek meg. Ezután az 1000 ilyen random mintázat alapján ezerszer újrapontozzuk a fentiek szerint leírt módon a humán proteomot. Az így kapott 1000 sűrűségeloszlás függvény átlagát összehasonlítottuk a jóslásunk során kapott sűrűségeloszlás függvényével. A már említett pozitív funkcionális természetes evolúcióra hivatkozva úgy érveltünk, hogy egy megfelelően magas küszöb pontérték felett a valós kötőpartnerekre vonatkozó függvény magasabb sűrűségértékeket ad, mint a random függvények átlaga. Annál a pontértéknél definiáltuk a küszöbértéket, ahol a valós / random sűrűségérték arány szignifikánsan ($> 5\%$) eltér az 1-től.

25. ábra: A küszöbérték statisztikai úton való meghatározása. A **A** ábra az 1000 randomizált mintázat és a fág-bemutató eredményei alapján pontozott motívumok sűrűség-eloszlás függvényét mutatja. Mindkét függvénynek exponenciális jellegű lecsengése van. A **B** ábrán a két függvény aránya látható (fág:randomizált). Alacsony pontértéknél a függvények aránya közel 1, azonban 220 pont fölött az átlag szignifikánsan eltér az 1-től, azaz a fág-bemutató alapján meghatározott valós sűrűségfüggvény több szekvenciát tartalmazott, mint a random motívumok által meghatározott véletlenszerű függvény. Ezek alapján 220 pontértéknél állapítottuk meg a jóslás során használt küszöbértéket.



Feltételezésünk helyes volt, a két sűrűségeloszlás függvény 220-as pontérték fölött szignifikáns mértékben elvált egymástól, definiálva ezzel a küszöbértéket. A szűrt adatbázisunk 229 motívuma kapott 220 pontnál magasabb értéket. Ezek közül 12 fehérje 17 motívumát korábban már azonosították (**4. függelék táblázat**).

A küszöbérték felett található 229 motívumot csoportosítottuk annak érdekében, hogy a lehető legjobban csökkentsük a fals pozitív találatok számát. Megbízható partnernek jósltunk (**A csoport**) 105 olyan motívumot, amelyek minden egyes aminosava az adott pozícióban már legalább egyszer előfordult vagy a fág-bemutató során szelektált peptidekben vagy a természetből már megismert motívumokban (**4. függelék táblázat**). A kevésbé megbízható partnernek jósltak csoportjába (**B**) azok a motívumok kerültek, amelyek olyan aminosavakat is tartalmaztak, melyek az adott pozícióban eddig nem fordultak elő (**5. függelék táblázat**).

4.9 Nem-kanonikus motívumok keresése, partnerek jóslásának fejlesztése második generációs fág-könyvtár segítségével

A fentiekben leírt fág-bemutató során használt könyvtár (XXXXXQXX) esetében a legkonzerváltabb 0-ik pozícióban rögzítettem a glutamint. A fixálás előnye egyrészt abban állt, hogy nyolc aminosav hosszúságú kötőhellyel tudtam dolgozni, annak ellenére, hogy teljes könyvtár létrehozásához egyszerre csak hét pozíciót lehet totálisan randomizálni. A kristályszerkezet alapján 7-8 aminosav fér el a kötőárokban, így bizonyos lehettem abban, hogy a vizsgált motívumhossz nem lesz túl rövid. A glutamin rögzítésének másik előnye az volt, hogy a szelektált peptidek egymás alá rendezése és összehasonlítása során a glutamin definiálta a 0. pozíciót. A stratégia hátránya ugyanakkor természetesen az volt, hogy magának a 0. pozíciónak az aminosav preferenciájáról így nem kaptunk információt. A pozíció rögzítésével definíciószerűen nullára csökkent annak az esélye, hogy nem-kanonikus (a 0. pozícióban nem glutamint hordozó) motívumokat szelektáljunk. Annak érdekében, hogy finomítsuk a korábbiakban leírt jóslásunkat, további fág-bemutató kísérleteket is elvégeztünk:

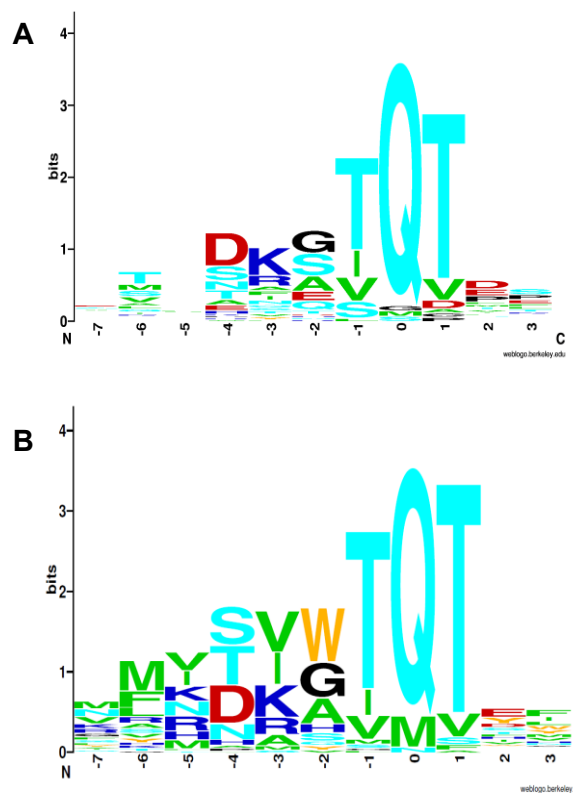
Egyrészt az $X_{-5}X_{-4}X_{-3}X_{-2}X_{-1}Q_0X_1X_2$ könyvtárral megismételtük a szelekciót, és további 26 újabb DNS szinten is egyedi klón szekvenciáját dolgoztuk fel. A korábbi kísérlettel együtt így 51 egyedi klónt azonosítottunk, ami a jóslás során a partnerek pontozását finomítja (**4. függelék táblázat**).

Másrészt az $X_{-5}X_{-4}X_{-3}X_{-2}X_{-1}Q_0X_1X_2$ könyvtár eredményeit felhasználva második generációs fágkönyvtár segítségével finomítottuk a mintázat jellemezését. A második

könyvtár készítésénél az $X_5X_4X_3X_2X_1Q_0X_1X_2$ könyvtár eredményei alapján az 5., -4., -3., -2. és 2. pozíciókban rögzítettük az előző szelekció alapján leggyakoribb aminosavat, azonban a -7., -6., -1., 0., 1. és 3. pozíciókban megengedtük mind a 20 aminosav előfordulását. Az így előállított $X_7X_6V_5S_4R_3G_2X_1X_0X_1E_2X_3$ könyvtárat ugyanúgy mutattuk be fagon, és ugyanúgy szelektáltuk, mint ahogy azt az első szelekcióban tettük. Ezzel a második generációs könyvtár segítségével tehát meghatározható a 0. pozíció aminosav preferenciája. Emellett ebben a könyvtárban az eredetileg nyolc aminosav hosszúságú motívum jellemzését kiterjesztettük amino-terminális irányban két, míg karboxil-terminális irányban egy pozícióval. Összesen 53 db DNS-szinten egyedi szekvenciájú klónt sikerült azonosítani (**6. függelék táblázat**). A két könyvtár eredményei alapján a WebLOGO program segítségével elkészítettem az LC8 11 aminosav hosszúságú motívumának mintázatát (**26. ábra**). A -7, -6 és a 3-as pozíciók mérsékelten voltak konzerváltak, azonban a hidrofób karakterű aminosavak –, mint a valin, leucin, izoleucin, fenil-alanin és tirozin – túlsúlya volt megfigyelhető. A -1 és az 1-es pozíciókban a korábbi eredményekhez hasonló arányban szelektálódott ki valin, izoleucin és treonin. Megjegyzendő, hogy néhány esetben metionint, szerint és alanint is azonosítottunk ezekben a pozíciókban. A korábbi könyvtárral történő szelekció esetében nem jellemzett 0. pozícióban a leggyakrabban glutamint határoztunk meg, azonban 6 klón esetében sikerült metionint és egy klón esetében aszparagint szelektálni. Érdekes módon a -2. pozícióban, ahol az ismert partnerek esetében általában kis oldalláncú aminosavak találhatóak, a leggyakrabban előforduló aminosav triptofán volt. A konszenzus szekvenciájú motívumot (MMVSVWTQTEF) szintetikusán előállítottuk, de sajnos a magas hidrofobicitásából adódó gyenge oldhatósága miatt nem volt lehetőségünk tanulmányozni.

26. ábra: Ismert LC8 motívumok (A)– és a két fág-bemutató eredményeinek összesítésével (B) létrehozott LC8 kötőmotívum LOGO szekvenciái. Az adott pozíció magassága a konzerváltságot, míg az aminosavak nagysága az adott aminosavnak az adott pozícióban való előfordulás frekvenciáját tükrözi. Az aminosavak színek kódja a hasonló kémiai tulajdonságot jelöli. Az ábrát WebLOGO programmal készítettem (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

A fág szelekciók során összesített eredmények alapján megismételtük a korábbiakban részletezett LC8 partner jóslást (24. ábra). A 305 pontos küszöbérték fölött 172 egyedi 8-tagú motívum szerepel, melyek közül 15 fehérje 22 motívumáról már ismert, hogy az LC8 partnere. A 8-tagú motívumokat a korábbiakhoz hasonlóan csoportosítottuk. Az A csoportba 87 olyan motívum került, amelyek minden egyes aminosava az adott pozícióban már legalább egyszer előfordult vagy a fág-bemutató során szelektált peptidekben vagy az ismert motívumokban (7. függelék táblázat). A kevésbé megbízható partnernek jóslottak csoportjába (B csoport) került az az 54 motívum, amely tartalmazott olyan aminosavakat is, melyek az adott pozícióban még nem fordultak elő (8. függelék táblázat).



	Első jóslás	Második jóslás
küszöbérték felett található összes motívum (db)	229	172
küszöbérték felett található ismert motívumok száma (db)	17	22
az A csoportban található motívumok száma (db)	105	87
az ismert motívumok küszöbérték feletti sűrűsége (%)	7	13

7. táblázat: Az első és második jóslás eredményének összehasonlítása. A jóslás finomítása során a küszöbérték felett található ismert kötőszekvenciák hányada közel megkétszereződött.

Bár a második könyvtár használatával azonosítottunk a 0-ik pozícióban nem glutamint tartalmazó klónokat, a T₋₁Q₀T₁ motívumon kívül más szekvencia összetételű peptid nem található a küszöbérték felett. Ha összehasonlítjuk az első és a második jóslás eredményét, megállapíthatjuk, hogy az első jóslás során a küszöbérték felett lévő 229 motívum közül 17 (7 %) volt már eddig is ismert, míg a második jóslás során 172 közül 22 motívumot (13 %)

azonosítottak már (**7. táblázat**). A jóslás finomítása során tehát csaknem duplájára nőtt a küszöbérték feletti ismert kötőszekvenciák aránya, ami alapján feltételezhetjük, hogy a jóslás megbízhatóbbá vált.

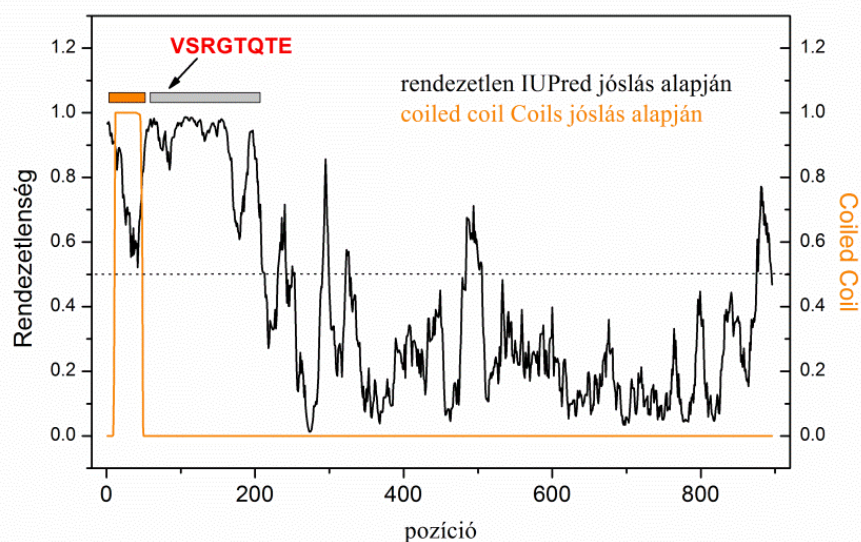
Szintetikus úton előállítottuk a 11 aminosav hosszúságú, amino-terminálison acetilált konszenzus szekvenciát, ami mindegyik pozícióban a szelekciók során leggyakrabban előforduló aminosavakat tartalmazta. A létrehozott M₇M₆V₅S₄V₃W₂T₁Q₀T₁E₂F₃ peptid azonban – valószínűleg a nagyfokú hidrofobicitása miatt – fiziológiás körülmények között nem oldódott fel a további kísérletek elvégzéséhez szükséges megfelelő koncentrációban.

4.10 Két jóslott partner (az EML3 és az ATMIN) kísérletes igazolása

Az általunk jóslott humán LC8 partner közül két fehérje, az EML3 (*Echinoderm microtubule-associated protein-like 3*, Uniprot kód: Q32P44) és az ATMIN (*ATM interactor*, Uniprot kód: O43313) esetében kísérletes úton is megvizsgáltuk a kölcsönhatást.

4.10.1 *Echinoderm microtubule-associated protein-like 3* (EML3)

A 896 aminosav hosszúságú, a mikrotubulusok összeszerelésének dinamizmusában részt vevő *Echinoderm microtubule-associated protein-like 3* (EML3) fehérje (Tegha-Dunghu et al. 2008) SLVSRGTQTET szekvenciájú motívuma az első jóslás során a legtöbb pontszámot kapta, míg a második jóslás során 362 ponttal a harmadik legvalószínűbb LC8 partnernek jósltuk (**4. és 7. függelék táblázat**). A 78. pozíciónál kezdődő motívum a fehérje rendezetlen régiójában található (IUPred programmal való jóslás alapján). Az LC8 ismert partnereihez hasonlóan az EML3 is nagy valószínűséggel homodimer, hiszen a motívumtól amino-terminális irányban nagyjából harminc aminosavnyi távolságra a COILS program szuperhélix (*coiled coil*) szakaszt jósol (**27. ábra**).

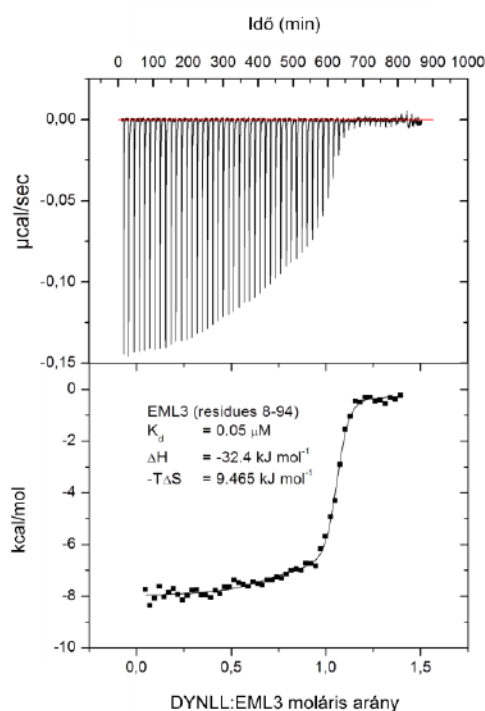


27. ábra: Az Echinoderm microtubule-associated protein-like 3 (EML3) másodlagos szerkezet jósló programokkal (IUPred és COILS) való elemzése. Mindkét algoritmus a 0,5 pontnál (az ábrán szaggatott vonallal kiemelve) nagyobb értéket kapó pozíciókat rendezetlen, illetve coiled coil szerkezetűnek jósol. Az LC8 kötőmotívumaként jósolt VSRGTQTE szekvencia (pontos helyét nyíllal jelöltem) az EML3 amino-végződésénél található rendezetlen régióban (szürke) található, amit amino-terminális irányból egy jósolt coiled coil szakasz (narancssárga) határol.

Az első könyvtár használata során a VSRGTQTE motívumot határoztam meg konszenzusként. A peptid monomer és GCN4 leucin-cipzárral dimerizált változatainak affinitását ITC módszerrel határoztam meg (**22. ábra, 6. táblázat**, monomer peptid $K_d = 0,08 \mu\text{M}$, dimer peptid $K_d < 0,007 \mu\text{M}$). Ezen felül az LC8 - Ac-SRGTQTE - és a dimer VSRGTQTE komplexek kristályszerkezetét is sikerült megoldani, melyekkel magyarázható volt az ITC mérések során tapasztalt nagy affinitás.

Az ellenőrző kísérlethez igyekeztünk teljes hosszúságú EML3 fehérjét előállítani. Ez sajnos nem sikerült. Az EML3-at HEK298 humán sejtvonalban túltermeltetve erős aggregációt tapasztaltunk, ami lehetetlenné tette a teljes fehérjével való további kísérletek elvégzését. Ugyanakkor *E. coli* sejtekben túltermeltetve sikeresen előállítottuk az EML3 (8-94) fragmentumát. Ez nem csak a kötőszekvenciát tartalmazza, de az attól az amino-terminális felé eső *coiled coil* részletet is. ITC módszerrel sikeresen igazoltuk az EML3 (8-94) fragmentum és a DYNLL2 között lezajló komplexképződést (**28. ábra**). A kísérlet során 1:1 sztöchiometriát tapasztaltunk, azaz egy dimer DYNLL2 és egy dimer EML3 fragmentum alakít ki egy komplexet. Érdekes módon mégis a monomer VSRGTQTE peptidhez hasonló affinitást határoztunk meg ($K_d = 0,05 \mu\text{M}$). Elképzelhető, hogy a motívum

és a *coiled coil* között található körülbelül 30 aminosavnyi szakasz hossza már túlságosan nagy ahhoz, hogy érvényesüljön az aviditás hatás.

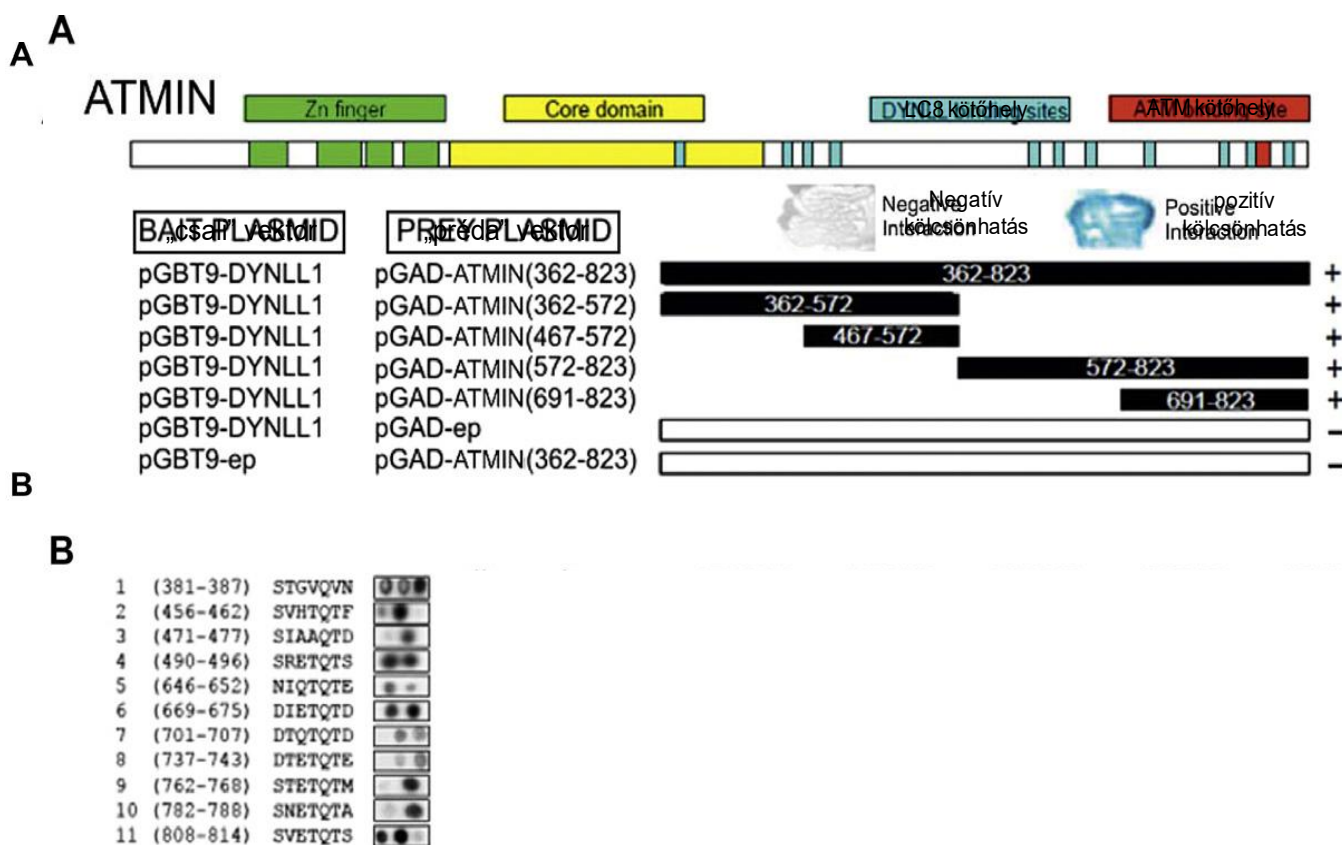


28. ábra: Az EML3 (8-94) fragmentum és a DYNLL1 komplexképződését ITC módszerrel sikeresen igazoltuk.

4.10.2 ATM interactor (ATMIN)

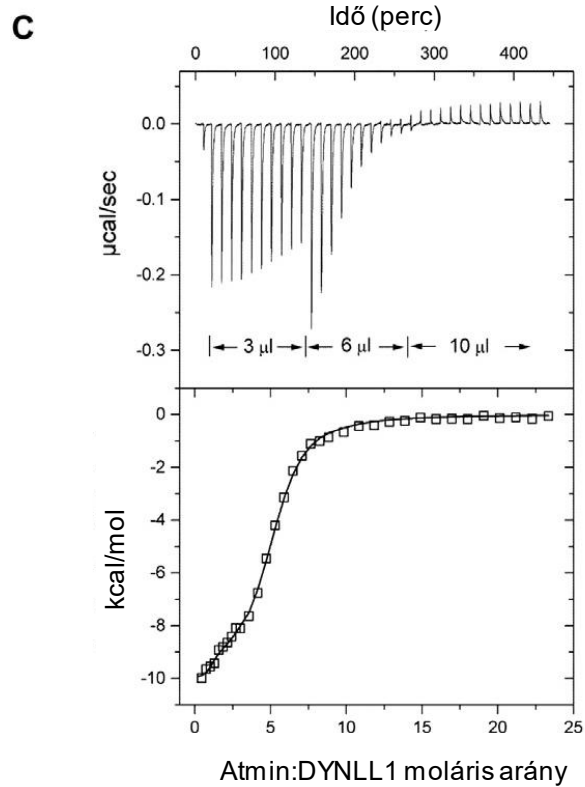
Az ATMIN fehérje a DNS száltörést követő hibajavításban szerepet játszó ATM-kináz partnere és feltételezett szubsztrátja (Heierhorst 2008). Jóslásunkkal párhuzamosan DYNLL1-et használva csali molekulaként élesztő kéthibrid módszerben humán szív cDNS könyvtárból azonosítottuk az ATMIN fehérjét. További fragmentum analízissel megállapítottuk, hogy az ATMIN legalább két kötőmotívumot tartalmaz (**29. ábra**). A 823 aminosav hosszúságú ATMIN az amino-végződésnél négy *Zn-ujj* domént tartalmaz, majd egy a DNS hibajavításban kulcsfontosságú domént (*core* domén) és egy kiterjedt rendezetlen szerkezetű karboxil-terminális végi régiót (~ 420-823). A rendezetlen szerkezetű karboxil-terminális régióban öt darab kötőmotívumot jósltunk (578-NMTDNQTQTID-568, 331 pont; 804-QFSSVETQTSA-814, 328 pont; 665-ESLDIETQTDF-675, 324 pont; 486-GGVSRETQTSG-496, 321 pont; 642-SASNIQTQTEE-652, 315 pont) és további két motívum található közvetlenül a küszöbérték alatt (758-QLNSTETQTMS-768, 301pont; 733-DSSDTETQTEG-743, 298 pont). Ezek közül az 578-NMTDNQTQTID-568 motívumot

leszámítva mindegyik kötődését sikerült pepscan analízissel igazolni (29. ábra B része). Ezen felül a 381-STGVQVN-387, 456-SVHTQTF-462, 471-SIAAQTD-477, 701-DTQTQTD-707 és 782-SNETQTA-788 motívumok is pozitív jelet adtak Pepscan analízis során. Ezen motívumok közül a 666-SLDIETQTDFFLL-677 motívumot szintetikus módon előállítottuk és ITC módszer segítségével igazoltuk az LC8-cal való kölcsönhatását (15. ábra B része, $K_d = 1,7 \mu\text{M}$, $\Delta H = -64,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 31,7 \text{ kJ mol}^{-1}$).



] azo túlt pro tart

módszerrel az ATMIN (475-823) és az LC8 közötti kölcsönhatást (30. ábra) ($K_d = 1,6 \mu\text{M}$, $\Delta H = -44,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta S = 11,2 \text{ kJ mol}^{-1}$). Érdekes módon a sztöchiometria 1:5 lett, azaz 1 ATMIN molekulához nagyjából 5 LC8 molekula kötődött. Valószínű, hogy a 475-től 823-ig terjedő szakaszon pepscan analízissel meghatározott 8 motívum közül nem mindegyik kötődik az LC8-hoz, ha azok természetes szekvenciakörnyezetükben találhatóak.



30. ábra: Az ATMIN (475-823) fragmentum és a DYNLL1 komplexképződését ITC módszerrel követtem. A titrálás során 1:5 sztöchiometriát tapasztaltam, azaz 1 ATMIN (475-823) fragmentumhoz 5 DYNLL1 kötődött.

5. Diszkusszió

5.1 Humán LC8 paralógok partner-specificitása

Az LC8 fehérjének emlősökben két paralógját azonosították, a DYNLL1-t és a DYNLL2-t. Munkám kezdetén meghatároztuk a két izoforma különböző motívumcsaládokhoz tartozó Bmf és nNOS peptidekkel kialakuló kölcsönhatásának termodinamikai és kinetikai paramétereit. Annak ellenére, hogy az irodalomban az nNOS-t a DYNLL1, míg a Bmf-et a DYNLL2 funkcionális partnereként tartják számon (Jaffrey et al. 1996; Puthalakath et al. 2001), *in vitro* nem tapasztaltunk lényeges különbséget az LC8 paralógok és az említett peptidek kölcsönhatásában. Ha elfogadjuk a Day és munkatársai által tapasztalt *in vivo* partner-specificitást, akkor elképzelhető, hogy azt valami eddig fel nem tárt tényező szabályozza (Day et al. 2004). A paralógok között található hat aminosavnyi eltérés, köztük a Day és munkatársai által a partner-specificitásban kulcsfontosságúnak vélt 41-es hisztidin és tirozin a kötőárkokon kívül, az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ hélixekre térképeződik (**12. B ábra**). Ezek szerint a paralógok között található különbségek a kötőárkok „működését” önmagukban nem befolyásolják lényegesen. Lehetséges, hogy az LC8-nak léteznek olyan, specificitást befolyásoló partnerei, melyek az eddigiektől eltérő módon nem az LC8 kötőárkába kötnek be. Elképzelhető, hogy ezek olyan állványfehérjék, melyek a partnerek és az LC8 paralógok lokális koncentrációját befolyásolják, vagy olyan „szabályozó” partnerek, amelyek allosztérikus módon befolyásolják, a kötőárkokba kötő többi partner LC8-interakcióját. Ilyen partnereket azonban a mai napig nem azonosítottak. A partner-specificitásra egy másik lehetséges magyarázat lenne, ha a paralógok sejtbéli lokalizációja eltérést mutatna. Megvizsgálva a paralógok sejten belüli eloszlását azonban megállapíthatjuk, hogy mindkettő mindenhol univerzálisan előfordul. Jurado és munkatársainak eredményei újabb lehetőséget vázolnak fel. Kimutatták, hogy a paralógok transzkripciója eltérően szabályozott (Jurado et al. 2012). Ezt a megfigyelést támasztja alá Schwanhauser és munkatársai eredménye is. A kutatók nagy-áteresztőképességű módszerrel meghatározták az egér fibroblaszt sejtek fehérjéinek mennyiségét (Schwanhauser et al. 2011), és sejtenként egy nagyságrenddel több DYNLL1 fehérjét (~ 220402 db) találtak, mint amennyi DYNLL2-t (~ 36378 db). A két paralóg gerincesekben jelenik meg először, valószínűleg egy génduplikáció következtében. A jelek szerint az evolúciós elválás óta a konzervált LC8 paralógok kölcsönhatási mechanizmusa nem változott lényegesen, míg transzkripciós szabályozásuk eltérő lett. Elképzelhető, hogy pusztán a DYNLL1 nagyobb mennyisége miatt azonosítottak ennél a

paralógnál a másikhöz képest jóval több kötőpartnert (**2. táblázat**). Annak érdekében, hogy feltárjuk a DYNLL1 és a DYNLL2 paralógok közötti esetleg mégis fennálló fiziológias különbségeket, további komplex sejtbiológiai kutatások szükségesek. Érdekes lenne tovább vizsgálni a két paralóg expressziós szabályozását. Felmerül, hogy a partnerek mennyiségének növekedése szabályozza-e a paralógok mennyiségét.

5.2 Az LC8 dinein könnyűlánc kölcsönhatása különböző motívumokkal

Az LC8 a sejtekben a sejtmagtól a citoplazmán át a poszt-szinaptikus denzitásig mindenhol megtalálható. Schwanhauser és munkatársainak eredménye alapján egér fibroblaszt sejtekben az LC8 össz mennyisége a töredéke a már azonosított partnerek össz mennyiségének (Schwanhauser et al. 2011). Vajon mi dönti el, hogy az LC8 az igen változatos szekvenciamintázattal rendelkező partnerek közül éppen melyikhez kötődik? Ahhoz, hogy közelebb kerüljünk a kérdés megválaszolásához, megvizsgáltuk, hogy a különböző motívumtípusok között megfigyelhető-e valamilyen kötődésbeli mechanisztikus különbség. Biofizikai módszerekkel meghatároztuk a különböző családokhoz tartozó Bmf, nNOS, miozin-5a és Pak1, T53bp1 és ATMIN monomer és dimer kötőpeptidek LC8-kötésének termodinamikai és kinetikai paramétereit.

Az LC8 konszenzus kötőmotívumától leginkább eltérő, nem-kanonikus családba tartozó Pak1 fehérje peptidjét ($V_{-3}A_{-2}T_{-1}S_0P_1I_2$, $K_d = 40 \mu M$) kivéve mindegyik motívum mikoromólos körüli disszociációs állandóval rendelkezik. Ez jól egyezik egyéb, hasonló hosszúságú ELM-ek kötőerősségével (Seet et al. 2006). Lightcap és munkatársai hierarchikus összefüggést feltételeztek a motívumok szekvenciái és az affinitásuk között (Lightcap et al. 2008). Ez alapján minél inkább eltér egy peptid szekvenciája az általuk meghatározott KXTQT konszenzus mintázattól (**10. ábra**), annál kisebb affinitás érték mérhető. Ezt a feltételezést a különböző peptidekkel általunk mért affinitás értékekkel nagyjából sikerült alátámasztani ($K_{dKATQTD} > K_{dIETQTD} > K_{dVGVQVE} > K_{dAATQTI} > K_{dTGIQVD} > K_{dKNTMTD} > K_{dVATSPI}$). Kérdéses azonban, hogy a kötési állandók általunk meghatározott, kis különbségei magyarázhatják-e, miként válogat az LC8 *in vivo* az egyes motívumok között. A sejtekben ugyanis a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat lényegesen befolyásolja a magas összfehérje koncentrációból eredő „crowding effect” (Ovadi et al. 2004), és a fehérjék eltérő lokális koncentrációja. Inkább elképzelhető, hogy a motívumok affinitásainak kis különbségei nem a partnerek közötti „válogatásban”, hanem inkább az LC8 és partnerei közötti kölcsönhatások egyfajta finomhangolásában játszanak szerepet.

Megjegyzendő azonban, hogy eltérő mechanizmusok is eredményezhetnek hasonló kötéseerőséget. A $K_3X_2T_1Q_0T_1$ családhoz tartozó Bmf, Tp53bp1, EML3 és ATMIN motívumok és az $L_1Q_0V_1D_2$ családhoz tartozó GKAP és nNOS motívumok hasonló affinitást mutatnak, de ezt eltérő mechanizmussal érik el. Érdekes, hogy a miozin-5a és a Pak1 nem-kanonikus motívumai inkább az $L_1Q_0V_1D_2$ családhoz hasonló termodinamikai paraméterekkel kötődtek, azaz entalpiikusan és entrópiikusan is kedvező folyamat volt a kölcsönhatás. Ha megvizsgáljuk az LC8-Bmf és LC8-nNOS komplexeket (PDB: 1F96 és 1CMI), megállapíthatjuk, hogy a Bmf esetében a kölcsönhatásban kulcsfontosságú központi TQT motívum két szerkezeti víz által közvetített, két extra hidrogén-híd kialakítására képes, míg az IQV motívum tartalmú nNOS esetében a komplexben csak egy szerkezeti víz található és egy hidrogén-híd. A két motívumcsalád közötti termodinamikai különbség esetleg azzal magyarázható, hogy a Bmf, Tp53bp1 és ATMIN peptidek kötődése során több kölcsönhatás jön létre, amit a szerkezeti vizek okozta kedvezőtlen entrópiikus tényező ellenpontosz.

A $K_3X_2T_1Q_0T_1$ és az $L_1Q_0V_1D_2$ motívumcsaládok kötődése során azonosított eltérő termodinamikai különbség fiziológiás szerepe kérdéses. Barbar és munkatársai legújabb munkájukban a Swallow (ATSAKATQTD), a Bim (MSCDKSTQTP), a dinein intermedier könnyűlánc (IVYTKQTQTP), a Kibra (Kib1: QYLDVSSQTD, Kib2: LKVDKETNTE) és az nNOS (EMKDTGIQVD) motívumainak komplexképződését vizsgálták (Nyarko et al. 2011). Eredményük összeegyeztethető a mi eredményeinkkel, azaz a KXTQT típusú Swallow, Bim és Kib1 motívumok kötődése entalpiikusan kedvező, de entrópiikusan kedvezőtlen folyamat volt, míg az IQVD és a nem-kanonikus típusú Kib2 és nNOS kötődése entrópiikusan is kedvező folyamat volt. Egyedül a dinein intermedier könnyűlánc motívuma során tapasztaltak eltérést, ahol annak ellenére, hogy a peptid KXTQT típusú volt, a komplexképződés entalpiikusan és entrópiikusan egyaránt kedvező volt.

Érdekes módon a monomer Bmf peptid esetében a dimer peptidekhez hasonló lassú disszociációt figyeltünk meg. A Bmf fehérje dimer állapotáról nem ismert kísérletes adat. *Coiled coil* és egyéb dimerizáló doméneket nem tartalmaz. Ezek szerint a Bmf fehérje monomer formában is képes lehet a többi dimer partnerhez hasonló, permanens kölcsönhatás kialakítására? Megjegyzendő, hogy a Bmf fehérje a karboxil-terminálisánál tartalmaz egy erősen hidrofób szekvenciárészletet, ami segítheti a sejtmembránba való kihorgonyozódását. Ez önmagában is okozhatná egy, a dimer peptideknél tapasztalt aviditás hatáshoz hasonló jelenség létrejöttét (O'Connor et al. 1998).

Megjegyzendő, hogy ismertek olyan motívumok is, melyek a két osztály szekvenciális tulajdonságát egyesítik, azaz folytonosságot biztosítanak a két osztály között. Erre példa a

Nup159 fehérje S₈A₇S₆A₅D₄F₃D₂V₁Q₀T₁S₂ és D₈N₇Y₆A₅E₄S₃G₂L₁Q₀T₁D₂, valamint a Tp53bp1 fehérje P₈S₇Q₆N₅N₄L₃G₂L₁Q₀T₁M₂ motívumai. A fág-bemutató során használt mindkét könyvtár esetében (X₅X₄X₃X₂X₁Q₀X₁X₂ és X₇X₆V₅S₄R₃G₂X₁X₀X₁D₂X₃) evolválta „kevert” szekvenciákat (2. és 6. függelék táblázat). A továbbiakban érdekes lenne megvizsgálni ezeknek a „kevert” szekvenciával rendelkező peptideknek a kötődési tulajdonságait is.

5.3 Aviditás, avagy a dimerizáció hatása a kötőerősségre. Az LC8 egy általános dimerizáló, szerkezetstabilizáló csomóponti szabályozó fehérje

A partnerek monomer kötőpeptidjeinek vizsgálata során meghatározott különbségekből nem következtethetünk közvetlen módon a sejtekben történő eseményekre, vagyis arra, hogy az LC8 a számos partnere közül melyiket preferálja. A fehérjék pontos globális és lokális sejtbeli koncentrációja ugyanis egyelőre nem ismert, a makromolekulák szabad diffúzióját pedig korlátozza a „*molecular crowding*” hatás (Ovadi et al. 2004). Ráadásul a partnerek nagy része dimer formában található.

Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk az LC8 és partnereinek sejtbeli kapcsolatairól, összehasonlítottuk a miozin-5a és a Bmf monomer és dimerizált kötőpeptidek affinitását. A dimer peptidek a monomer peptidekhez képest több mint két nagyságrenddel erősebben kötődtek ($K_d \sim 10$ nM). A kötőerősség növekedése egyértelműen az antitesteknél is megfigyelt aviditás hatásnak volt betudható, hiszen a dimerizálással a komplexképződés sebességi állandója nem változott, míg a disszociáció sebességi állandója három nagyságrenddel lecsökkent (O'Connor et al. 1998; Pabbisetty et al. 2007).

A partnerek dimerizálásából származó kötőerősség-növekedés tehát fiziológiai szempontból meghatározóbb lehet, mint önmagukban a monomer peptidek affinitásai között tapasztalt különbségek.

A termodinamikai vizsgálatok mellett meghatároztuk a különböző monomer és dimerizált peptidek kötésének kinetikai tulajdonságait is. A peptideknek mind a monomer, mind a dimerizált változatai jóval alacsonyabb asszociációs sebességi állandóval kötődnek, mint az irodalomból ismert, főleg a jelátvitelben szerepet játszó ELM-ek (Seet et al. 2006). A dimerizált peptidek az aviditás hatás miatt extrém lassan disszociálnak. Tehát a jelátviteli folyamatoknál szereplő ELM-eknél tapasztalt dinamikus komplexképzéssel ellentétben az LC8 lassan köti meg és igen lassan engedi el a partnereit. A hosszú életidejű, „permanens”

komplexek alapján az LC8 funkcionálisan inkább a partnerek állandó dimerizáló egységeként, egyfajta „molekuláris ragasztóként” fogható fel.

Az LC8, mint csomóponti fehérje működése poszt-transzlációs módon is szabályozható. Az egyik leginkább kutatott LC8 szabályozási mód a Ser88 foszforilációján keresztül valósulhat meg (Song et al. 2007; Song et al. 2008). A foszforiláció hatására az LC8 monomer-dimer egyensúlya a monomer irányába tolódik el ($K_d > 1 \text{ mM}$) (Benison et al. 2009). A monomer LC8 ebben a formájában a kötőárok hiánya miatt képtelen megkötni partnereit. Ezek alapján érthető, miért nem tudtak kimutatni *in vitro* kölcsönhatást az LC8 Ser88Glu és a Pak1, valamint a Bim motívumok között (Song et al. 2007; Song et al. 2008). Viszonylag erős kölcsönhatást azonosítottak azonban a dinein intermedier könnyűlánc és a Swallow motívumok esetében (Song et al. 2007). Megjegyzendő, hogy a kísérletekben használt Swallow fragmentum *coiled coil* szakaszon keresztül dimerizált volt. Továbbá sikeresen meghatározták az LC8 Ser88Glu-Swallow peptid kristályszerkezetét, amelyben a mutáns LC8 dimer formában volt, és szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutatott a vad típusú dimer LC8 szerkezetéhez (Benison et al. 2009).

Fluoreszcencia polarizáció és felszíni plazmon rezonancia spektroszkópiás módszerek segítségével kvantitatívan meghatároztuk a foszfomimikált Ser88Glu mutáns LC8 és a monomer Bmf és dimer miozin-5a közötti kölcsönhatást. Azt tapasztaltuk, hogy a monomer Bmf a Ser88Glu mutáns LC8-hoz több mint 100-szor gyengébben kötődött a vad típusú képest ($K_d = 110 \text{ }\mu\text{M}$). Ez a kötéserősség fiziológias körülmények között valószínűleg már nem eredményez komplexet. Ezzel szemben a dimer miozin-5a fragmentum Ser88Glu LC8-cal szembeni affinitása mikromólos tartományban van ($K_d = 2,7 \text{ }\mu\text{M}$). Bár a vad típusú LC8-hoz való kötéshez képest ez mintegy ~50-szeres affinitás-csökkenést jelent, a mikromólos disszociációs állandó a partner fehérjék koncentrációjának tartományában van. Elképzelhető, hogy a foszforilált LC8 is köthet dimer miozin-5a-t, illetve egyéb eleve dimer partner fehérjéket. A kötés során a dimer kötőpartnerek az LC8 Ser88Glu monomer-dimer egyensúlyát „visszatolják” a dimer irányába.

Korábban a Pak1-et tartották a Ser88 foszforilációjáért felelős kináznak. Ezt mások, és magunk újabb eredményei cáfolják (Lightcap et al. 2008; Radnai et al. 2010). Jelenleg tehát nem ismert, hogy a 88-as szerint valóban foszforilálja-e valamelyik protein-kináz. Eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy a 88-as Ser foszforilációja szelektíven szabályozhatja az LC8 monomer és dimer partnerei közötti válogatását. Yang és munkatársai munkája alátámasztani látszik eredményünket (Yang et al. 2009). A *Chlamydomonas* flagella

LC8 Ser90Glu mutánsa, ami analóg a humán citoplazmatikus Ser88Glu mutánssal *in vitro* főleg monomer állapotú volt, de *in vivo* kísérletükben nagy része dimerizált. Továbbá a Ser90Glu mutáció *in vivo* nem volt szignifikáns hatással a flagellum képződésére és a sejt motilitására.

5.4 LC8 motívumának átfogó elemzése irányított evolúciós megközelítéssel, fág-bemutatóval

A több tucat LC8 partnerben azonosított kötőmotívum tanulmányozásával elvileg következtetni lehet az egyes pozíciók és a pozíciókban előforduló aminosavcsoportok kölcsönhatásban betöltött energetikai fontosságára. Ahhoz, hogy ez a feltételezés igaz legyen, legalább két feltételnek teljesülnie kell. Az egyik az, hogy a természetben előforduló szekvenciák elsősorban a kötőerősség által szelektálódtak. Mivel a természetes evolúció során egyszerre számos szelekciós tényező hathat ugyanarra a fehérjeszakaszra, ez a feltételezés nem magától értetődő. A másik feltétel az, hogy az ismert kötőpartnerek az összes kötőpartner reprezentatív mintáját jelentsék. Ez a feltétel sem magától értetődő. A partnerek élesztő kéthibrid módszerrel, tandem affinitástisztítással és immunprecipitációval való azonosítása során előfordulhat, hogy ismeretlen tényezők miatt bizonyos partnerek azonosítása nem sikerül, illetve bizonyos motívumok túlréprezentáltak lesznek.

A problémakör leegyszerűsödik, amennyiben képesek vagyunk az összes variánst előállítani, és mindegyik kötőerősségét megmérni. Klasszikus biokémiai módszerekkel (egyedi mutációk létrehozásával) a teljes szekvenciatér „bejárása” és a kötőerősségek mérése praktikusán lehetetlen. Az irányított fehérjeevolúció azonban lehetővé teszi, hogy az összes variánst előállítsuk, és elsősorban kötőerősség alapján szelektáljuk. A szelektált klónok szekvenciáinak statisztikai analízise kirajzolja a termodinamikai alapon diktált mintázatot.

Dolgozatomban a fenti elven, fág-bemutatót alkalmazva két lépésben meghatároztam az LC8/DYNLL1 kötőmintázatát. A peptid könyvtárat M13 fonális fág p3 burokképző fehérjéjén fúziós módon mutattam be. Korábbi eredményeim alapján a peptidket *coiled coil* motívummal dimerizáltam, kihasználva a dimerizálásból adódó aviditás hatást. Az ily módon történő bivalens bemutatás során, hasonlóan a polivalens bemutatáshoz, a gyengébben kötődő motívumokat is szelektálni lehet, ezáltal átfogóbb képet kaphatunk a mintázatról. Az általam is használt bivalens bemutatást más dimer-dimer komplexképződésének tanulmányozásához is fel lehet használni. Például Lee és munkatársai korábban sikeresen használták a bivalens bemutatást antitestek fejlesztésében (Fuh et al. 1990; Lee et al. 2004).

Az első könyvtár esetében a legkonzerváltabb pozícióban a leggyakrabban előforduló aminosavat, a glutamint rögzítettem, majd az eredmények tudatában terveztem meg a második könyvtárat. Mindkét létrehozott könyvtár esetében (XXXXXQXX és XXVSRGXXXEX) a könyvtár mérete majdnem teljesen lefedte a randomizálás által meghatározott szekvenciateret, azaz egyszerre vizsgáltuk az összes lehetséges variánst.

Az irányított evolúcióval szelektált motívumok által készített mintázat nagyvonalakban hasonlít a már azonosított partnerek segítségével készített mintázathoz, azaz az *in vitro* evolúció hasonló megoldást talált a komplexképződésre, mint a természet. Más szemszögből vizsgálva, a természetben a mintázat nagy része (a -4., a -3., a -2., a -1., a 0., az 1. és a 2. pozíciók) az LC8 kötésaffinitása alapján evolválódott.

Az első könyvtár esetében rögzítettük a legkonzerváltabb pozíciót (0.), ezért nem meglepő, hogy nem szelektáltunk a természetben tapasztaltaktól teljesen eltérő megoldásokat. A második könyvtár esetében (X₋₇X₋₆V₋₅S₋₄R₋₃G₋₂X₋₁X₀X₁D₂X₃) azonban mind a 0., mind a határoló pozíciókat (-1 és 1) teljesen randomizáltuk. Ebben az esetben sikerült is olyan nem-kanonikus szekvenciájú motívumokat szelektálni, melyek a 0-ik pozícióban nem glutamint tartalmaztak. Ugyanakkor ezek igen ritkák voltak, csak hat alkalommal azonosítottuk a miozin-5a-ban is megtalálható T₁M₀T₁ és egy esetben a Kibra fehérjében is megtalálható T₁N₀T₁ motívumot. Minden eddig ismerttől lényegesen eltérő szekvencia nem szelektálódott.

A nagyfokú hasonlóság ellenére különbségeket is találunk. Szembetűnő a hidrofób aminosavak magas előfordulási aránya a természetben tapasztaltakéhoz képest. A rendezetlen régiókban található motívumok hidrofobicitása átlagosan nagyobb a (átlagosnál polárosabb, rendezetlen) környezetüknél. A felszínen megjelenő hidrofób oldalláncok azonban – aggregációs hajlamuk miatt – a természetben kedvezőtlenek. Ráadásul egy hidrofób karakterű motívum viszonylag alacsony specificitású is egyben (Mesaros et al. 2007). Figyelemreméltó, hogy a -2-es pozícióban a fág-bemutató során triptofán jelent meg. A második generációs könyvtár szelekciójával meghatározott konszenzus motívumot (MMVSVWTQTEF) szintetikus úton előállítottuk, de gyenge oldhatósága miatt nem volt módunkban tanulmányozni a 2-es pozícióban található triptofán szerepét.

Ezzel kapcsolatban fontos megemlíteni, hogy a fág-részecske oldhatósága miatt a részecskén megjelenítve olyan peptidek is „oldatban maradnak”, amelyek önmagukban aggregációs hajlamúak.

A természetes mintázattól leginkább a -5-ös pozícióban azonosítottunk eltérést. A természetben tapasztaltakhoz képest megnövekedett a konzerváltság foka, a leggyakoribb aminosav a valin volt. A -5-ös pozícióban található valin képes volt az affinitást nagyjából két

nagyságrenddel megnövelni. Eredményünk összeegyeztethető Lajoix pepscan eredményével, amelyben a -5-ös pozícióban a valin vagy az izoleucin minden esetben megnövelte az affinitást (Lajoix et al. 2004). A dimerizált, Val₅ tartalmú peptid affinitása a nanomólos alatti disszociációs állandójú tartományban található. Az irányított evolúciós megközelítéssel sikerült tehát az eddigi legerősebb kötőmotívumot előállítani.

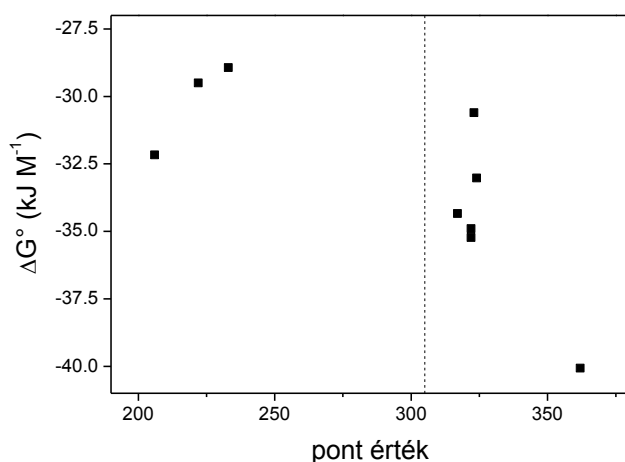
A monomer és a dimer VSRGTQTE peptid egyaránt alkalmazható az LC8 kompetitív inhibitoraként, ami lehetőséget teremt az LC8 funkciójának *in vivo* tanulmányozására. Varma és munkatársai az LC8-nak a dinein motor komplex működésében betöltött szerepét tanulmányozták egy elegáns kísérletben, melyben a dinein intermedier lánc LC8 kötőmotívumának (REIVTYTKETQTP) dimer változatát sikeresen használták *in vivo* az LC8 kompetitív inhibitoraként (Varma et al. 2010).

5.5 A humán LC8 interaktom felderítése a kötőmotívum mintázata alapján

A fág-bemutató által meghatározott mintázat, azaz a pozíciónkénti aminosav gyakoriságok alapján egy egyszerű pontozó mátrixot használtunk a humán LC8 interaktom feltárására. A jóslás során előzetes információkat is figyelembe vettünk. A motívumnak citoplazmatikus fehérjeszakaszban, annak is rendezetlen szerkezetű (IDR) részében kellett lennie.

Uniprot kód	név	pozíció	szekvencia	pont	K _d (μM)	ΔG°
Q32P44	EMAL3_HUMAN	78	SLVSRGTQTE	362	0,1	-40067
O43313	ATMIN_HUMAN	665	ESLDIETQDF	324	1,7	-33024
Q12888	TP53B_HUMAN	1164	ETVSAATQTIK	323	4,5	-30604
O43521	B2L11_HUMAN	107	MSCDKSTQTPS	322	0,8	-34898
Q96LC9	BMF_HUMAN	63	SQEDKATQTLS	322	0,7	-35230
Q9Y4I1	MYO5A_HUMAN	1281	PKDDKNTMTDS	233	8,8	-28937
P29475	NOS1_HUMAN	231	EMKDMGIQVDR	222	7	-29506
O14490	DLGP1_HUMAN	647	RCLSIGIQVDD	206	2,4	-32167

8. táblázat: A "pontozható", ismert partnerek ismert affinitás értékei. A szaggatott vonal a 305 pontos küszöbértéket jelöli.



31. ábra: : A "pontosítható", ismert partnerek komplexképződése során tapasztalt szabadenergiaváltozást mutatja a jóslás során kapott pontjaik függvényében. A szaggatott vonal a 305 pontos küszöbértéket jelöli.

A fág-bemutatáson kívüli saját eredmények mellett más módszerekkel azonosított motívumokat nem használtunk fel a jóslás során, ezért a más, független kísérletekben azonosított kötőszekvenciák alkalmasak voltak a jóslásunk jóságának megállapítására. Ha ábrázoljuk a már azonosított motívumok LC8-kötésekor bekövetkező mért standard szabadenergiaváltozásokat (ΔG°) a jóslás során kapott pontszámaik függvényében, akkor pozitív összefüggést mutató grafikont kapunk (**8. táblázat, 31. ábra**), azaz a fág-bemutatás során az egyes pozícióknál azonosított aminosav frekvenciából valóban következtetni lehet a kötéserősségre. Ha megvizsgáljuk az egyes motívumtípusok ponteloszlását, észrevehető, hogy a $K_3X_2T_1Q_0T_1$ család tagjai nagyobb pontértéket kaptak, mint az $L_1Q_0V_1D_2$ családokhoz tartozók, azaz a $K_3X_2T_1Q_0T_1$ motívumok kötődése közelebb van a termodinamikai optimumhoz. Ez összeegyeztethető a 4.2-ik „Az LC8 dinein könnyűlánc különböző motívumcsaládokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása” című fejezetben kapott eredményekkel, ami szerint minél jobban eltér egy peptid szekvenciája a KXTQT konszenzus mintázattól, annál kisebb affinitásérték mérhető.

A motívumok pontosítása után egy „boot strap” típusú statisztikai módszerrel küszöbértéket határoztunk meg. A küszöbérték felett a motívumokat feltételezett LC8 partnernek definiáltuk. Összehasonlítva az első és a második könyvtár eredményei alapján jóslott partnereket, megállapíthatjuk, hogy egyrészt mindkét esetben több száz prediktált kötőszekvencia található a küszöbérték felett, másrészt ezek nagy részét még nem azonosították LC8 partnerként. A második jóslás során a küszöbérték felett található, már azonosított partnerek száma közel megkétszereződött, ami a jóslás megbízhatóságának növekedését valószínűsíti. Az első könyvtár által meghatározott mintázat esetében, mivel a 0. pozícióban a glutamint rögzítettem, csak „kanonikus”, TQT vagy IQV motívumokat jósolhattam. A második könyvtár esetében a -1., 0. és az 1. pozíciót is randomizáltam,

lehetőséget adva mindhárom, köztük legfontosabbként a 0. pozíció jellemzésére, így újfajta moziúumok azonosítására. Figyelemreméltó módon a másodík könyvtár használatakor sem volt újfajta, a 0. pozícióban nem glutamint tartalmazó motívum a küszöbérték felett. Ez arra utal, hogy még a kötőszekvencia egyik oldalán kialakított, affinitásnövelő dimerizációs elem jelenlétében sem versenyezhet eredményesen semmilyen aminosav a glutaminnal.

A jószolt partnerek igen különböző sejtbiológiai funkciókban vesznek részt, melyek gyakran függetlenek a dinein és miozin motorfehérjéktől. Schwanhausser és munkatársai adatai alapján a fibroblaszt sejtekben található LC8 sejtenkénti száma (~ 200000) lényegesen meghaladja a dinein motor komplex és a miozin-5a egységek számát (~8-90000). (Megjegyzendő, hogy a miozin-5a nagy mennyiségben idegsejtekben expresszálódik.) Már önmagában ez is arra utal, hogy az LC8 nagy része valóban dineintől és miozin-5a-tól függetlenül működik (Schwanhausser et al. 2011).

5.6 EML3 és az ATMIN fehérjék, mint kísérletesen is igazolt új humán LC8 partnerek

Az első jóslás során megtaláltuk az emberi proteomban a fágselekcio konszenzus szekvenciáját, amely természetesen a legnagyobb pontértéket kapta. Az így jószolt legerősebb kötőszekvencia a sejtosztódás során a mitotikus orsók kialakításában szerepet játszó EML3 fehérjében (Tegha-Dunghu et al. 2008) található. A kölcsönhatást igazoltuk szintetikusán előállított motívummal és rekombináns módon létrehozott, *E. coli*-ban termeltetett EML3 fragmentummal is. A predikciós analízissel párhuzamosan élesztő kéthibrid módszerrel is dolgoztunk. Ennek során LC8 kötőpartnerként azonosítottuk a DNS hibajavításban szerepet játszó ATMIN fehérjét (Heierhorst 2008). Az ATMIN-t a predikciós eljárásunk is azonosította, és azt a nagy megbízhatóságú LC8-partner csoportba sorolta. További független kísérletekben is igazoltuk az ATMIN-LC8 kölcsönhatást. Heierhorst és munkatársai a mi munkánkkal párhuzamosan szintén azonosították az ATMIN-t, mint LC8 partnert (Jurado et al. 2012).

A munka folytatásaként elkezdődött a jószolt partnerek LC8-kölcsönhatásának igazolása immunprecipitációs módszerrel, továbbá a már igazolt új partnerek esetében a kölcsönhatás biológiai funkciójának felderítése sejtbiológiai módszerekkel. Eredményeink remélhetőleg segítséget nyújtanak majd ahhoz, hogy az LC8 fehérjét kutató csoportok új kötőpartnereket azonosíthassanak, továbbá hozzájárulnak az LC8 különböző sejtfolymatokban betöltött szerepének mind alaposabb felderítéséhez is.

5.7 Tctex-1 dinein könnyűlánc

A munka további folytatásaként Nyitray László laboratóriumában elkezdődött egy másik dinein könnyűlánc, a Tctex-1 fehérje (DYNLT) partnerkötésének jellemzése is. Érdekes, hogy a Tctex-1 elsődleges szerkezetében nem, de térszerkezetében hasonlít az LC8-hoz (**6. ábra**). A dineinen kívül más citoplazmatikus fehérjéket is leírtak Tctex-1 partnerként. Az eddig azonosítottak száma még nem közelíti meg az LC8-partnerek számát, de növekvő tendenciát mutat. Kötőmotívumáról jelenleg keveset tudunk. A Tctex-1 kötőárka az LC8-énál jóval hosszabb. Az egyetlen ismert komplex (Tctex-1-dinein intermedier lánc) kristályszerkezetében (PDB: 2PG1, **11. ábra**) az árkokba 16 aminosav hosszúságú peptid illeszkedik. A jóval nagyobb lánchosszon eloszló kötési energia előrevetíti annak lehetőségét, hogy a Tctex-1 kötőszekvenciák összehasonlítása kevésbé definiált mintázatot eredményezhet, mint az LC8-kötőpartnereké. Jelenleg az ismert partnerek motívumának élesztő kéthibrid módszerrel történő felderítése, kölcsönhatásuk jellemzése, a komplexek szerkezetvizsgálata zajlik.

6. Összefoglaló

Az LC8 dinein könnyűlánc egy 10 kDa tömegű konzervált eukarióta fehérje. A homodimer LC8 elsősorban szintén homodimer partnerekhez kötődik, stabilizálva azok dimer szerkezetét, így szabályozva működésüket. Az LC8 egy nyolc aminosav hosszúságú, igen változatos szekvenciájú lineáris motívumot ismer fel. A motívumok az LC8 dimerizációs felszínen kialakuló szimmetrikus árkokba kötődnek. Az LC8 ismert partnereinek száma mára meghaladja az ötvenet. A kötőpartnerek igen különböző sejtlejtani folyamatokban vesznek részt.

Első lépésben különböző ismert motívumok, motívumcsaládok LC8-kötésének termodinamikai és kinetikai jellemzőit vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az LC8 két humán paralógja (DYNLL1 és DYNLL2) a motívumok és motívumcsaládok között nem diszkriminál, a két paralóg *in vitro* működésében tehát nincs jelentős különbség. Kimutattuk, hogy a motívumok disszociációs állandói a 750 nM-50 μ M közötti tartományba esnek. Feltártuk, hogy az egyes motívum-családok eltérő termodinamikai- és kinetikai paraméterekkel kötődnek. Bizonyítottuk, hogy a dimer formában kötődő motívumok az aviditás jelensége miatt a monomer peptid kötődéséhez képest akár három nagyságrenddel nagyobb látszólagos affinitás értékkel is rendelkezhetnek.

Fág-bemutató segítségével meghatároztam a humán LC8 (DYNLL1) termodinamikailag optimális kötőmotívumát, illetve a motívum egyes pozícióinak aminosav preferenciáját. A peptideket a fágokon GCN4 leucin-cipzárt felhasználva bivalens módon mutattam be, felhasználva a természetben is megfigyelhető aviditás hatást. A pozícióknak a fág-bemutató során meghatározott aminosav gyakoriság adatait felhasználva a humán proteomból közel száz lehetséges LC8 partnert jósoltunk. Jóslásunk alapján az EML3 és az ATMIN fehérjéről igazoltuk, hogy valós partnere a LC8/DYNLL1-nek.

A fág-bemutató eredményeit felhasználva az eddig legerősebben kötődő motívumnál (Bmf) 10-szer erősebb affinitású peptidet terveztem ($K_d = 84$ nM). A motívum dimerizálásával egy nM alatti, látszólagos disszociációs állandójú, az LC8 kompetitív inhibitoraként használható peptidet kaptam. A megnövekedett affinitás szerkezeti okát sikerült megmagyarázni a monomer és a dimer peptid LC8/DYNLL2-vel alkotott komplexének kristályszerkezetét tanulmányozva.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az LC8 egy olyan csomóponti fehérje, amely egyfajta általános, dimerizációt elősegítő szerkezeti elemként működik változatos funkciójú partnerek dimerképzését indukálva.

Úgy gondolom, eredményeink hathatós segítséget nyújthatnak új LC8 partnerek kísérletes azonosításában, továbbá hozzájárulnak majd az LC8 funkciójának és a humán interaktom szervezésében betöltött szerepének mind pontosabb felderítésében.

7. Summary

LC8 dynein light chain is a highly conserved eukaryotic hub protein. Its structure is homodimeric having two symmetric grooves to bind mostly homodimeric interacting proteins. By binding to short linear motifs having loose consensus sequence, LC8 regulates its partners by stabilizing their dimeric structure. There are about 50 hitherto identified LC8 partners and this number is still on the rise. The LC8-binders are involved in different cellular events.

First, we determined and compared the kinetic and thermodynamic binding properties of various known sequences and binding motif families. We observed that the two paralogues (DYNLL1 and DYNLL2) do not discriminate among various motifs and motif families *in vitro*. The dissociation constants ranged from 750 nM to 50 μ M. Although the members of different motif families may possess similar binding constants, they interact through characteristically different mechanisms indicated by different thermodynamic and kinetic parameters. Moreover, we found that the affinity of dimeric motifs – due to avidity effect – can be increased by nearly three orders of magnitude.

I determined the thermodynamically optimal binding pattern of LC8 (DYNLL1) via directed evolution, namely phage display. The naïve peptide library was displayed on M13 phage in a bivalent manner using a GCN4 leucine zipper, which utilizes the same avidity effect that occurs in nature. Based on the positional amino acid frequencies obtained from phage display, we predicted nearly one hundred proteins from the human proteome as potential LC8-partners. Based on this prediction, two novel partners – EML3 and ATMIN – were chosen and validated by various *in vitro* experiments.

A high affinity consensus sequence was designed based on the results obtained by phage display. The corresponding monomeric peptide has an affinity ($K_d = 84$ nM) ten times higher than that of the hitherto known strongest binding motif identified in the Bmf protein. Dimerization through a leucine zipper further increases the affinity into the subnanomolar range. The monomeric as well as the dimeric peptides could be used as competitive inhibitors of LC8. The high affinity of the *in vitro* evolved motif was explained by a structural study using monomeric and dimeric peptide-LC8 complex crystals.

Our results suggest that LC8 could function as a universal dimerization hub protein forming stable complexes with proteins of pleiotropic functions. Moreover, these results significantly extend the scope of the human interactome around LC8 and will certainly shed

more light on the biological functions and organizing role of LC8 in the human and other eukaryotic interactomes, as well.

8. Publikációs lista

A dolgozat az alábbi cikkek eredményeire épül:

Radnai L., **Rapali P.**, Hódi Z., Süveges D., Molnár T., Kiss B., Bécsi B., Erdődi F., Buday L., Kardos J., Kovács M. and Nyitray L. Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem*, (2010) 285, 38649-38657.

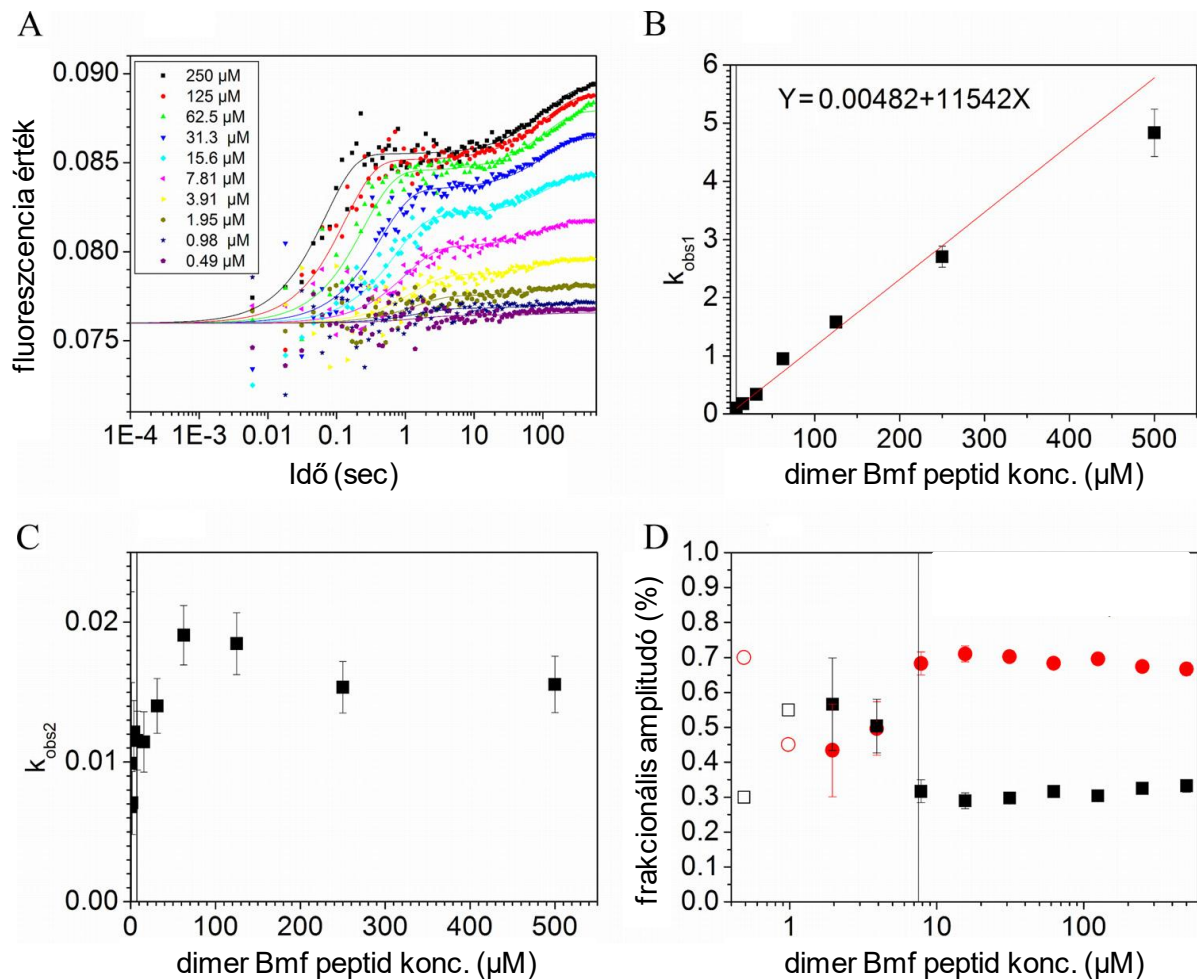
Rapali P., Radnai L., Süveges D., Harmat V., Tölgyesi F., Wahlgren W.Y., Katona G., Nyitray L. and Pál G. Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS ONE*, (2011) 6, e18818.

Rapali P., García-Mayoral MF., Martínez-Moreno M., Tárnok K., Schlett K., Albar JP, Bruix M., Nyitray L., Rodriguez-Crespo I. LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization. *BBRC*, (2011) 414(3):493-8.

A témában megjelent összefoglaló dolgozat:

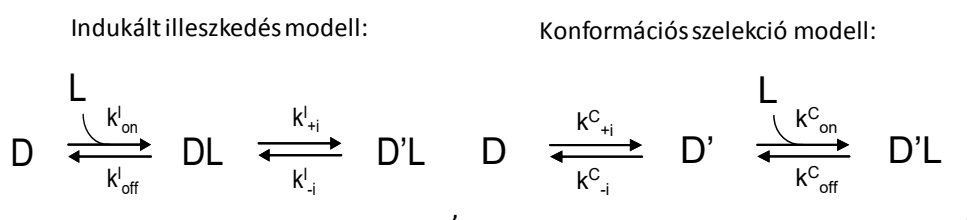
Rapali P., Szenes A., Radnai L., Bakos A., Pál G. and Nyitray L. DYNLL/LC8: A Light Chain Subunit of the Dynein Motor Complex and Beyond. *FEBS J.*, (2011) 278(17), 2980-96

9. Függelék



1. függelék ábra. A megállítós fluoreszcencia spektroszkópia során tapasztalt kétlépéses kötődés. Az LC8 és a különböző motívumok közötti kölcsönhatást az LC8 54-es triptofán fluoreszcencia intenzitásának változásával követtük megállítós fluoreszcencia spektroszkópia segítségével. Az **A** ábra az nNOS motívum (232-EMKDTGIQVDRDL-244) és az LC8/ DYNLL2 kölcsönhatása során történő fluoreszcencia intenzitás változást mutatja, ahol az LC8/DYNLL2 koncentrációját 3 μM állandó értéken tartottuk, míg a peptid koncentrációját változtattuk. Minden motívum esetében kétlépéses reakciót figyeltünk meg. A **B**, **C** és **D** ábrák a dimer Bmf adatait mutatják. A pszeudo első- rendű reakció körülmény kezdete (LC8/DYNLL2 : peptid arány 1 : 5) a **B**, **C** és **D** ábrákon függőleges vonallal vannak jelölve. A **B** ábrán látható, hogy a kétexponenciális illesztésből ($I = A_1 e^{-k_{b1}t} + A_2 e^{-k_{b2}t} + C$) származó első fázis $k_{\text{obs}1}$ (megfigyelt komplexképződés sebességi állandója („observed on rate constant”)) értéke lineáris összefüggést mutat a peptid koncentráció változtatásával pszeudo első- rendű reakció körülmények között. A második fázis $k_{\text{obs}2}$ (megfigyelt komplexképződés sebesség állandója („observed on rate constant”)) értéke azonban nem függött a peptid koncentrációjától (**C** ábra). Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a fluoreszcencia

intenzitás változás első fázisa során egy másodrendű reakció, közvetlenül a peptid LC8/DYNLL2 komplex kialakulása követhető nyomon, míg a második fázis alatt egy egy-lépéses reakció, az LC8/DYNLL2-nek a kölcsönhatás kialakulása során bekövetkező konformáció-változás történik. A két fázis során történő triptofán fluoreszcencia-intenzitás frakcionális amplitudó változása a **D** ábrán látható. Pszeudo első rendű reakció körülmények között az első fázis (●) és a második fázis (■) amplitudói a teljes amplitudó változásnak 70, illetve 30 %-a voltak. A kétexponenciális egyenlet mellett Kintek explorer Pro program segítségével az adatokat globálisan is elemeztük a két lehetséges legegyszerűbb modellt használva; konformációs szelekció - és az indukált illeszkedés modellt:



ahol a *D* az alap állapotú DYNLL2, a *D'* a megnövekedett fluoreszcencia intenzitású DYNLL2, az *L* a peptid ligand, az egyes *k*-k a sebességi állandók. Mindkét modell feltételez egy fluoreszcencia intenzitás változással járó konformációs átalakulást, valamint egy komplex kialakulást. A kétféle modell felhasználásával meghatározott kinetikai állandókat a függelék 2. táblázata tartalmazza. A konformációs átalakulás modell felhasználásával meghatározott komplex kialakulásának kinetikai paraméterei (k_{on}^c , k_{off}^c) nagy egyezést mutatnak az indukált illeszkedés modell felhasználásával meghatározott komplex kialakulásának kinetikai paramétereivel (k_{on}^l , k_{off}^l), azaz maga a kötődési lépést lényegesen nem befolyásolja az LC8/DYNLL2 konformációjának átalakulása. A konformáció átalakulás kinetikai állandói minden motívum esetében nagy egyezést mutatnak, ezért a motívumok összehasonlításakor csak a komplex képződés kinetikai paramétereit használtam fel. Összességében a konformációs szelekciós modell jobban illeszkedett az adatsorokra, ezért a dolgozatomban szereplő kinetikai adatoknál ezeket az értékeket tüntettem fel.

Konformációs szelekciós modell																							
Partner	Izoforma	$k_{on}^C (s^{-1})$	StdErr	$k_{off}^C (s^{-1})$	StdErr	$k_{on}^A (\mu M^{-1} s^{-1})$	StdErr	$k_{off}^A (s^{-1})$	StdErr	f1	StdErr	f2	StdErr	f3	StdErr	$K_B^C (nM^{-1})$	K_i^C	$K_d^C (nM)$	K_d^C	$K_{eq}^C (nM^{-1})$	$K_{d,eq}^C (nM)$	$K_{d,eq}^C (nM) (ITC)$	
Bmf	DYNLL1	Felső korlát	6,06E-03		4,48E-03		1,12E-02		3,66E-03		5,85E-02		5,62E-02		6,50E-02								
		Lejebb ill.	4,26E-03	9,28E-02	2,35E-04	2,15E-04	1,04E-02	2,08E-03	2,92E-03	1,25E-03	1,34E-02	4,52E-02	5,60E-02	5,11E-04	6,47E-02	4,66E-05	3,6E-03	18,1	281	5,5E-02	3,4E-03	297	1050
		Alsó korlát	3,41E-03		1,88E-04		9,33E-03		1,35E-03		5,61E-04		4,91E-02		6,44E-02								
Bmf	DYNLL2	Felső korlát	1,66E-02		8,99E-03		2,39E-02		2,90E-03		8,84E-02		8,70E-02		9,83E-02								
		Lejebb ill.	1,24E-02	6,60E-02	9,35E-04	2,17E-03	2,17E-02	3,96E-03	1,85E-03	4,20E-03	4,15E-02	7,44E-02	8,68E-02	1,19E-03	9,80E-02	1,18E-04	1,2E-02	13,3	85	7,5E-02	1,1E-02	92	735
		Alsó korlát	9,93E-03		5,99E-04		2,06E-02		7,90E-04		2,53E-02		8,02E-02		9,78E-02								
dimer Bmf	DYNLL2	Felső korlát	1,82E-02		1,08E-02		1,38E-02		1,86E-03		1,02E-01		9,95E-02		1,14E-01								
		Lejebb ill.	1,54E-02	1,61E-02	6,44E-03	4,44E-03	1,30E-02	1,12E-03	1,13E-03	1,43E-03	9,73E-02	1,67E-03	9,48E-02	8,10E-04	1,14E-01	7,19E-05	1,2E-02	2,4	87	4,2E-01	8,1E-03	123	3
		Alsó korlát	1,03E-02		6,92E-04		1,17E-02		7,25E-04		3,86E-02		9,13E-02		1,14E-01								
nNOS	DYNLL1	Felső korlát	1,12E-02		2,17E-03		5,85E-02		5,28E-01		4,55E-02		5,32E-02		6,03E-02								
		Lejebb ill.	8,92E-03	6,98E-02	7,09E-04	3,50E-04	4,68E-02	8,01E-03	4,22E-01	2,60E-02	2,02E-02	5,30E-02	4,02E-04	6,01E-02	4,84E-05	1,1E-04	12,6	9025	8,0E-02	1,0E-04	9743	7000	
		Alsó korlát	6,77E-03		3,63E-04		3,52E-02		3,10E-01		8,27E-03		5,22E-02		6,00E-02								
nNOS	DYNLL2	Felső korlát	1,77E-02		7,58E-03		8,24E-02		6,26E-01		9,15E-02		9,44E-02		1,07E-01								
		Lejebb ill.	1,59E-02	2,06E-02	3,86E-03	1,69E-03	5,84E-02	7,44E-03	4,37E-01	3,84E-02	8,34E-02	4,31E-03	9,31E-02	6,52E-04	1,07E-01	5,02E-05	1,3E-04	4,1	7485	2,4E-01	1,1E-04	9297	5410
		Alsó korlát	1,48E-02		1,58E-03		4,62E-02		3,39E-01		6,00E-02		9,11E-02		1,07E-01								
miozin 5a	DYNLL2	Felső korlát	2,06E-02		2,13E-02		7,30E-03		1,17E-01		1,06E-01		1,04E-01		1,16E-01								
		Lejebb ill.	1,93E-02	1,95E-02	8,35E-03	3,71E-03	6,59E-03	2,91E-03	1,03E-01	9,11E-03	9,91E-02	2,92E-03	1,02E-01	1,03E-03	1,16E-01	8,59E-05	6,4E-05	2,3	15607	4,3E-01	4,5E-05	22362	8850
		Alsó korlát	1,71E-02		4,27E-03		5,53E-03		6,16E-02		9,05E-02		9,59E-02		1,16E-01								
dimer miozin 5a	DYNLL2	Felső korlát	1,59E-02		5,84E-03		4,62E-03		9,75E-04		9,41E-02		9,74E-02		1,09E-01								
		Lejebb ill.	1,08E-02	7,81E-02	9,79E-04	1,06E-03	4,02E-03	1,48E-03	7,38E-04	6,21E-04	5,98E-02	2,60E-02	9,72E-02	7,55E-04	1,08E-01	8,39E-05	5,4E-03	11,0	184	9,1E-02	5,0E-03	200	37
		Alsó korlát	8,53E-03		5,01E-04		3,82E-03		2,38E-04		3,85E-02		9,40E-02		1,08E-01								
Pak1	DYNLL2	Felső korlát	3,50E-02		7,20E-03		1,86E-02		7,29E-01		9,73E-02		1,07E-01		1,25E-01								
		Lejebb ill.	2,80E-02	3,85E-02	3,69E-03	3,75E-03	1,64E-02	2,68E-03	6,41E-01	4,78E-02	8,11E-02	1,42E-02	1,06E-01	8,44E-04	1,24E-01	3,84E-04	2,6E-05	7,6	39095	1,3E-01	2,3E-05	44240	42700
		Alsó korlát	2,24E-02		1,21E-03		1,31E-02		5,12E-01		3,58E-02		1,05E-01		1,24E-01								

Indukált illeszkedés modell																							
Partner	Izoforma	$k_{on}^I (\mu M^{-1} s^{-1})$	StdErr	$k_{off}^I (s^{-1})$	StdErr	$k_{+i}^I (s^{-1})$	StdErr	$k_{-i}^I (s^{-1})$	StdErr	f1	StdErr	f2	StdErr	f3	StdErr	$K_B^I (nM^{-1})$	K_i^I	$K_d^I (nM)$	K_d^I	$K_{eq}^I (nM^{-1})$	$K_{d,eq}^I (nM)$	$K_{d,eq}^I (nM) (ITC)$	
Bmf	DYNLL1	Felső korlát	1,17E-02		3,57E-03		1,18E-03		6,16E-03		5,41E-02		6,22E-02		4,23E-01								
		Lejebb ill.	1,06E-02	2,09E-03	2,58E-03	7,88E-04	4,15E-05	1,95E-05	4,67E-03	1,27E-01	5,39E-02	1,00E-04	6,20E-02	1,18E-04	3,59E-01	4,46E-01	4,1E-03	8,9E-03	243	1,1E+02	4,1E-03	245	1050
		Alsó korlát	9,47E-03		2,06E-03		2,70E-05		2,46E-03		5,38E-02		6,19E-02		7,06E-02								
Bmf	DYNLL2	Felső korlát	2,36E-02		5,81E-03		1,20E-02		1,65E-02		8,38E-02		9,42E-02		2,29E+00								
		Lejebb ill.	2,21E-02	3,93E-03	2,03E-03	1,93E-03	7,62E-04	4,16E-04	1,14E-02	1,17E-01	8,36E-02	1,62E-04	9,41E-02	2,23E-04	8,49E-02	1,1E-02	6,7E-02	92	1,5E+01	1,0E-02	98	735	
		Alsó korlát	1,97E-02		1,30E-03		3,01E-05		3,31E-03		8,36E-02		9,39E-02		9,89E-02								
dimer Bmf	DYNLL2	Felső korlát	1,37E-02		7,74E-03		1,32E-02		9,52E-03		9,57E-02		1,09E-01		1,31E-01								
		Lejebb ill.	1,28E-02	1,17E-03	4,67E-03	1,50E-03	8,44E-03	2,93E-03	4,95E-03	9,20E-03	9,56E-02	4,89E-05	1,09E-01	1,59E-04	1,17E-01	6,69E-04	2,7E-03	1,7E+00	366	5,9E-01	1,0E-03	991	3
		Alsó korlát	1,19E-02		2,55E-03		2,77E-03		3,49E-03		9,55E-02		1,09E-01		1,15E-01								
nNOS	DYNLL1	Felső korlát	5,73E-02		6,58E-01		1,28E-04		1,17E-02		5,05E-02		5,78E-02		2,23E+00								
		Lejebb ill.	4,59E-02	7,42E-03	5,26E-01	3,98E-02	1,34E-04	3,41E-05	8,59E-03	1,01E-01	5,05E-02	3,82E-05	5,77E-02	1,42E-04	2,19E-01	1,70E-01	8,7E-05	1,6E-02	11473	6,4E+01	8,6E-05	11652	7000
		Alsó korlát	3,67E-02		4,21E-01		1,29E-05		6,88E-03		5,05E-02		5,75E-02		7,67E-02								
nNOS	DYNLL2	Felső korlát	7,53E-02		9,25E-01		1,22E-03		1,77E-02		9,10E-02		1,03E-01		2,17E+00								
		Lejebb ill.	4,82E-02	5,13E-03	5,92E-01	2,95E-02	1,88E-04	4,15E-05	1,62E-02	5,39E-02	9,10E-02	3,95E-05	1,03E-01	2,06E-04	4,98E-01	2,39E-01	8,1E-05	1,2E-02	12279	8,6E+01	8,1E-05	12422	5410
		Alsó korlát	3,86E-02		4,73E-01		3,94E-05		1,50E-02		9,10E-02		1,03E-01		1,63E-01								
miozin 5a	DYNLL2	Felső korlát	7,74E-03		2,08E-01		1,05E-03		2,30E-02		1,01E-01		1,11E-01		2,31E+00								
		Lejebb ill.	6,19E-03	2,23E-03	1,66E-01	6,35E-03	1,59E-04	4,23E-05	1,99E-02	5,20E-02	1,01E-01	1,10E-04	1,11E-01	2,45E-04	6,98E-01	3,61E-01	3,7E-05	8,0E-03	26892	1,3E+02	3,7E-05	27107	8850
		Alsó korlát	5,78E-03		1,55E-01		5,04E-05		1,72E-02		1,00E-01		1,11E-01		2,07E-01								
dimer miozin 5a	DYNLL2	Felső korlát	4,60E-03		5,32E-03		1,42E-02		9,08E-03		9,42E-02		1,05E-01		1,92E-01								
		Lejebb ill.	4,05E-03	1,68E-03	1,99E-03	2,28E-03	7,89E-03	7,05E-03	3,72E-03	2,25E-02	9,41E-02	9,53E-05	1,04E-01	3,00E-04	1,10E-01	1,26E-03	2,0E-03	2,1E+00	492	4,7E-01	6,5E-04	1536	37
		Alsó korlát	3,82E-03		8,18E-04		3,47E-04		7,80E-04		9,41E-02		1,04E-01		1,08E-01								
Pak1	DYNLL2	Felső korlát	1,85E-02		8,44E-01		8,44E-04																

A

#	Szekvencia
1	HSVA VQT E
2	LSKG TQT T
3	ISVG TQT D
4	ITRG TQT G
5	ITVS TQT E
6	VSIG IQT T
7	VSRA TQT V
8	VTKA TQT S
9	VTRA TQT S
10	VTRG TQT S
11	VTRS TQT Y
12	VHVS TQT R
13	MSRG TQT H
14	MSRG TQT S
15	NAKW TQS S
16	NTRY TQT I
17	RTIG TQT Y
18	RIVG TQT E
19	RNAW TQT Y
20	RNVA TQT P
21	RSIA TQT S
22	RSIG IQV F
23	RSVA VQT D
24	RSVS TQT H
25	KTVG TQT T
26	KTVG TQT T
27	NSKW TQS T
28	MVKW TQT R
29	RSIS TQT E
30	NIVW TQT L
31	VSVG TQT E
32	RTKW TQV R
33	LPVV GQF A
34	NSKW TQS F
35	KDAW TQT L
36	VTAW TQT E
37	RDAS TQT Y
38	RDVA VQT D
39	TSRH TQT V
40	VSRA TQT Y
41	RDMW TQT I
42	RSIG TQT E
43	HSVA TQT N
44	VDAQ TQT S
45	HSIA TQT V
46	RIVG TQT S
47	VSVG VQV G
48	ISRH TQT L
49	KDSW TQT W
50	KDSW TQT V
51	INVA TQT W

B

#	Szekvencia
1	PLSR VQG S
2	GVAV LQT E
3	TARL LQD H
4	FSDN KQT N
5	TTEF IQQ D
6	QTTL VQN R
7	PVfy FQS K
8	YGIS TQQ L
9	CTTR GQC A
10	YMGG GQW A
11	IVTG SQQ R
12	RTLY SQP L
13	YTHD IQA H
14	LFPS TQH I
15	SQVR QQL L
16	TDGL WQE W
17	FYPA SQH A
18	ISHG FQL M
19	RATR AQA N
20	GWVL QQG Q
21	PTAV QQK Q
22	RRDQ TQL R
23	ILSQ WQE H
24	GLAL GQQ M
25	RQPP YQW L
26	FWTS EQR S
27	YVVT SQA N
28	TGYL CQL F
29	VAGR AQG P
30	NLWV NQW P
31	TFPI LQS L
32	SLRV QQL L
33	VLRG GQE R
34	LTGR HQK A
35	GVYV GQE D
36	WLAG GQG R
37	QAYS GQG G
38	ELRY DQF N
39	ALFF LQS T
40	GAPA RQP S
41	DYHR HQI K
42	QVSK HQD S
43	FARM PQS V
44	CLYP VQG L
45	GQRD PQV G
46	GVGG YQK R
47	HRAV PQA G
48	GKSL GQS M
49	GSKF VQS T
50	MVPI RQH T
51	TAPG SQS R
52	TLRA TQM G
53	AAWR KQG Y

2. függelék táblázat: *Bivalens XXXXXQXX könyvtár használata során immobilizált GST-DYNLL1 targeten (A) és immobilizált Anti-FLAG antitest targeten szelektált egyedi fágklónok szekvenciái. Az első szelekció során szelektált fágok szekvenciái (25) a vonal felett találhatóak.*

3. *függelék táblázat*: Az Ac-SRGTQTE-DYNLL2 és a GCN4 leucin-cipzár által dimerizált VSRGTQTE-DYNLL2 komplexek röntgenszórásának és modell-építésének adatai.

	DYNLL2 / Ac-SRGTQTE	DYNLL2 / Leu-zipper dimerized VSRGTQTE
<i>Data collection</i>		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell parameters		
<i>a</i> (Å)	35.6	53.8
<i>b</i> (Å)	64.0	68.4
<i>c</i> (Å)	151.8	101.7
α, β, γ (°)	90	90
Resolution (Å)	151.84-1.31 (1.34-1.31) ^a	42.31-2.90 (3.00-2.90)
Total reflections	624141	26916
Unique reflections	81872	8273
Completeness (%)	96.0 (67.1)	94.4 (96.6)
<i>R</i> _{sym} (%) ^b	8.0 (39.3)	13.1 (57.6)
$\langle I / \sigma \rangle$	15.7 (2.9)	6.4 (1.5)
<i>Refinement</i>		
Resolution (Å)	151.84-1.31	42.31-2.90
No. reflections	77776	8271
No. of amino acids		
DYNLL2	347	174
Peptide	24	85
No. of modeled non-hydrogen atom positions	3625	2040
Average <i>B</i> -factor (all atoms, Å ²)	10.5	52.8
<i>R</i> _{cryst} (%)	12.1	25.0
<i>R</i> _{free} (%) ^c	15.6	29.5
R.m.s. deviation from ideal bond length (Å)	0.024	0.011
R.m.s. deviation from ideal bond angles (°)	1.99	1.12
Ramachandran plot (% by PROCHECK)		
Most favored	90.6	92.8
Additionally allowed	8.3	6.4
Generously allowed	0.0	0.0
Disallowed	1.2	0.9
PDB reference code	2XQQ	3P8M

4. függelék táblázat: Az XXXXXQXX könyvtár használatával jósolt humán LC8 partnerek A osztálya. A motívumok adott pozíciójában található összes aminosav legalább egyszer előfordul, vagy a fág-bemutató során szelektált peptidok, vagy az ismert motívumok adott pozíciójában. A már ismert partnereket aláhúzott sorszámmal jelöltem.

#	UniProt kód	fehérje neve	pozíció	szekvencia	pont
<u>1</u>	Q32P44	EMAL3_HUMAN	80	VSRGTQTE	367
<u>2</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	488	VSRETQTS	316
3	Q9Y6D5	BIG2_HUMAN	621	VSSGTQTT	311
4	Q9UPX6	K1024_HUMAN	471	SSVGTQTE	310
5	O15061	SYNEM_HUMAN	1253	ESVGTQTS	301
<u>6</u>	Q8TD19	NEK9_HUMAN	942	HSKGTQTA	293
7	Q96QB1	RHG07_HUMAN	733	VSNSTQTS	293
<u>8</u>	Q12888	TP53B_HUMAN	1166	VSAATQTI	290
9	O94964	CT117_HUMAN	1137	ASVGTQTI	289
10	Q9HAR2	LPHN3_HUMAN	1371	VTTSTQTE	275
11	Q6DT37	MRCKG_HUMAN	712	RNVGTQTL	275
12	A0JNW5	UH1BL_HUMAN	1394	VTQATQTS	274
13	Q9BWW3	CDAC1_HUMAN	16	RSVSTQTG	273
14	P46013	KI67_HUMAN	2618	VERLTQTS	272
15	Q9UPQ7	PZRN3_HUMAN	353	VDTGTQTD	272
<u>16</u>	Q9UPA5	BSN_HUMAN	1529	VAQGTQTP	269
17	Q7Z4T9	AAT1_HUMAN	186	STVGTQTD	267
18	Q9UBY0	SL9A2_HUMAN	752	REKGTQTS	266
19	Q8N7K9	YS059_HUMAN	315	LSSGTQTT	266
20	Q96RI0	PAR4_HUMAN	15	LSGGTQTP	265
<u>21</u>	Q8IV61	GRP3_HUMAN	609	TSQATQTE	262
22	Q9C0C7	AMRA1_HUMAN	1099	TSQGTQTL	260
<u>23</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	806	SSVETQTS	259
24	Q8NEL9	DDHD1_HUMAN	793	TTVGTQTL	259
<u>25</u>	P27816	MAP4_HUMAN	799	GSKSTQTV	259
26	Q96BW5	PTER_HUMAN	102	ISRDTQTL	258
<u>27</u>	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	404	SEVGTQTS	257
28	O95267	GRP1_HUMAN	668	AHKATQTE	256
29	Q9HCD6	TANC2_HUMAN	1422	VSIGLQTE	256
30	Q4VXU2	PAP1L_HUMAN	481	ANIGTQTT	255
31	O94964	CT117_HUMAN	1147	VSVGLQTD	254
32	Q9NR71	ASAH2_HUMAN	77	SSTATQTS	253
33	A6NCI8	CB078_HUMAN	315	SSRNTQTL	253
34	Q6P1L5	F117B_HUMAN	245	RDKATQTE	253
35	Q96T58	MINT_HUMAN	3390	EAKGTQTG	253
36	Q96CK0	ZN653_HUMAN	361	VAAYTQTE	253
37	Q9BYP7	WNK3_HUMAN	850	NSTSTQTS	252

38	Q8NA54	IQUB_HUMAN	265	HNAGTQTV	251
39	O75161	NPHP4_HUMAN	579	IVVGTQTR	249
<u>40</u>	O14576	DC1I1_HUMAN	165	YSKETQTP	246
41	Q02962	PAX2_HUMAN	317	NVSGTQTY	246
42	P0C6A0	ZGLP1_HUMAN	97	DSKDTQTR	246
43	P15924	DESP_HUMAN	1948	SHRETQTE	245
44	Q9Y4B5	K0802_HUMAN	1624	RTMGTQTV	245
45	Q5VWX1	KHDR2_HUMAN	289	NSYATQTO	245
46	P78364	PHC1_HUMAN	322	VSQGSQTE	244
47	Q8TDF6	GRP4_HUMAN	637	RHAWTQTE	243
<u>48</u>	Q14149	MORC3_HUMAN	635	NTAATQTE	243
49	Q96LW1	Z354B_HUMAN	92	MTKSTQTO	243
50	P17844	DDX5_HUMAN	549	VSAGIQTS	242
51	Q8NDV7	TNR6A_HUMAN	753	GSSATQTF	242
52	Q8N5S3	CB073_HUMAN	259	TSGATQTT	241
53	Q6P1L5	F117B_HUMAN	389	RSIDTQTP	241
54	Q86VQ1	GLCI1_HUMAN	343	RSIDTQTP	241
55	O15060	ZBT39_HUMAN	232	VSTGIQTS	241
56	Q00013	EM55_HUMAN	402	TDQGTQTE	240
57	Q9Y4F5	K0284_HUMAN	1278	TSTATQTP	240
58	P37198	NUP62_HUMAN	59	FSLATQTP	240
59	Q3KR37	GRM1B_HUMAN	597	VAGSTQTR	239
60	P30305	MPIP2_HUMAN	51	VTTLTQTM	239
<u>61</u>	Q15326	ZMY11_HUMAN	410	LHRSTQTT	239
62	Q01484	ANK2_HUMAN	2861	SSITTQTD	238
<u>63</u>	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	437	RSTTTQTD	235
64	P29375	KDM5A_HUMAN	196	LSTDTQTS	236
65	Q99996	AKAP9_HUMAN	1881	HAKVTQTE	234
<u>66</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	644	SNIQTQTE	234
67	Q12830	BPTF_HUMAN	2522	VQSSTQTL	234
68	Q68DE3	K2018_HUMAN	644	ASNSTQTF	234
69	Q68DE3	K2018_HUMAN	1526	LVQGTQTS	234
70	Q9H195	MUC3B_HUMAN	163	SATGTQTS	234
71	Q01974	ROR2_HUMAN	763	ASNTTQTS	233
72	Q8IX01	SFR14_HUMAN	695	ATTGTQTL	233
73	Q5JSH3	WDR44_HUMAN	153	TTKLTQTS	232
74	Q2M3A8	CK036_HUMAN	6	ITSATQTS	231
75	Q9ULV3	CIZ1_HUMAN	424	KQVQTQTY	230
76	Q9UBG3	CRNN_HUMAN	310	GSTSTQTO	230
77	Q9UIG5	PS1C1_HUMAN	11	RALGTQTP	230
78	Q6ZNE9	RUFY4_HUMAN	179	CSSSTQTO	230
79	Q86VQ1	GLCI1_HUMAN	197	KDKATQTP	229
80	P14314	GLU2B_HUMAN	256	LSGDTQTD	229
81	Q8N7K9	YS059_HUMAN	393	LSSETQTG	229

82	O60765	Z354A_HUMAN	92	TTKSTQTQ	229
83	Q14202	ZMYM3_HUMAN	850	KSKGSQTE	229
84	Q9Y4B5	K0802_HUMAN	1634	ISVGLQTE	227
85	Q7Z6E9	RBBP6_HUMAN	615	VSSGVQTA	226
86	P61571	REC1_HUMAN	64	NTKVTQTP	226
87	A7KAX9	RHG32_HUMAN	1003	ASGQTQTG	226
88	O43313	ATMIN_HUMAN	760	NSTETQTM	225
89	Q8TDM6	DLG5_HUMAN	837	HNNSTQTD	225
90	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	386	IDAATQTE	224
91	Q15434	RBMS2_HUMAN	289	YQRVTQTS	224
92	Q9H5J0	ZBTB3_HUMAN	198	TSRGTQPS	224
93	Q9C0C7	AMRA1_HUMAN	1111	QNAETQTE	223
94	Q92817	EVPL_HUMAN	1670	LSQETQTR	223
95	Q14157	UBP2L_HUMAN	592	EQRSTQTR	223
96	Q2T9L4	CO059_HUMAN	263	RNSSTQTV	222
97	Q8TEC5	SH3R2_HUMAN	717	TASGTQTV	222
98	Q7Z6B0	CCD91_HUMAN	17	GSGETQTT	221
99	Q5TG30	RHG40_HUMAN	89	LSTLTQTQ	221
100	Q8IXF9	AQ12A_HUMAN	267	ASGDTQTP	220
101	A6NM10	AQ12B_HUMAN	267	ASGDTQTP	220
102	Q96LC9	BMF_HUMAN	65	EDKATQTL	220
103	Q6PJG2	CN043_HUMAN	966	AVKATQTL	220
104	Q03060	CREM_HUMAN	39	AHVQTQTG	220
105	Q5VSD8	YI029_HUMAN	66	KNTSTQTT	220

5. függelék táblázat: Az XXXXXQXX könyvtár használatával jószolt humán LC8 partnerek B osztálya. Az aláhúzással jelölt aminosavak eddig sem a fág-bemutatók során szelektált motívumokban, sem az ismert partnerek motívumaiban nem fordultak elő az adott pozícióban.

#	Uniprot kód	fehérje neve	pozíció	szekvencia	pont
1	Q9Y2G4	ANKR6_HUMAN	613	VNRGTQTK	323
2	Q15326	ZMY11_HUMAN	393	VSVSTQTK	304
3	Q8NCP5	ZBT44_HUMAN	195	VKCGTQTS	279
4	Q99550	MPP9_HUMAN	756	KNWGTQTE	271
5	Q9Y228	T3JAM_HUMAN	161	HHRGTQTK	270
6	Q03164	MLL1_HUMAN	3479	VSNFTQTV	269
7	Q7Z591	AKNA_HUMAN	933	VSPLTQTP	268
8	Q8NDZ9	YJ017_HUMAN	196	GLRGTQTS	266
9	Q96T58	MINT_HUMAN	3444	VSLPTQTA	266
10	Q9Y2X9	ZN281_HUMAN	649	LSPGTQTP	265
11	P46013	KI67_HUMAN	1648	VGKLTQTS	263
12	P46013	KI67_HUMAN	2014	VGKLTQTS	263
13	P46013	KI67_HUMAN	2857	VGKLTQTS	263

14	P01133	EGF_HUMAN	1167	PSYGTQTL	260
15	A4GXA9	EME2_HUMAN	194	VSRGTQQP	259
16	Q15528	MED22_HUMAN	47	VSRATQGE	259
17	Q2M1K9	ZN423_HUMAN	1152	PRKGTQTS	257
18	P51659	DHB4_HUMAN	196	GSRMTQTV	256
19	Q9HAU0	PKHA5_HUMAN	1076	VSRGNQTM	255
20	Q8TBR5	CS023_HUMAN	25	RSVLTQTK	253
21	Q8N6M8	IQCF1_HUMAN	40	VLVETQTV	251
22	Q5VUA4	ZN318_HUMAN	1339	VTTSTQTK	251
23	Q96FN5	KIF12_HUMAN	562	HSDWTQTR	250
24	Q9ULV3	CIZ1_HUMAN	288	VPKQTQTP	250
25	Q8IX15	HOMEZ_HUMAN	147	LSKPTQTK	247
26	O75369	FLNB_HUMAN	1604	RIRATQTG	246
27	Q86UW6	N4BP2_HUMAN	1010	VGMCTQTE	246
28	Q9BVV6	K0586_HUMAN	675	KSIRTQTD	245
29	Q66K89	E4F1_HUMAN	658	IIEGTQTE	245
30	Q6P1L5	F117B_HUMAN	106	PTVATQTG	245
31	P51788	CLCN2_HUMAN	650	ERRATQTS	244
32	Q9H3D4	P63_HUMAN	39	MSQSTQTN	244
33	Q9Y3S1	WNK2_HUMAN	1080	QSVPTQTA	244
34	Q9Y5P3	RAI2_HUMAN	274	PFKGTQTP	244
35	Q92793	CBP_HUMAN	905	VPSATQTO	242
36	Q9UPN3	MACF1_HUMAN	3412	EPVGTQTA	242
37	Q6ZT07	TBCD9_HUMAN	455	VPTATQTL	242
38	P20930	FILA_HUMAN	2626	GTRHTQTS	241
39	P20930	FILA_HUMAN	2950	GTRHTQTS	241
40	Q9UPZ9	ICK_HUMAN	464	NSAPTQTS	241
41	Q8NEZ4	MLL3_HUMAN	3493	NSPSTQTF	241
42	Q8NAA6	CO053_HUMAN	170	VTFPTQTR	241
43	Q14686	NCOA6_HUMAN	1199	VAAPTQTS	241
44	P14859	PO2F1_HUMAN	16	GNTGTQTN	240
45	P49746	TSP3_HUMAN	603	MSNPTQTD	240
46	A5YM69	ARG35_HUMAN	430	QIPGTQTE	240
47	Q12774	ARHG5_HUMAN	430	QIPGTQTE	240
48	Q9Y266	NUDC_HUMAN	170	NYRWTQTL	239
49	Q9UPQ9	TNR6B_HUMAN	653	ESAATQTK	239
50	Q9ULM2	ZN490_HUMAN	47	QSIKTQTD	238
51	Q96GM8	TOE1_HUMAN	350	NLPGTQTS	238
52	Q8N8K9	K1958_HUMAN	89	VPSETQTS	237
53	P50542	PEX5_HUMAN	74	VSRAPQTF	237
54	Q03164	MLL1_HUMAN	3427	VLPSTQTT	237
55	P43378	PTN9_HUMAN	348	RSGHTQTD	235

56	P57723	PCBP4_HUMAN	234	LDPGTQTS	234
57	Q8N554	ZN276_HUMAN	575	VHPLTQTQ	234
58	Q12830	BPTF_HUMAN	1634	ESDSTQTT	233
59	Q9C091	GRB1L_HUMAN	270	KSGFTQTD	233
60	Q9ULE0	WWC3_HUMAN	821	CSNCTQTS	233
61	Q5JPB2	ZN831_HUMAN	188	KHRRTQTH	233
62	Q9H2F5	EPC1_HUMAN	721	PSNITQTS	233
63	Q8N7K9	YS059_HUMAN	303	PSSRTQTS	233
64	O60741	HCN1_HUMAN	680	PSPSTQTP	232
65	O14686	MLL2_HUMAN	3968	QEPGTQTS	231
66	Q9H320	VCX1_HUMAN	94	VSEGTQHD	230
67	Q9UQN3	CHM2B_HUMAN	82	TSMSTQTK	230
68	Q68CZ2	TENS3_HUMAN	581	SSYSTQTW	230
69	Q8N187	AL2S8_HUMAN	116	VIPPTQTG	230
70	Q14679	TLL4_HUMAN	1161	PSLSTQTL	230
71	P21333	FLNA_HUMAN	1501	NADGTQTV	229
72	Q96EY1	DNJA3_HUMAN	375	IPPGTQTD	229
73	Q8IWJ2	GCC2_HUMAN	1320	KSEHTQTV	228
74	Q9NYV4	CDK12_HUMAN	606	VSVKTQVS	228
75	Q8N7Y1	PRR10_HUMAN	137	RSWVTQTL	227
76	Q9H3P2	NELFA_HUMAN	402	VAPTTQTP	227
77	Q5T6F2	UBAP2_HUMAN	1018	VYNKTQTF	226
78	Q5T7W0	ZN618_HUMAN	310	VAAKTQTN	226
79	Q16625	OCLN_HUMAN	300	VSAGTQDV	226
80	P61578	REC16_HUMAN	65	NTKMTQTP	226
81	Q9NS68	TNR19_HUMAN	405	IHPATQTS	226
82	Q8NFA0	UBP32_HUMAN	1005	ASSPTQTD	226
83	Q96L96	ALPK3_HUMAN	824	RGDGTQTA	225
84	Q9Y6J0	CABIN_HUMAN	21	KSHKTQTK	225
85	Q00975	CAC1B_HUMAN	1936	VSWGTRT	225
86	Q8NEP4	CQ047_HUMAN	104	KSQKTQTL	225
87	Q9Y6Q9	NCOA3_HUMAN	1019	VSHGTQNR	224
88	O15530	PDPK1_HUMAN	26	SMVRTQTE	224
89	Q68CP9	ARID2_HUMAN	1201	TMSGTQTG	224
90	Q6ZWK4	CA186_HUMAN	66	EMKETQTE	224
91	Q96MH7	CE034_HUMAN	535	CRRLTQTS	224
92	Q5VTT5	MYOM3_HUMAN	609	AFRDTQTS	224
93	Q6KC79	NIPBL_HUMAN	641	TKVETQTE	224
94	Q99952	PTN18_HUMAN	365	AGSGTQTG	224
95	Q7Z4V0	ZN438_HUMAN	684	GSKGTQEE	224
96	Q15018	F175B_HUMAN	405	DPRNTQTS	224
97	Q96K76	UBP47_HUMAN	523	VSRITQED	223

98	Q9H819	DJC18_HUMAN	50	ENEWTQTR	223
99	Q14966	ZN638_HUMAN	1250	ISGITQTM	223
100	O00555	CAC1A_HUMAN	1148	NPSGTQTN	223
101	Q96G01	BICD1_HUMAN	848	VSSGTQRK	222
102	Q3L8U1	CHD9_HUMAN	1584	KKVKTQTS	222
103	Q9P1V8	CN174_HUMAN	390	VEEKTQTK	222
104	Q9BYB4	GNB1L_HUMAN	14	VLRGTQSP	222
105	Q6Q0C1	HDMCP_HUMAN	120	VRLQTQTO	222
106	P51957	NEK4_HUMAN	708	VQLMTQTL	222
107	Q01804	OTUD4_HUMAN	613	VLSVTQTL	222
108	Q7Z7L9	ZSCA2_HUMAN	124	VEDLTQTL	222
109	P78347	GTF2I_HUMAN	700	VRTPTQTN	222
110	P49796	RGS3_HUMAN	116	RDEWTQTS	221
111	A4IF30	S35F4_HUMAN	132	ADDGTQTH	221
112	Q70CQ4	UBP31_HUMAN	430	LSSPTQTA	221
113	Q4AC94	C2CD3_HUMAN	1910	LSPQTQTA	221
114	Q0VF49	K2012_HUMAN	33	TSPLTQTT	221
115	Q8NEN9	PDZD8_HUMAN	577	VSKPTQGS	221
116	P54652	HSP72_HUMAN	423	PTKQTQTF	221
117	P17066	HSP76_HUMAN	422	PTKQTQTF	221
118	P11142	HSP7C_HUMAN	420	PTKQTQTF	221
119	Q9ULH7	MKL2_HUMAN	653	VSTGGQTL	220
120	Q8WXR4	MYO3B_HUMAN	1173	NNGRTQTS	220
121	Q86SE5	RALYL_HUMAN	0	MTGKTQTS	220
122	O95785	WIZ_HUMAN	210	SEVATQTW	220
123	Q16204	CCDC6_HUMAN	429	PSPNTQTP	220
124	A6NFN3	FOX1C_HUMAN	65	PIAGTQTV	220

A

#	Szekvencia
1	HSVA VQT E
2	LSKG TQT T
3	ISVG TQT D
4	ITRG TQT G
5	ITVS TQT E
6	VSIG IQT T
7	VSRA TQT V
8	VTKA TQT S
9	VTRA TQT S
10	VTRG TQT S
11	VTRS TQT Y
12	VHVS TQT R
13	MSRG TQT H
14	MSRG TQT S
15	NAKW TQS S
16	NTRY TQT I
17	RTIG TQT Y
18	RIVG TQT E
19	RNAV TQT Y
20	RNVA TQT P
21	RSIA TQT S
22	RSIG IQV F
23	RSVA VQT D
24	RSVS TQT H
25	KIVG TQT T
26	KIVG TQT T
27	NSKW TQS T
28	MVKW TQT R
29	RSIS TQT E
30	NIVW TQT L
31	VSVG TQT E
32	RTKW TQV R
33	LEVV GQF A
34	NSKW TQS F
35	KDAW TQT L
36	VTAW TQT E
37	RDAS TQT Y
38	RDVA VQT D
39	TSRH TQT V
40	VSRA TQT Y
41	RDMW TQT I
42	RSIG TQT E
43	HSVA TQT N
44	VDAQ TQT S
45	HSIA TQT V
46	RIVG TQT S
47	VSVG VQV G
48	ISRH TQT L
49	KDSW TQT W
50	KDSW TQT V
51	INVA TQT W

B

#	Szekvencia
1	PLSR VQG S
2	GVAV LQT E
3	TARL LQD H
4	FSDN KQT N
5	TTEF IQQ D
6	QTTL VQN R
7	PVfy FQS K
8	YGIS TQQ L
9	CTTR GQC A
10	YMGG GQW A
11	IVTG SQQ R
12	RTLY SQP L
13	YTHD IQA H
14	LFPS TQH I
15	SQVR QQL L
16	TDGL WQE W
17	FYP A SQH A
18	ISHG FQL M
19	RATR AQA N
20	GMVL QQG Q
21	PTAV QQK Q
22	RRDQ TQL R
23	ILSQ WQE H
24	GLAL GQQ M
25	RQPP YQW L
26	FWTS EQR S
27	YVVT SQAN
28	TGYL CQL F
29	VAGR AQQ P
30	NLWV NQW P
31	TFPI LQS L
32	SLRV QQL L
33	VLRG GQE R
34	LTGR HQK A
35	GVYV GQE D
36	WLAG GQG R
37	QAYS GQG G
38	ELRY DQF N
39	ALFF LQS T
40	GAPA RQP S
41	DYHR HQI K
42	QVSK HQD S
43	FARM PQS V
44	CLYP VQG L
45	GQRD PQV G
46	GVGG YQK R
47	HRAV PQA G
48	GKSL GQS M
49	GSKF VQS T
50	MVPI RQH T
51	TAPG SQS R
52	TLRA TQM G
53	AAWR KQG Y

6. függelék táblázat: Bivalens XXVSRGXXXEX könyvtár használata során immobilizált GST-DYNLL1 targeten (A) és immobilizált Anti-FLAG antitest targeten szelektált egyedi fágklónok szekvenciái.

7. **függelék táblázat:** A két fág-bemutató eredményeinek összesített eredményei alapján jószolt humán LC8 partnerek A osztálya. A motívumok adott pozíciójában található összes aminosav legalább egyszer előfordul, vagy a fág-bemutató során szelektált peptidok vagy az ismert motívumok adott pozíciójában. A már ismert partnereket aláhúzott sorszámmal jelöltem.

#	Uniprot kód	név	pozíció	szekvencia	pont
1	Q6P1L5	F117B_HUMAN	243	CMRDKATQTES	381
<u>2</u>	Q8TD19	NEK9_HUMAN	940	GMHSGTQTAK	368
<u>3</u>	Q32P44	EMAL3_HUMAN	78	SLVSRGTQTET	362
4	Q86VQ1	GLCI1_HUMAN	195	CMKDKATQTTPS	362
5	Q7Z4T9	AAT1_HUMAN	184	SKSTVGTQTDY	352
6	Q9UPX6	K1024_HUMAN	469	DTSSVGTQTEH	352
7	O94964	CT117_HUMAN	1135	GLASVGTQTIR	350
8	Q8TCU4	ALMS1_HUMAN	2330	IQKDIGTQTNL	348
9	Q9BVV6	K0586_HUMAN	673	KVKSIRTQTDF	347
10	Q76G19	PDZD4_HUMAN	65	QLVDSGTQTDI	347
<u>11</u>	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	384	KAIDAATQTPEP	345
12	Q9UPQ7	PZRN3_HUMAN	351	QLVDTGTQTDI	345
<u>13</u>	Q14149	MORC3_HUMAN	633	QGNTAATQTEV	344
14	Q8TDF6	GRP4_HUMAN	635	QLRHAWTQTES	343
15	Q6DT37	MRCKG_HUMAN	710	SLRNVGTQTLP	342
16	O15061	SYNEM_HUMAN	1251	TEESVGTQTSV	340
17	Q9Y6D5	BIG2_HUMAN	619	STVSSGTQTTV	339
18	Q9C073	F117A_HUMAN	114	CTNDKATQTPL	339
19	Q8N1W2	ZN710_HUMAN	2	GFMDSGTQTDA	339
20	P01133	EGF_HUMAN	1165	HMPSYGTQTLLE	334
<u>21</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	578	NMTDNQTQTID	331
22	Q9BWV3	CDAC1_HUMAN	14	AGRSVSTQTGS	331
23	Q9Y4B5	K0802_HUMAN	1622	GSRTMGTQTVQ	331
<u>24</u>	Q9UPA5	BSN_HUMAN	1527	PMVAQGTQTPH	329
<u>25</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	804	QFSSVETQTSA	328
26	A0JNW5	UH1BL_HUMAN	1392	RSVTQATQTSP	328
<u>27</u>	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	402	SVSEVGTQTSI	327
28	Q4VXU2	PAP1L_HUMAN	479	RVANIGTQTTG	327
29	Q6P1L5	F117B_HUMAN	104	TSPTVATQTGA	325
30	Q9P266	K1462_HUMAN	684	RYRDQQTQTSF	325
<u>31</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	665	ESLDIETQTDF	324
32	Q8IX01	SFR14_HUMAN	693	RRATTGTQTLLE	324
<u>33</u>	O14576	DC1I1_HUMAN	163	VSYSKETQTPL	323
34	Q9UBY0	SL9A2_HUMAN	750	HSREKGTQTSG	323
<u>35</u>	Q12888	TP53B_HUMAN	1164	ETVSAATQTIK	323
<u>36</u>	O43521	B2L11_HUMAN	107	MSCDKSTQTTPS	322
<u>37</u>	Q96LC9	BMF_HUMAN	63	SQEDKATQTLS	322
38	Q2M3A8	CK036_HUMAN	4	SEITSATQTSS	322

39	Q6P1L5	F117B_HUMAN	387	STRSIDTQTPG	322
40	Q5JTZ9	SYAM_HUMAN	661	LRLDVTTQTPL	322
<u>41</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	486	GGVSRETQTSG	321
42	Q86VQ1	GLCI1_HUMAN	341	STRSIDTQTPS	321
43	Q8N7K9	YS059_HUMAN	313	NQLSSGTQTTA	321
<u>44</u>	Q15326	ZMY11_HUMAN	408	RMLHRSTQTTN	321
45	Q14202	ZMYM3_HUMAN	848	EMKSKGSQTEE	320
46	Q2T9L4	CO059_HUMAN	269	TVSDKSTQTVL	319
<u>47</u>	Q13409	DC1I2_HUMAN	153	VTYTKETQTPV	319
48	O95267	GRP1_HUMAN	666	AVAHKATQTES	319
<u>49</u>	P27816	MAP4_HUMAN	797	RSGSKSTQTV	319
50	Q96QB1	RHG07_HUMAN	731	RSVSNSTQTSS	319
51	P51659	DHB4_HUMAN	194	NAGSRMTQTVM	317
<u>52</u>	Q8IV61	GRP3_HUMAN	607	ATTSQATQTEP	316
53	Q6ZNB6	NFXL1_HUMAN	126	TFITYTTQTDG	316
54	Q96LW1	Z354B_HUMAN	90	PKMTKSTQTQD	316
<u>55</u>	O43313	ATMIN_HUMAN	642	SASNIQTQTEE	315
56	Q9UHL3	F153A_HUMAN	100	AHADAGTQTNG	315
57	Q9H195	MUC3B_HUMAN	161	LMSATGTQTSP	315
58	Q8TEC5	SH3R2_HUMAN	715	VSTASGTQTVF	315
59	POC6A0	ZGLP1_HUMAN	95	DRDSKDTQTRI	314
60	Q99996	AKAP9_HUMAN	1879	LEHAKVTQTEL	313
61	Q8IY63	AMOL1_HUMAN	870	GSKDSSTQTDK	313
62	Q5H9R4	ARMX4_HUMAN	246	AMKEAVTQTDA	313
63	Q9Y6V0	PCLO_HUMAN	4760	QSKTSVTQTHL	313
64	A6NCI8	CB078_HUMAN	313	SFSSRNTQMLE	312
65	Q96CV9	OPTN_HUMAN	269	NRSEIETQTEG	312
66	Q6ZT07	TBCD9_HUMAN	453	NSVPTATQTLM	312
67	Q9C0C7	AMRA1_HUMAN	1097	SVTSQGTQTLA	311
68	Q9ULV3	CIZ1_HUMAN	286	MTVPKQTQTPD	311
69	Q9H7U1	F190B_HUMAN	760	TYADKYTQTPW	311
<u>70</u>	Q9UPA5	BSN_HUMAN	2659	AMSSVGIQTIS	310
71	O00555	CAC1A_HUMAN	1146	VTNPSGTQTNS	310
72	Q8N4S9	MALD2_HUMAN	159	GSLDRHTQTVR	310
73	Q96T58	MINT_HUMAN	3388	SQEAKGTQTGV	310
74	Q6ZMN7	PZRN4_HUMAN	327	QLMNASTQTDI	310
75	Q8NF91	SYNE1_HUMAN	8405	NLHSTETQTAG	309
76	P24588	AKAP5_HUMAN	158	EILDIQTQTPL	308
77	P20930	FILA_HUMAN	2624	QSGTRHTQTSS	307
78	Q8NA54	IQUB_HUMAN	263	EYHNAGTQTVP	307
79	O95785	WIZ_HUMAN	208	SASEVATQTTW	307
80	Q9BYP7	WNK3_HUMAN	848	QINSTSTQTSN	307
<u>81</u>	O60765	Z354A_HUMAN	90	HKTTKSTQTQD	307
82	Q2M1K9	ZN423_HUMAN	1150	SGPRKGTQTSP	307

83	Q9H4H8	FA83D_HUMAN	435	WSRSTTTQTDM	306
84	Q5JRA6	MIA3_HUMAN	1453	MMDVSRTQTAI	306
85	Q9P0W8	SPAT7_HUMAN	270	QRIEAETQTEL	306
86	Q9NTW7	ZF64B_HUMAN	84	RTITSETQTIT	306
87	O14974	MYPT1_HUMAN	875	GSNKKETQTDS	305

8. függelék táblázat: A két fág-bemutató eredményeinek összesített eredményei alapján jósolt humán LC8 partnerek **B** osztálya. Aláhúzással jelölt aminosavak eddig sem a fág-bemutató során szelektált motívumokban, sem az ismert partnerek motívumaiban nem fordultak elő az adott pozícióban.

#	Uniprot kód	név	pozíció	szekvencia	pont
1	P23193	TCEA1_HUMAN	249	MAKTGGTQTDL	350
2	Q15560	TCEA2_HUMAN	247	MARTGGTQTDL	350
3	Q8IXH8	CAD26_HUMAN	1318	MMPRRLTQTGK	348
4	Q96RI0	PAR4_HUMAN	13	FSLSGGTQTTPS	341
5	P49796	RGS3_HUMAN	114	PRRDEWTQTSP	338
6	Q9ULM2	ZN490_HUMAN	45	HGQSIKTQTDS	336
7	Q99973	TEP1_HUMAN	2507	KANTPETQTTPG	335
8	Q8TCU4	ALMS1_HUMAN	3759	VESDILTQTDR	330
9	Q15326	ZMY11_HUMAN	391	EKVSVSTQTKK	326
10	Q9Y3S1	WNK2_HUMAN	1078	SVQSVPTQTAT	326
11	Q4VCS5	AMOT_HUMAN	857	GSRDCSTQTER	325
12	Q99550	MPP9_HUMAN	754	IFKNWGTQTEK	324
13	O75161	NPHP4_HUMAN	577	APIVVGTQTRS	322
14	Q59H18	TNI3K_HUMAN	2	NYKSRPTQTCT	318
15	Q96FN5	KIF12_HUMAN	560	RSHSDWTQTRV	318
16	Q9C091	GRB1L_HUMAN	268	GYKSGFTQTDA	318
17	A4IF30	S35F4_HUMAN	130	RSADDGTQTHS	317
18	Q66K89	E4F1_HUMAN	3212	TEIIEGTQTEV	314
19	Q9Y2G4	ANKR6_HUMAN	611	PCVNRGTQTKK	313
20	A2VCK2	DCD2B_HUMAN	303	VADDEDTQTEE	312
21	Q5VUA4	ZN318_HUMAN	1337	PVVTTSTQTKI	312
22	Q96S38	KS6C1_HUMAN	707	MGPTKFTQTNI	312
23	Q9Y5P3	RAI2_HUMAN	272	LHPFKGTQTPL	312
24	Q9Y6V0	PCLO_HUMAN	3796	QFIPPQTQTES	312
25	P57723	PCBP4_HUMAN	232	PGLDPGTQTSS	311
26	Q14966	ZN638_HUMAN	1248	DFISGITQTMV	311
27	Q5VWX1	KHDR2_HUMAN	1084	YDNSYATQTQS	311
28	Q6PKG0	LARP1_HUMAN	656	NKILIVTQTPH	311
29	Q8NEZ4	MLL3_HUMAN	194	SINSPSTQTFM	311
30	Q9Y2J4	AMOL2_HUMAN	721	GSRDGSTQTEG	311
31	Q63HN8	RN213_HUMAN	287	KLKNPQTQTEE	310
32	Q12774	ARHG5_HUMAN	428	MTQIPGTQTES	309

33	Q3L8U1	CHD9_HUMAN	1582	KGKKVK <u>T</u> QTSS	309
34	Q9Y6J0	CABIN_HUMAN	19	SFKSHK <u>T</u> QTK	309
35	A5YM69	ARG35_HUMAN	428	VTQ <u>I</u> PGTQTES	308
36	Q01484	ANK2_HUMAN	2859	QDSSIT <u>T</u> QTDR	308
37	Q8N7K9	YS059_HUMAN	257	MQ <u>F</u> TSRTQTNF	308
38	Q9NS68	TNR19_HUMAN	403	AVIHP <u>A</u> TQTS	308
39	Q9UPQ9	TNR6B_HUMAN	651	GW <u>E</u> SAATQTKN	308
40	Q9UPZ9	ICK_HUMAN	462	TGNS <u>A</u> PTQTSY	308
41	Q6ZWK4	CA186_HUMAN	640	VK <u>E</u> MKETQTER	307
42	Q9H819	DJC18_HUMAN	48	KSE <u>N</u> EW <u>T</u> QTRQ	307
43	Q9ULV3	CIZ1_HUMAN	422	LQK <u>Q</u> VQ <u>T</u> QTY	307
44	P37198	NUP62_HUMAN	57	GL <u>F</u> SLATQTPA	306
45	Q06265	EXOS9_HUMAN	406	NP <u>K</u> KIR <u>T</u> QTTS	306
46	Q5JSH3	WDR44_HUMAN	151	DE <u>T</u> TK <u>L</u> TQTS	306
47	Q7Z591	AKNA_HUMAN	64	SRV <u>S</u> PL <u>T</u> QTPE	306
48	Q8N5S3	CB073_HUMAN	757	EKT <u>S</u> GATQTTV	306
49	Q8NDZ9	YJ017_HUMAN	121	KAG <u>L</u> RGTQTS	306
50	Q8TBR5	CS023_HUMAN	23	RGR <u>S</u> VL <u>T</u> QTKH	306
51	Q9P2P6	STAR9_HUMAN	3635	LMMDG <u>S</u> TQTTV	306
52	P37198	NUP62_HUMAN	62	ATQ <u>T</u> PA <u>T</u> QTTG	305
53	Q8IWJ2	GCC2_HUMAN	931	MMK <u>S</u> EHTQTVS	305
54	Q9BXS6	NUSAP_HUMAN	340	KL <u>T</u> TE <u>A</u> TQTPV	305

10. Hivatkozások

- Abdu, U., et al. (2006). "spn-F encodes a novel protein that affects oocyte patterning and bristle morphology in *Drosophila*." Development **133**(8): 1477-1484.
- Alonso, C., et al. (2001). "African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein." J Virol **75**(20): 9819-9827.
- Barbar, E. (2008). "Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks." Biochemistry **47**(2): 503-508.
- Barbar, E., et al. (2001). "Dimerization and folding of LC8, a highly conserved light chain of cytoplasmic dynein." Biochemistry **40**(6): 1596-1605.
- Beekwilder, J., et al. (1999). "A phagemid vector using the *E. coli* phage shock promoter facilitates phage display of toxic proteins." Gene **228**(1-2): 23-31.
- Bell, C. W., et al. (1979). "Polypeptide subunits of dynein 1 from sea urchin sperm flagella." J Supramol Struct **11**(3): 311-317.
- Benison, G., et al. (2009). "Structural, thermodynamic, and kinetic effects of a phosphomimetic mutation in dynein light chain LC8." Biochemistry **48**(48): 11381-11389.
- Benison, G., et al. (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**(2): 457-468.
- Benison, G., et al. (2008). "The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8." J Mol Biol **384**(4): 954-966.
- Bonsor, D. A., et al. (2011). "Dissecting protein-protein interactions using directed evolution." Biochemistry **50**(13): 2394-2402.
- Chakrabarti, P., et al. (2002). "Dissecting protein-protein recognition sites." Proteins **47**(3): 334-343.
- Chen, Y. M., et al. (2009). "Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons." J Neurosci **29**(30): 9429-9438.
- Chica, C., et al. (2009). "Evidence for the concerted evolution between short linear protein motifs and their flanking regions." PLoS One **4**(7): e6052.
- Crepieux, P., et al. (1997). "I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain." Mol Cell Biol **17**(12): 7375-7385.
- Crooks, G. E., et al. (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." Genome Res **14**(6): 1188-1190.
- Dalby, P. A. (2011). "Strategy and success for the directed evolution of enzymes." Curr Opin Struct Biol **21**(4): 473-480.
- Day, C. L., et al. (2004). "Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands." Biochem J **377**(Pt 3): 597-605.
- De Boer, H. A., et al. (1983). "A hybrid promoter and portable Shine-Dalgarno regions of *Escherichia coli*." Biochem Soc Symp **48**: 233-244.
- den Hollander, P., et al. (2006). "Dynein light chain 1 contributes to cell cycle progression by increasing cyclin-dependent kinase 2 activity in estrogen-stimulated cells." Cancer Res **66**(11): 5941-5949.
- Dente, L., et al. (1997). "Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides." J Mol Biol **269**(5): 694-703.
- Dick, T., et al. (1996). "Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*." Mol Cell Biol **16**(5): 1966-1977.
- Dorsett, M., et al. (2009). "A role for dynein in the inhibition of germ cell proliferative fate." Mol Cell Biol **29**(22): 6128-6139.
- Doyle, D. A., et al. (1996). "Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ." Cell **85**(7): 1067-1076.
- Dunsch, A. K., et al. (2012). "Dynein light chain 1 and a spindle-associated adaptor promote dynein asymmetry and spindle orientation." J Cell Biol **198**(6): 1039-1054.

Emi, T., et al. (2005). "Isolation of a protein interacting with Vfp1a in guard cells of *Vicia faba*." Plant Physiol **138**(3): 1615-1626.

Epstein, E., et al. (2000). "Dynein light chain binding to a 3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules." J Clin Invest **105**(4): 505-512.

Espindola, F. S., et al. (2000). "The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN." Cell Motil Cytoskeleton **47**(4): 269-281.

Ewing, R. M., et al. (2007). "Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry." Mol Syst Biol **3**: 89.

Fan, J., et al. (2001). "Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain." J Mol Biol **306**(1): 97-108.

Fan, J. S., et al. (1998). "Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme." J Biol Chem **273**(50): 33472-33481.

Fejtova, A., et al. (2009). "Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon." J Cell Biol **185**(2): 341-355.

Feng, S., et al. (1995). "Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12408-12415.

Feng, Y., et al. (2000). "LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome." Neuron **28**(3): 665-679.

Fischer, E. (1894). "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme." Ber. Dtsch. Chem. Ges. **27**: 2984-2993.

Frauenfelder, H., et al. (1991). "The energy landscapes and motions of proteins." Science **254**(5038): 1598-1603.

Fridolfsson, H. N., et al. (2010). "UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration." Dev Biol **338**(2): 237-250.

Fuh, G., et al. (1990). "The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain." J Biol Chem **265**(6): 3111-3115.

Fuh, G., et al. (2000). "Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display." J Biol Chem **275**(28): 21486-21491.

Fuhrmann, J. C., et al. (2002). "Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes." J Neurosci **22**(13): 5393-5402.

Fuxreiter, M., et al. (2004). "Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins." J Mol Biol **338**(5): 1015-1026.

Garcia-Mayoral, M. F., et al. (2010). "Structural basis for the interaction between dynein light chain 1 and the glutamate channel homolog GRINL1A." FEBS J **277**(10): 2340-2350.

Garcia-Mayoral, M. F., et al. (2010). "Structural models of DYNLL1 with interacting partners: African swine fever virus protein p54 and postsynaptic scaffolding protein gephyrin." FEBS Lett.

Giaever, G., et al. (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Nature **418**(6896): 387-391.

Giot, L., et al. (2003). "A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*." Science **302**(5651): 1727-1736.

Gonczy, P., et al. (2000). "Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III." Nature **408**(6810): 331-336.

Hall, J., et al. (2008). "Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes." Biochemistry **47**(46): 11940-11952.

Hall, J., et al. (2009). "Multivalency in the assembly of intrinsically disordered Dynein intermediate chain." J Biol Chem **284**(48): 33115-33121.

Han, J. D., et al. (2004). "Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network." Nature **430**(6995): 88-93.

- Haraguchi, K., et al. (2000). "The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase." *Genes to Cells* **5**(11): 905-911.
- Harris, B. Z., et al. (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J Cell Sci* **114**(Pt 18): 3219-3231.
- Havecker, E. R., et al. (2005). "The Sireviruses, a plant-specific lineage of the Ty1/copia retrotransposons, interact with a family of proteins related to dynein light chain 8." *Plant Physiol* **139**(2): 857-868.
- Heierhorst, J. (2008). "Mdt1/ASCIZ: a new DNA damage response protein family." *Cell Cycle* **7**(17): 2654-2660.
- Hernaiz, B., et al. (2004). "Switching on and off the cell death cascade: African swine fever virus apoptosis regulation." *Prog Mol Subcell Biol* **36**: 57-69.
- Herzig, R. P., et al. (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.
- Hinds, M. G., et al. (2007). "Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets." *Cell Death Differ* **14**(1): 128-136.
- Hodi, Z., et al. (2006). "Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein." *Biochemistry* **45**(41): 12582-12595.
- Hodi, Z., et al. (2007). "The LC8 family of dynein light chains: Multifunctional chaperon-like proteins." *Febs Journal* **274**: 106-106.
- Hutchins, J. R., et al. (2010). "Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins." *Science* **328**(5978): 593-599.
- Jaffrey, S. R., et al. (1996). "PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase." *Science* **274**(5288): 774-777.
- Jung, Y., et al. (2008). "Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with IkappaBalpha." *J Biol Chem* **283**(35): 23863-23871.
- Jurado, S., et al. (2012). "ATM substrate Chk2-interacting Zn²⁺ finger (ASCIZ) Is a bi-functional transcriptional activator and feedback sensor in the regulation of dynein light chain (DYNLL1) expression." *J Biol Chem* **287**(5): 3156-3164.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." *Journal of Applied Crystallography* **26**(6): 795-800.
- Kaiser, F. J., et al. (2003). "Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1." *Hum Mol Genet* **12**(11): 1349-1358.
- Kardon, J. R., et al. (2009). "Regulators of the cytoplasmic dynein motor." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(12): 854-865.
- Kasanov, J., et al. (2001). "Characterizing Class I WW domains defines key specificity determinants and generates mutant domains with novel specificities." *Chem Biol* **8**(3): 231-241.
- Kiefhaber, T., et al. (2012). "Dynamics and mechanisms of coupled protein folding and binding reactions." *Curr Opin Struct Biol* **22**(1): 21-29.
- Kikuchi, Y., et al. (1981). "The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (phoA) of Escherichia coli." *Nucleic Acids Res* **9**(21): 5671-5678.
- King, S. M. (2008). "Dynein-independent functions of DYNLL1/LC8: redox state sensing and transcriptional control." *Sci Signal* **1**(47): pe51.
- King, S. M. (2012). "Dyneins: Structure, Biology and Disease."
- King, S. M., et al. (1996). "Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain." *J Biol Chem* **271**(32): 19358-19366.
- King, S. M., et al. (1995). "The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from Chlamydomonas flagella have cytoplasmic homologues." *J Biol Chem* **270**(19): 11445-11452.

- Kocsis, A., et al. (2010). "Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation." *J Immunol* **185**(7): 4169-4178.
- Koshland, D. E. (1958). "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**(2): 98-104.
- Kubota, T., et al. (2009). "Ebola virus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8." *J Virol* **83**(13): 6952-6956.
- Kunkel, T. A. (1985). "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(2): 488-492.
- Labrou, N. E. (2010). "Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution." *Curr Protein Pept Sci* **11**(1): 91-100.
- Lajoix, A. D., et al. (2004). "Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners." *Mol Divers* **8**(3): 281-290.
- Laura, R. P., et al. (2002). "The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF." *J Biol Chem* **277**(15): 12906-12914.
- Lee, C. V., et al. (2004). "Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin." *J Immunol Methods* **284**(1-2): 119-132.
- Lee, K. H., et al. (2006). "Dazl can bind to dynein motor complex and may play a role in transport of specific mRNAs." *EMBO J* **25**(18): 4263-4270.
- Lei, K., et al. (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2432-2437.
- Li, S., et al. (2004). "A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*." *Science* **303**(5657): 540-543.
- Liang, J., et al. (1999). "Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide." *Nat Struct Biol* **6**(8): 735-740.
- Lightcap, C. M., et al. (2008). "Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction." *J Biol Chem* **283**(40): 27314-27324.
- Lo, K. W., et al. (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**(9): 8172-8179.
- Lo, K. W., et al. (2001). "The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif." *J Biol Chem* **276**(17): 14059-14066.
- Lyon, R. P., et al. (2003). "Novel class of bivalent glutathione S-transferase inhibitors." *Biochemistry* **42**(35): 10418-10428.
- Maas, C., et al. (2006). "Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin." *J Cell Biol* **172**(3): 441-451.
- Makokha, M., et al. (2004). "The solution structure of the pH-induced monomer of dynein light-chain LC8 from *Drosophila*." *Protein Sci* **13**(3): 727-734.
- Martinez-Moreno, M., et al. (2003). "Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique." *FEBS Lett* **544**(1-3): 262-267.
- Meszáros, B., et al. (2007). "Molecular principles of the interactions of disordered proteins." *J Mol Biol* **372**(2): 549-561.
- Mohan, A., et al. (2006). "Analysis of molecular recognition features (MoRFs)." *J Mol Biol* **362**(5): 1043-1059.
- Naisbitt, S., et al. (2000). "Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein." *J Neurosci* **20**(12): 4524-4534.
- Nakano, H., et al. (2010). "Nucleoporin translocated promoter region (Tpr) associates with dynein complex, preventing chromosome lagging formation during mitosis." *J Biol Chem* **285**(14): 10841-10849.

Navarro-Lerida, I., et al. (2004). "Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8." *Proteomics* **4**(2): 339-346.

Navarro, C., et al. (2004). "Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate." *Nat Cell Biol* **6**(5): 427-435.

Neduva, V., et al. (2005). "Linear motifs: evolutionary interaction switches." *FEBS Lett* **579**(15): 3342-3345.

Nguyen, J. T., et al. (1998). "Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors." *Science* **282**(5396): 2088-2092.

Ninomiya, K., et al. (2005). "Subcellular localization of PMES-2 proteins regulated by their two cytoskeleton-associated domains." *Cell Mol Neurobiol* **25**(5): 899-911.

Nyarko, A., et al. (2005). "Ionization of His 55 at the dimer interface of dynein light-chain LC8 is coupled to dimer dissociation." *Biochemistry* **44**(43): 14248-14255.

Nyarko, A., et al. (2011). "Conformational dynamics promote binding diversity of dynein light chain LC8." *Biophys Chem* **159**(1): 41-47.

Nyarko, A., et al. (2004). "The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8." *Biochemistry* **43**(49): 15595-15603.

O'Connor, L., et al. (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." *EMBO J* **17**(2): 384-395.

Okamura, S. M., et al. (2006). "The exchange factor and diacylglycerol receptor RasGRP3 interacts with dynein light chain 1 through its C-terminal domain." *J Biol Chem* **281**(47): 36132-36139.

Ovadi, J., et al. (2004). "On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems." *Mol Cell Biochem* **256-257**(1-2): 5-12.

Pabbisetty, K. B., et al. (2007). "Kinetic analysis of the binding of monomeric and dimeric ephrins to Eph receptors: correlation to function in a growth cone collapse assay." *Protein Sci* **16**(3): 355-361.

Pal, G., et al. (2003). "The functional binding epitope of a high affinity variant of human growth hormone mapped by shotgun alanine-scanning mutagenesis: insights into the mechanisms responsible for improved affinity." *J Mol Biol* **332**(1): 195-204.

Pal, G., et al. (2006). "Comprehensive and quantitative mapping of energy landscapes for protein-protein interactions by rapid combinatorial scanning." *J Biol Chem* **281**(31): 22378-22385.

Pal, G., et al. (2005). "Intramolecular cooperativity in a protein binding site assessed by combinatorial shotgun scanning mutagenesis." *J Mol Biol* **347**(3): 489-494.

Pawson, T., et al. (2003). "Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains." *Science* **300**(5618): 445-452.

Petit, C., et al. (2003). "Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8." *J Cell Sci* **116**(Pt 16): 3433-3442.

Pfister, K. K., et al. (1982). "Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas flagella*." *Cell Motil* **2**(6): 525-547.

Pfister, K. K., et al. (2006). "Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families." *PLoS Genet* **2**(1): e1.

Phillis, R., et al. (1996). "Mutations in the 8 kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS." *Development* **122**(10): 2955-2963.

Puthalakath, H., et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-296.

Puthalakath, H., et al. (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." *Science* **293**(5536): 1829-1832.

Radnai, L., et al. (2010). "Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms." *J Biol Chem* **285**(49): 38649-38657.

Rapali, P., Radnai, L., Süveges, D., Harmat, V., Tölgyesi, F., Wahlgren, W.Y., Katona, G., Nyitray, L., Pál, P. (2011). "Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel interactors in the human proteome." *FEBS J*.

- Raux, H., et al. (2000). "Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain." *J Virol* **74**(21): 10212-10216.
- Rayala, S. K., et al. (2005). "Functional regulation of oestrogen receptor pathway by the dynein light chain 1." *EMBO Rep* **6**(6): 538-544.
- Rayala, S. K., et al. (2006). "Essential role of KIBRA in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells." *J Biol Chem* **281**(28): 19092-19099.
- Rickles, R. J., et al. (1995). "Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 10909-10913.
- Rigaut, G., et al. (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-1032.
- Rodriguez-Crespo, I., et al. (2001). "Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique." *FEBS Lett* **503**(2-3): 135-141.
- Rom, I., et al. (2007). "Drosophila Dynein light chain (DDL1) binds to gurken mRNA and is required for its localization." *Biochim Biophys Acta* **1773**(10): 1526-1533.
- Schmidt, J. C., et al. (2010). "Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores." *J Cell Biol* **191**(2): 269-280.
- Schneider, T. D., et al. (1990). "Sequence logos: a new way to display consensus sequences." *Nucleic Acids Res* **18**(20): 6097-6100.
- Schnorrer, F., et al. (2000). "The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of Drosophila oocytes." *Nat Cell Biol* **2**(4): 185-190.
- Schwanhauser, B., et al. (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." *Nature* **473**(7347): 337-342.
- Scott, J. D., et al. (2009). "Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart." *Science* **326**(5957): 1220-1224.
- Seet, B. T., et al. (2006). "Reading protein modifications with interaction domains." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 473-483.
- Sheng, M., et al. (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." *Annu Rev Neurosci* **24**: 1-29.
- Sidhu, S. S., et al. (2007). "Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces." *Curr Opin Struct Biol* **17**(4): 481-487.
- Sidhu, S. S., et al. (2000). "Phage display for selection of novel binding peptides." *Methods Enzymol* **328**: 333-363.
- Sidhu, S. S., et al. (2000). "High copy display of large proteins on phage for functional selections." *J Mol Biol* **296**(2): 487-495.
- Song, C., et al. (2008). "Serine 88 phosphorylation of the 8-kDa dynein light chain 1 is a molecular switch for its dimerization status and functions." *J Biol Chem* **283**(7): 4004-4013.
- Song, Y., et al. (2007). "Potential role for phosphorylation in differential regulation of the assembly of dynein light chains." *J Biol Chem* **282**(23): 17272-17279.
- Sparks, A. B., et al. (1996). "Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1540-1544.
- Stehman, S. A., et al. (2007). "NudE and NudEL are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores." *J Cell Biol* **178**(4): 583-594.
- Stelter, P., et al. (2007). "Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex." *Nat Cell Biol* **9**(7): 788-796.
- Straub, F. B. a. S., G. (1964). "O dinamiczeszkij aspektah sztrukturu" fermentov. (On the dynamic aspects of protein structure)." *Molecular Biology, Problems and Perspectives*: 182-187.
- Su, Y., et al. (2010). "Microtubule-dependent retrograde transport of bovine immunodeficiency virus." *Cell Microbiol* **12**(8): 1098-1107.

- Szente, B., et al. (2007). "When the surface tells what lies beneath: combinatorial phage-display mutagenesis reveals complex networks of surface-core interactions in the pacifastin protease inhibitor family." *J Mol Biol* **370**(1): 63-79.
- Tegha-Dunghu, J., et al. (2008). "EML3 is a nuclear microtubule-binding protein required for the correct alignment of chromosomes in metaphase." *J Cell Sci* **121**(Pt 10): 1718-1726.
- Tochio, H., et al. (1998). "Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase." *Nat Struct Biol* **5**(11): 965-969.
- Tompa, P. (2012). "Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap." *Trends Biochem Sci*.
- Tonikian, R., et al. (2007). "Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries." *Nat Protoc* **2**(6): 1368-1386.
- Tonikian, R., et al. (2008). "A specificity map for the PDZ domain family." *PLoS Biol* **6**(9): e239.
- Turnbull, W. B., et al. (2003). "On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?" *J Am Chem Soc* **125**(48): 14859-14866.
- Vacic, V., et al. (2007). "Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners." *J Proteome Res* **6**(6): 2351-2366.
- Vadlamudi, R. K., et al. (2004). "Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes." *Cancer Cell* **5**(6): 575-585.
- Vale, R. D., et al. (2000). "The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins." *Science* **288**(5463): 88-95.
- Vallee, R. B., et al. (1983). "Low molecular weight microtubule-associated proteins are light chains of microtubule-associated protein 1 (MAP 1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1342-1346.
- Varma, D., et al. "Development and application of in vivo molecular traps reveals that dynein light chain occupancy differentially affects dynein-mediated processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3493-3498.
- Varma, D., et al. (2010). "Development and application of in vivo molecular traps reveals that dynein light chain occupancy differentially affects dynein-mediated processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3493-3498.
- Wagner, W., et al. (2006). "The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the myosin's coiled-coil domain." *Biochemistry* **45**(38): 11564-11577.
- Wang, L., et al. (2004). "Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein." *Biochemistry* **43**(15): 4611-4620.
- Wang, W., et al. (2003). "Structure of the monomeric 8-kDa dynein light chain and mechanism of the domain-swapped dimer assembly." *J Biol Chem* **278**(42): 41491-41499.
- Weiss, G. A., et al. (2000). "Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8950-8954.
- Williams, J. C., et al. (2007). "Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10028-10033.
- Winzeler, E. A., et al. (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* **285**(5429): 901-906.
- Yang, P., et al. (2001). "Localization of calmodulin and dynein light chain LC8 in flagellar radial spokes." *J Cell Biol* **153**(6): 1315-1326.
- Yang, P., et al. (2009). "Novel LC8 mutations have disparate effects on the assembly and stability of flagellar complexes." *J Biol Chem* **284**(45): 31412-31421.
- Yu, J., et al. (2002). "Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors." *Brain Res Mol Brain Res* **99**(2): 145-149.
- Zavodszky, P. (1966). "Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its alteration by coenzyme binding." *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1**: 389-403.
- Zhang, W., et al. (2008). "RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells." *J Biol Chem* **283**(24): 16416-16426.
- Zhang, Y., et al. (2007). "Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain." *Protein Sci* **16**(8): 1738-1750.

Zhang, Y., et al. (2006). "Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families." J Biol Chem **281**(31): 22299-22311.