

XXXI. OTDK Biológia szekció

# **Az LC8 dinein könnyűlánc és egy sejtmagi fehérje, a MORC3 kölcshatásának vizsgálata**

Póti Ádám

II. éves Biológus MSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Nyitray László, tanszékvezető egyetemi tanár  
Rapali Péter, tudományos segédmunkatárs



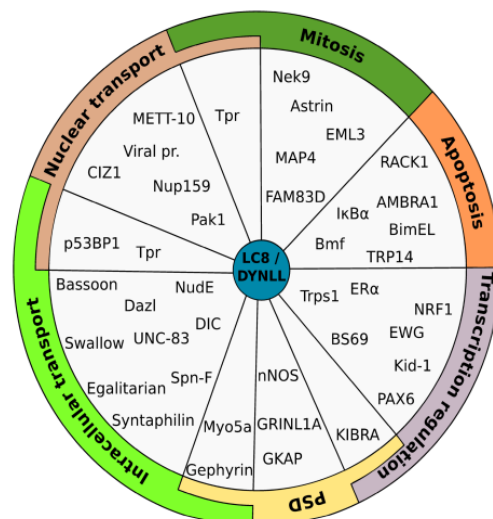
ELTE TTK Biokémiai Tanszék  
2012

# Tartalomjegyzék

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. BEVEZETÉS</b>                                                                   | <b>3</b>  |
| <b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>                                                                | <b>7</b>  |
| <b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>                                                        | <b>8</b>  |
| 3.1. DNS-KONSTRUKCIÓK                                                                 | 8         |
| 3.2. FEHÉRJÉK ÉS PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA                                                 | 9         |
| 3.3. GST <i>PULLDOWN</i>                                                              | 11        |
| 3.4. IZOTERMÁLIS TITRÁCIÓS KALORIMETRIA (ITC)                                         | 11        |
| 3.5. CÍRKULÁRIS DIKROIZMUS SPEKTROSKÓPIA                                              | 11        |
| <b>4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK</b>                                                  | <b>13</b> |
| 4.1. A MORC3 SZEKVENCIÁJÁNAK ELEMZÉSE                                                 | 13        |
| 4.2. A KÖTŐDÉS KIMUTATÁSA ÉS JELLEMZÉSE                                               | 14        |
| 4.3. A DYNLL1 KÖTÉS HATÁSÁRA A MORC3 SZERKEZETÉRE ÉS STABILITÁSÁRA                    | 16        |
| 4.4. KONKLÚZIÓ ÉS JÖVŐBELI TERVEK                                                     | 19        |
| <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>                                                            | <b>24</b> |
| <b>NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ</b> | <b>25</b> |
| <b>IRODALOM</b>                                                                       | <b>26</b> |

# 1. Bevezetés

Az LC8 dinein könnyűláncot először *Chlamydomonas* axonémális dinein motorkomplexéből izolálták (Pfister *et al*, 1982), majd hamarosan kimutatták jelenlétét a citoplazmatikus dineinkomplexben is. Később egy újabb intracelluláris transzportban szereplő motorfehérje-komplexben, a miozin 5a-ban is azonosították. Az LC8 azonban számos egyéb, a dineintől és a miozin 5a-tól független kötőpartnerrel is rendelkezik (Barbar, 2008; Rapali *et al*, 2010), amelyek igen változatos sejtelettani folyamatokban vesznek részt. Ezek közé tartozik a pro-apoptotikus Bmf (Puthalakath *et al*, 2001) és Bim (Puthalakath *et al*, 1999) fehérjék, a DNS hibajavításban szereplő P53BP1 (Lo *et al*, 2005), vagy a poszt-szinaptikus denzitás fehérjei, a GKAP (Naisbitt *et al*, 2000) vagy az nNOS (Rodriguez-Crespo *et al*, 2001) (1. ábra).

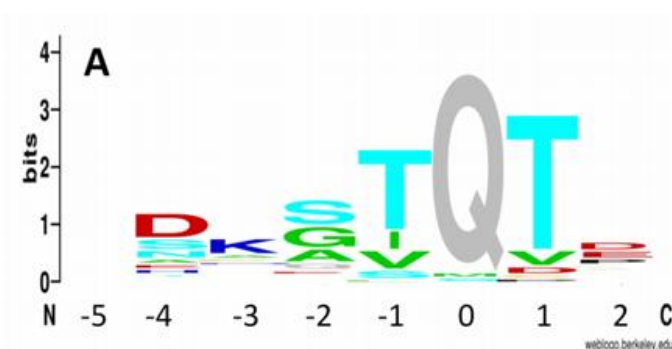


1. ábra. Az LC8 kötőpartnereinek fontosabb csoportjai. Forrás: (Rapali *et al*, 2010)

Az LC8 egy eukariótákban általánosan meglévő, konzervált csomóponti fehérje, a *C. elegans* és a humán ortológok mindössze négy aminosavban térnek el. Emberben két paralógja ismert (DYNLL1 és DYNLL2), melyek egyaránt 89 aminosav hosszúságúak és mindössze hat aminosavban különböznek. A paralógok funkcionális különbségeiről és partnerspecifitásáról a szakirodalomban ellentmondó adatok találhatóak. A szerkezeti és szekvenciális hasonlóság ellenére tapasztaltak *in vivo* partnerspecifitást, a DYNLL1-et a dinein komplexszel, a DYNLL2-t miozin 5a-val izolálták együtt (Day *et al*, 2004). *In vitro* kísérletek alapján azonban a paralógok közötti különbségek a kötőárok "működését" jelentősen nem befolyásolják (Radnai *et al*, 2010).

Röntgenszórásos és NMR-kísérletek alapján az LC8 szerkezetét mind apo-formában, mind ismert interakciós partnerekből származó peptideket kötve meghatározták (Fan *et al*, 2001). Ezek alapján az LC8 funkcionális egysége homodimer. A dimerizációért két olyan antiparallel  $\beta$ -lemez felelős, melyek négy  $\beta$ -láncot az egyik tagból, míg egy ötödiket a másiktól

tartalmazzak. A kötőpartnerek mindegyike eddig a két LC8 molekula között kialakuló dimerizációs felszínen elhelyezkedő szimmetrikus árkokba fekszik bele.



2. ábra. Néhány régóta ismert LC8-kötőpeptid konszenzusszekvenciájának WebLogo-ábrája (Rapali *et al*, 2011). Ebben az ábrázolásban egy adott pozícióban annál nagyobb bit-értéket kapunk, minél konzerváltabb, az egyes aminosavak mérete pedig az adott aminosav gyakoriságát mutatja a kérdéses pozícióban (Crooks *et al*, 2004).

(T/V/I)-Q-(T/V)-(D/E). A lineáris kötőmotívumok esetében gyakran csak néhány aminosav bír kulcsfontossággal a kötés stabilitásában, míg a többiek inkább a kötés finomhangolásában vesznek részt. Az LC8 esetében a kötőmotívumának legkonzerváltabb pozíciójában található glutamin és az öt határoló treoninok, illetve valinok és izoleucinok (T/V/I-Q-T/V) alkotják ezt a jellemző központi csoportot.

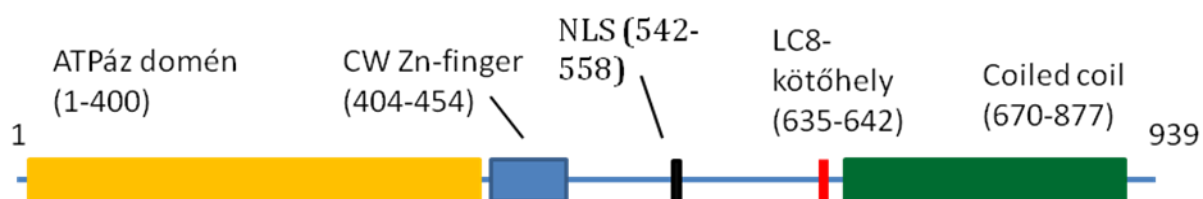
Az LC8 funkciójának eleinte a dinein illetve a miozin 5a kargókötését tartották, újabban azonban általánosabb, stabilizáló szerepet tulajdonítanak neki. A kötőpeptid közelében sok esetben *coiled-coil* vagy más dimerizációs domén is található. Wang és munkatársai kimutatták, hogy a *D. melanogaster* embrionális fejlődésében kulcsfontosságú Swallow fehérje kötődik az LC8 *Drosophila* ortológjához (Wang *et al*, 2004). Ez a kötődés részben megvédi a gyengén dimerizálódó Swallow-t a limitált proteolízistól és a hőmérsékletnövekedés hatására történő disszociációtól. A miozin 5a esetében is megfigyeltek hasonló jelenséget, a miozinak a kötődés hatására megnövekedő hélixtartalmán keresztül (Hodi *et al*, 2006; Wagner *et al*, 2006).

A közelmúltban az LC8 kötőmotívumának *in vitro* irányított evolúció, fág-bemutató általi átfogó jellemzése alapján kutatócsoportunkban számos új humán kötőpartner előrejelzése történt (Rapali *et al*, 2011). A legvalószínűbb lehetséges LC8 partnerek közé tartozik a MORC3 fehérje. Az LC8-MORC3 kölcsönhatás lehetőségét egy másik nagy

A kötőpartnerek egy rövid lineáris motívumon keresztül kötődnek az LC8-hoz, ami a legtöbb esetben a fehérjék rendezetlen régióiban helyezkedik el. A lineáris motívumok kötődés hatására rendezett,  $\beta$ -láncszerű szerkezetet vesznek fel, ezek alapján a  $\beta$ -MoRF lineáris motívumok családjába sorolhatóak. Az irodalomban leírt kötőpartnerek esetében a kötőpeptid konszenzusszekvenciája (D/S)-K-X-

átersztőkéességű módszert, ko-immunprecipitációt alkalmazó vizsgálat is megerősítette (Hutchins *et al*, 2010).

A MORC3 (régebbi nevén NXP-2) egy 107 kDa méretű, 939 aminosavól álló sejtmagi fehérje (Kimura *et al*, 2002) (**3. ábra**). A MORC családnak emberben négy tagja van (MORC1, 2, 3 és 4). Ezek egymással viszonylag gyenge homológiát mutatnak, egyedül a fehérjék amino-terminálisán lévő doménben található nagyfokú hasonlóság. A MORC3 génjének kiütése egérben letalitást okoz: az állatok születésük után néhány nappal elpusztulnak, bár különösebb fenotípusos elváltozást nem mutattak (Takahashi *et al*, 2007).

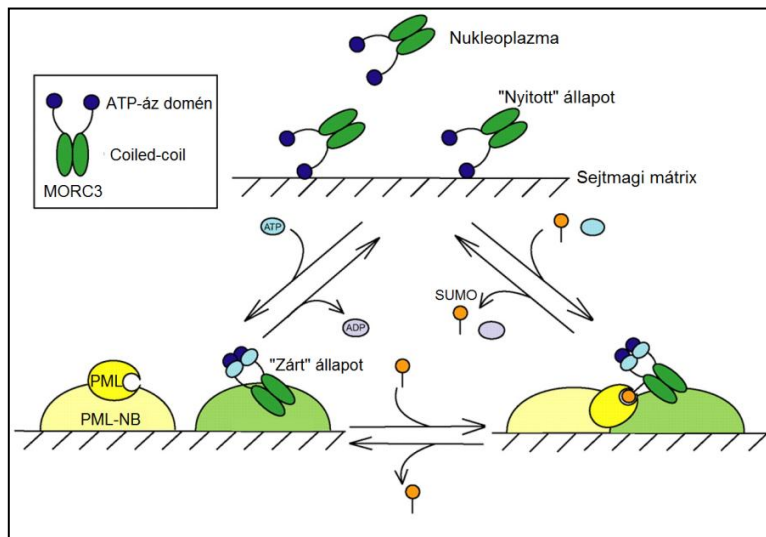


**3. ábra. A MORC3 fontosabb doménjeinek és motívumainak vázlata.**

A MORC3 amino-terminálisán található meg a fehérjecsaládra jellemző GHL-ATPáz domén, melynek aktivitása a fehérje szerkezetének változásán keresztül annak dimerizációs állapotát befolyásolja. A MORC3 rendelkezik még egy CW-típusú cink-ujj doménnel (404-454) – melyről kimutatták, hogy kötődik a 9. lizinjén háromszorosan metilált H3 hisztonhoz (Li *et al*, 2012) –, egy nukleáris lokalizációs szignállal (542-558), illetve a karboxil-terminálison egy szegmentált, de kiterjedt *coiled-coil* régióval (670-877).

Az előrejelzett LC8-kötőhely ehhez a *coiled-coil* régióhoz képest az N-terminális irányában, a 635. oldallánctól kezdve található, szekvenciája (N-T-A-A-T-Q-T-E). A fehérje szekvenciájában továbbá öt szumoilációs motívum is található ( $\psi$ -K-x-E/D, ahol  $\psi$  nagyméretű hidrofób aminosavat jelöl). Mindegyik esetében kísérletesen is bizonyították a SUMO (*small ubiquitin-like modifier protein*) konjugációját (szumoilációt) (Mimura *et al*, 2010). A szumoiláció nagy valószínűséggel a MORC3 PML-NB (*Promyelotic Leukemia Nuclear Bodies* - PML-NB) sejtmagi szubdoménekbe való „toborzásában” játszik szerepet. A PML-NB alapvető építőeleme a PML fehérje, és különféle nukleáris fehérjék szekvesztrálásában valamint működésük szabályozásában vesz részt (Bernardi and Pandolfi, 2007).

Takahashi és munkatársai többek között kimutatták, hogy a MORC3-nak szerepe van a sejtek szeneszcenciájában kulcsszerepet játszó p53-nak a PML-NB-kba való irányításában és a p53



**4. ábra.** A MORC3 feltételezett szerepének modellje a PML-NB-k kialakulásában. A dimer MORC3 ATP hidrolízis hatására olyan szerkezetváltozáson megy keresztül, aminek hatására önálló sejtmagi testeket alkot. A PML-NB-kkel való kapcsolat a MORC3 szumoilációja után alakul ki, a PML fehérje SUMO-felismerő motívumán keresztül. Forrás: (Mimura et al, 2010)

amino-terminálison elhelyezkedő GHL-ATPáz domén is dimerizálódik. Ezáltal önálló sejtmagi kompartmenteket (NB - *nuclear bodies*) alakít ki, melyekről valószínűsíthető, hogy a CW-doménon keresztül kapcsolódnak a kromatinállományhoz. Ezek a PML-NB-ktől független MORC3 kompartmentek eddig ismeretlen funkciójúak. A MORC3 és a PML kolokalizációja előbbi szumoilációja után valósul meg. A nem kovalens kapcsolat a MORC3-hoz konjugált SUMO és a PML SUMO-felismerő motívuma (SUMO Interacting Motif – SIM) között alakul ki. Ezt a mechanizmust gyakran említik a PML-NB-k összeszerelődésének és más fehérjék ezekhez való kötődésének általános sémájaként (Shen et al, 2006).

A MORC családba tartozó fehérjék funkciója egyelőre nem tisztázott. A MORC3 megtalálható több olyan proteomikai vizsgálatban, melyek a sejtekben különböző stressz hatására történő a szumoilációs mintázat megváltozását tanulmányozták (Golebiowski et al, 2009; Yang et al, 2012). Rosendorff és munkatársainak eredményei szerint a MORC3 képes represszálni a riporterfehérjeként használt GFP termelődését, ha Gal4-gyel fuzionáltatva kötődött annak promóteréhez (Rosendorff et al, 2006). Moissiard és munkatársai *Arabidopsis thalianában* egy reverz genetikai screen segítségével mutatták ki, hogy a humán MORC fehérjék e növényben található ortológjai szerepet játszanak a kromatin szerkezetének szabályzásában és bizonyos gének, elsősorban transzpozázibilis elemek transzkripciójának gátlásában (Moissiard et al, 2012).

ilyen módon történő aktivációjában (Takahashi et al, 2007). Kimutatták, hogy a p53 aktivációja ATP-függő módon a MORC3 ATP-áz aktivitásával összefüggésben valósul meg. Mimura és munkatársainak modellje a MORC3 működéséről alkotott eddigi legátfogóbb elképzelés (Mimura et al, 2010) **(4. ábra)**.

Eszerint a MORC3 fehérje kezdetben csupán *coiled-coil* régióján keresztül dimerizált.

ATP-hidrolízis hatására az

## 2. Célkitűzések

1. A MORC3 és a DYNLL1 kötődésének igazolása GST *pulldown* kísérlettel.
2. A komplexképződés termodinamikai paramétereinek meghatározása izotermális titrációs kalorimetria segítségével.
3. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia használatával az LC8 kötődésének a MORC3-dimerek szerkezetére és stabilizációjára kifejtett hatásának vizsgálata.
4. Jövőbeni célom a kapcsolat létét emlős sejtvonalakban ko-immunprecipitációval is kimutatni. Terveim között szerepel továbbá, hogy LC8 kötőhelyet nem tartalmazó, mutáns MORC3 használatával feltárom a MORC3 és az LC8 kapcsolatának biológiai szerepét. Ezek a kísérletek jelenleg is folyamatban vannak, ezért csak dolgozatom végén mutatom be röviden a rájuk vonatkozó elképzeléseket.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. DNS-konstrukciók

A humán MORC3 gén (Uniprot ID: Q14149) teljes szekvenciáját tartalmazó pET16b konstrukciót Norimicu Inouétól származik (Mimura *et al.*). Három konstrukciót terveztem: a MORC3(1-939) az egész fehérjét, a MORC3 (634-939) a *coiled-coil* régiót illetve az ettől amino-terminális irányban elhelyezkedő feltételezett LC8-kötőhelyet tartalmazta, míg a MORC3 (634-643) csak a szűken vett kötőpeptid volt. A kapott plazmidból a MORC3 (634-939) fragmentet az (5'-AAAGGATCCGGGAAATACTGCAGCTACC-3') 5'- illetve az (5'-TTTCTCGAGTTATTAAGTACTACTGATTTCACTCATTTG-3') 3'-primer segítségével PCR-rel amplifikáltam. A MORC3 (1-939) esetében a 3' primer ugyanez volt, míg az 5' szekvenciája (5'- AAAGGATCCGATGGCGGCGCAGCCAC-3'). Az 5'-primerek túlnyúló régiójában *Bam*HI, míg a 3'-primerekében *Xho*I hasítóhely helyezkedett el. A célvektor egy módosított pET19 alapú plazmid volt, amely az inszerttől N-terminális irányban egy 6xHis-címkét, illetve a kettő között az eredeti trombin proteáz-felismerőhely helyett egy TEV-proteáz felismerőhelyet tartalmazott.

Az inszerteket és a célvektort *Bam*HI és kétszeres mennyiségű *Xho*I restrikciós enzimmal (Fermentas), 10x Green pufferben (Fermentas) emésztettem 37 °C-on egy éjszakán át. Az emésztett DNS molekulákat ezután 1 %-os agaróz gélben futtattam, majd DNS-tisztító kittel tisztítottam (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Bio Basic Inc.). A megtisztított DNS-szakaszokat T4 DNS ligáz enzimmal (Fermentas) ligáltam 10x T4 DNS ligáz pufferben (Fermentas) 1 óráig szobahőmérsékleten. A ligátumokat *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltam, majd a sejteket 100 mg/ml ampicillint tartalmazó lemezekre szélesztettem, és egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem. A plazmidok sikeres felvételének ellenőrzéséhez öt telepet 3 ml LB tápoldatban (12 g/l tripton, 5 g/l szárított élesztő, 10 g/l NaCl, pH 7,5) rázattam egy éjszakán át, majd plazmid izoláló kittel tisztítottam. A telepeket *Bam*HI és *Xho*I restrikciós enzimekkel emésztve ellenőriztem. Az inszerteket tartalmazó plazmidokból az inszert hosszával megegyező méretű DNS darab esik ki, melyet 1 %-os agaróz gélen megfuttatva azonosítottam. A pozitívnak bizonyult klónok szekvenciáit végül Sanger-féle automata szekvenálás révén ellenőriztem.

A MORC3 (634-643) LC8-kötőmotívumát kódoló DNS klónozásához olyan egymással átfedő oligonukleotidokat (5'-GATCCAACACCGCGGCCACACAGACCGAATAAG-3' illetve 5'-GATCCTTATTCGGTCTGTGTGGCCGCGGTGTTG-3') alkalmaztam, melyek anellálódva már kódolják a megfelelő peptidet kódoló DNS szekvenciát. Az át nem fedő szakaszaikon *Bam*HI hasítóhelyek 5' túlnyúló végei helyezkednek el. Az oligonukleotidokat először öt percig 95°C-on denaturáltam, majd újabb öt percig szobahőmérsékleten hagytam anellálódni. A célvektor ezúttal az inszerttől N-terminális irányban TEV-proteáz hasítóhelyet és a glutation-S-transzferáz (GST) génjét hordozta. Ezt *Bam*HI (Fermentas) endonukleázzal hasítottam 10x *Bam*HI-pufferben (Fermentas), majd a tisztított és hasított célvektort illetve a már túlnyúló végeket tartalmazó MORC3 (634-643) oligonukleotidokat T4 DNS ligázzal (Fermentas) kezeltem 10x T4 ligáz pufferben (Fermentas).

A sejteket *Escherichia coli* DH5α sejtekbe transzformáltam, majd ampicillines agarlemezre szélesztettem ki őket egy éjszakára. Másnap a kinőtt telepek közül néhányat PCR segítségével ellenőriztem. A 3'-primer a más ismertetett oligonukleotidok közül került ki, az 5'-primer pedig a T7 promoterre tapadt. A pozitív eredményt adó telepekről plazmid izolálás után Sanger-féle automata szekvenálás segítségével állapítottam meg a klónozás helyességét.

### 3.2. Fehérjék és peptidek előállítása

A kísérletekben a DYNLL1 LC8-paralógot használtam. Ennek pET15 alapú vektorba klónozása már korábban megtörtént. Előállításánál a plazmidot *Escherichia coli* BL21Star (DE3) (Invitrogen) sejtekbe transzformáltam, majd a sejteket LB-tápoldatban 4,1 MacFarlane-egységnyi optikai denzitásig növesztettem. Az indukáláshoz 0,5 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidot (IPTG) használtam, ezután az expresszió 3 órán keresztül 37 °C-on, 100x rpm rázatás mellett történt. A fehérje feltárása és tisztítása a MORC3 (634-939) fragmensnél használt lépésekkel egyezik meg.

A MORC3 különböző fragmentjeinek előállításához *Escherichia coli* BL21Star (DE3) (Invitrogen) sejteket használtam. A MORC3 (1-939)-t többszöri próbálkozás sem sikerült ebben a bakteriális rendszerben előállítani, emiatt a kísérleteket a MORC3 (634-939) és a MORC3 (634-643) fragmentekkel végeztem el. Termelésükhöz először az elkészült, szekvenálással igazolt és tisztított plazmidokat transzformáltam a fenti sejtvonalba, majd 100 mg/ml ampicillint tartalmazó lemezekben egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem a szélesztett sejteket. Egy telepet először 3 ml-nyi 100 mg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatba, majd

egy nappal később ebből a starterkultúrából 1 l, 100 mg/ml ampicillint tartalmazó LB-oldatba oltottam le. A sejteket először 37 °C-on, 200x rpm-mel való rázatás mellett megfelelő optikai denzitásig növesztettem (MORC3 (634-643) esetében 4,8, MORC3 (634-939) esetében 5,1 MacFarlane-egységig). 0,5 mM IPTG-vel indukáltam a sejteket, majd 12 órán át 18 °C-on, 100x rpm rázatás mellett történt az expresszió.

A kétféle fúziós fehérje kezelése innen az eltérő címkék miatt elválik. 10 perces, 6000x rpm-mel történő centrifugálás után a MORC3 (634-643) peptidet 30 ml 7,4-es pH-jú PBS pufferben, a MORC3 (634-939) fragmenst pedig natív feltárási pufferben (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM Na-azid, pH 8) szuszpendáltam fel, mindkét puffer tartalmazott még 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF) is. A sejtek feltárása ezután lizozim hozzáadásával, fagyasztással és szonikálással történt. Itt érdemes megemlíteni, hogy a MORC3 (634-939) fragmens összesen 9 cisztein-oldalláncot tartalmaz, emiatt már az előző lépéstől kezdve minden puffer és oldat 3 mM  $\beta$ -merkaptotetanolt tartalmazott.

A sejtörmelék elválasztása centrifugálással történt (4 °C, 20000x rpm). A MORC3 (634-939) fragmenst Ni-affinitáskromatográfiával, míg a MORC3 (634-643) peptidet glutationnal immobilizált Sepharose oszloptölteten tisztítottam. A 6xHis és GST címkéket TEV-proteázzal távolítottam el. A MORC3 (634-939) fragmentumot anioncserés kromatográfia (AKTÄ rendszer, HiTrapQ anioncserélő oszlop) során tisztítottam tovább. Ehhez a fehérjét 20 mM HEPES, 20 mM NaCl és 3 mM  $\beta$ -merkaptotanol alkotta, 7,5-ös pH-jú pufferbe dializáltam át, majd légtelenítés után felvittem az anioncserélő oszlopra. A gradiens 1M NaCl-ot tartalmazó oldat 1%/perces hozzáadásával alakult ki, a fehérje elúcióját 280 nm-en mért elnyelése alapján kísértem figyelemmel. A MORC3 (634-643) peptid esetében az emésztett GST-t forralással távolítottam el, majd reverz fázisú HPLC-vel tisztítottam tovább. Ehhez a peptidet Jupiter C18 oszlopra (Phenomenex) vittem fel, majd egyre növekvő arányú acetonitril-víz eleggyel történt az elúció, 1% trifluorecetsav (TFA) jelenlétében.

Az egyes tisztítási lépések között a termékünk tisztaságát denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézissel ellenőriztem, melynél 17,5% poliakrilamid-tartalmú, tricin pufferrel készült géleket használtam. A tisztítási lépések után a MORC3 (634-939) polipeptid koncentrációját 280 nm-en mért elnyelése alapján állapítottam meg. A MORC3 (634-643) mellől az acetonitril-víz elegyet liofilizálással távolítottam el, majd analitikai mérlegen lemértem a peptid tömegét. Ezután a polipeptidek -80 °C-ra kerültek tárolásra.

### **3.3. GST pull-down**

A módszer fehérje-fehérje kölcsönhatások kvalitatív kimutatására alkalmas. Lényege, hogy egy GST-fúzió keresztül glutation tartalmú affinitás-kromatográfiás oszloptöltetbe kötött fehérje kötőpartnerei szintén fennragadnak az oszlopon. A komplex tagjai denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézissel mutathatóak ki.

Két Eppendorf-cső aljára 30-30 µl glutationos oszloptöltetet (Glutathione Sepharose 4B, Pharmacia Biotech) mértem ki. Ezt kétszer 100 µl 3 mM-os β-merkaptóetanollal kiegészített HBS pufferrel (10mM HEPES, 150 mM NaCl, pH = 7,4) mostam, majd az egyik csőbe 100 µl GST-DYNLL1 fúziós fehérjét mértem. A kontroll esetében ugyanennyi GST-t használtam. 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat HBS pufferrel mostam, majd 100 µl MORC3 (634-939)-at adtam hozzá. Végül ismételt mosás után 30 µl SDS-kezelőt adtam az elegyhez. Forralás után denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel futtattam meg a mintákat.

### **3.4. Izotermális titrációs kalorimetria (ITC)**

A módszer a különböző molekulák kötődésekor bekövetkező hőváltozások mérését teszi lehetővé. Amennyiben az egyik fehérjét a másikkal titráljuk, a felszabaduló hőmennyiségek alapján az adott kölcsönhatás összes termodinamikai paramétere meghatározható. A méréshez a megtermelt DYNLL1-et 1 mM TCEP-vel kiegészített HBS pufferbe dializáltam. A liofilizált MORC3 (634-643) peptidet a DYNLL1 dialíziséhez használt pufferben oldottam fel. A mérést ITC-200 készüléken végeztem el (MicroCal), 26 °C-on. A cellában ~300 µl-nyi, 90 µM-os DYNLL1-oldat volt, ehhez injektáltam 35-ször 1 µl-nyi, 1,59 mM-os MORC3 (634-643) peptidet. Az egyes belövések 350 másodpercenként követték egymást. Az adatok kiértékelése Origin 8.0 szoftverrel (Microcal) történt, egy kötőhelyes,  $A+B \leftrightarrow AB$  formájú modell alapján.

### **3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia**

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia használatával az oldatban lévő makromolekulák szerkezeti elemeire következtethetünk. Az oldatot cirkulárisan polarizált fénnel megvilágítva a kapott spektrum „távoli” UV (260 nm alatt) esetében a makromolekulában jelenlévő

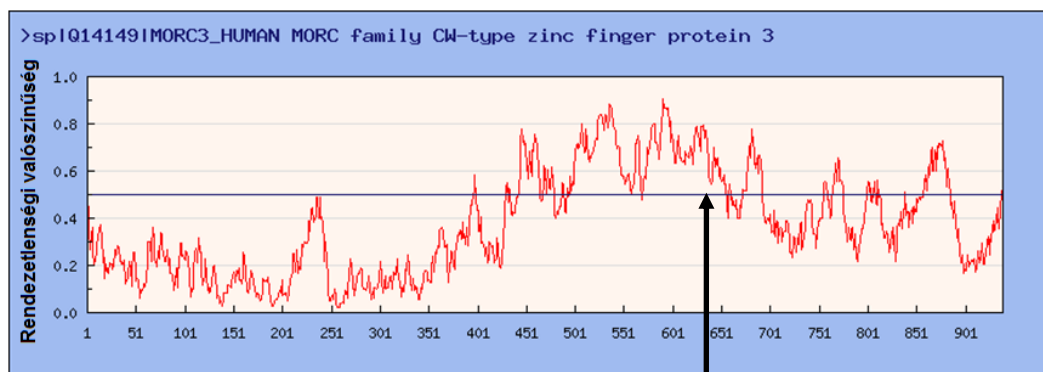
másodlagos szerkezeti elemek aránya mutatható ki, míg „közeli” UV (kb. 260-320 nm) esetén az egyes fehérjemolekulák harmadlagos következtethetünk.

A mérésekhez Jasco J-820 CD spektrofotométert használtam. A spektrumokat 190 és 260 nm között 0,2 nm-enként vettem fel, 25 °C-on. Minden mérést ötször ismételtünk meg, 50 nm/perces szkennelési sebességgel és 8 másodperces válaszüddével. A MORC3 (634-939)-et és a DYNLL1-et 10 mM NaCl-ot és 0,5 mM ditiotreitolt (DTT) tartalmazó 10 mM Tris-HCl (pH=7,5) pufferbe dializáltam.

## 4. Eredmények és megvitatásuk

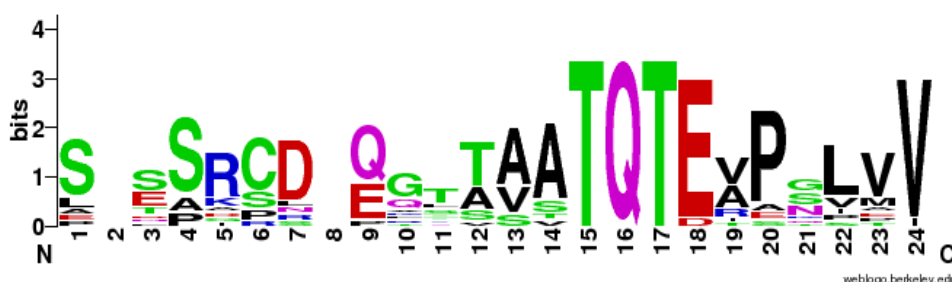
### 4.1. A MORC3 szekvenciájának elemzése

Az LC8-kötőpeptidek lineáris motívumai az eddig vizsgált esetek nagy részében rendezetlen régiókban helyezkednek el, ezért megvizsgáltam, hogy így van-e ez a MORC3 esetében is. A MORC3 szekvenciáját IUPred programmal elemeztem (5. ábra). Az IUPred program fehérjék rendezetlenségének szekvencia alapú jóslására alkalmas (Dosztanyi *et al*, 2005). Rendezetlennek akkor jóslott egy régió, ha 0,5 értéknél magasabb pontszámot kap.



5. ábra. A MORC3 rendezetlenségre való hajlama az IUPred predikciója szerint. Azok a szakaszok tekinthetők rendezetlennek, ahol ennek valószínűsége 0,5 fölötti. A fekete nyíl az LC8-kötőhely körülbelüli helyét jelöli. Ez alapján a kötőhely szerkezet nélkül régióban fekszik.

Ezek alapján jól láthatóan a polipeptid körülbelül 450-700 aminosavak közti szakaszán a legmagasabb a rendezetlenség valószínűsége, összességében pedig az algoritmus a fehérje mintegy 30%-át jóslja szerkezet nélkülinek. Ez a cink-ujj domén és a prediktált *coiled-coil* közötti régiót jelenti, amely tartalmazza az LC8-kötőhelyet is (a 635. aminosavtól). Ezek alapján tehát a prediktált kötőmotívumot tartalmazó molekularészlet nagy valószínűséggel



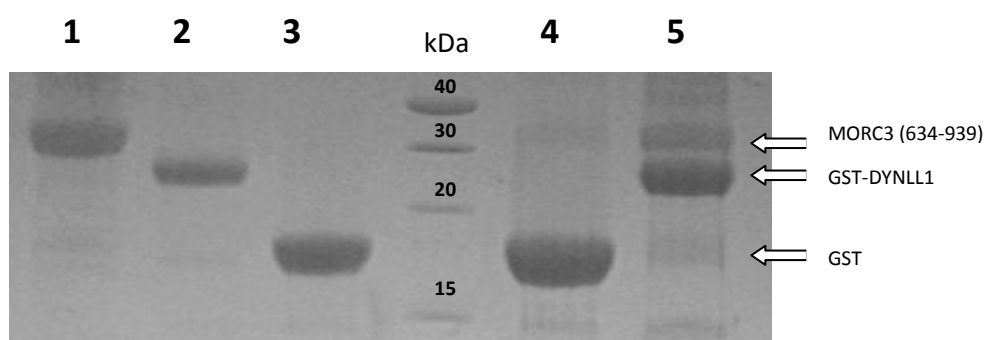
6. ábra. A különböző fajokból származó MORC3 ortológok LC8-kötő régiójának közvetlen környezetét bemutató WebLogo ábra. Az LC8-kötőszekvenciákra igen jellemző TQT-motívum kiugróan konzervált a régióban. A felhasznált szekvenciák Uniprot-kódjai: Q14149; Q4QQR6; F1PFJ7; F6VFG8; D3ZL03; G3VRD8; G1LG18; F6QPL7; G1NNX8; F1P2D9; G3SM67; G1PKY0; H3AL31; G1KML7; I3KG83

szerkezet nélküli, hasonlóan az LC8 számos más, már ismert kötőpartneréhez.

A WebLogo program segítségével megvizsgáltam a gerincesek különböző fajaiból származó MORC3 ortológok LC8-kötőhellyel szomszédos régióinak konzerváltságát (**6. ábra**). Megállapítható, hogy az LC8-kötőhelyekre igen jellemző (T-Q-T) motívum messze a legkonzerváltabb a régióban. A határoló régiók ezzel szemben nagyfokú változékonyságot mutatnak, ami valószínűleg a molekuláris rendezetlenségnek tudható be. Ez, bár nem jelent biztosat, mindenesetre azt valószínűsíti, hogy a konzervált részlet fiziológiásan is fontos funkcióval bír.

## 4.2. A kötődés kimutatása és jellemzése

A MORC3 és az LC8 közvetlen kapcsolatának kísérletes igazolásához a két humán fehérjét heterológ expressziós rendszerben (*E. coli*) túltermeltettem és tisztítottam. Minden kísérletben az LC8 DYNLL1 paralógját használtam. A MORC3 esetében a teljes fehérje termeltetése eredménytelen volt, ezért a további kísérlethez a karboxil-terminális *coiled-coil*-t és a kötőmotívumot tartalmazó MORC3 (634-939) fragmenst használtam. A GST *pulldown* kísérlet során a csali fehérje az amino-terminálisán GST címkét tartalmazó DYNLL1, míg a préda a MORC3 (634-939) fragmens volt.

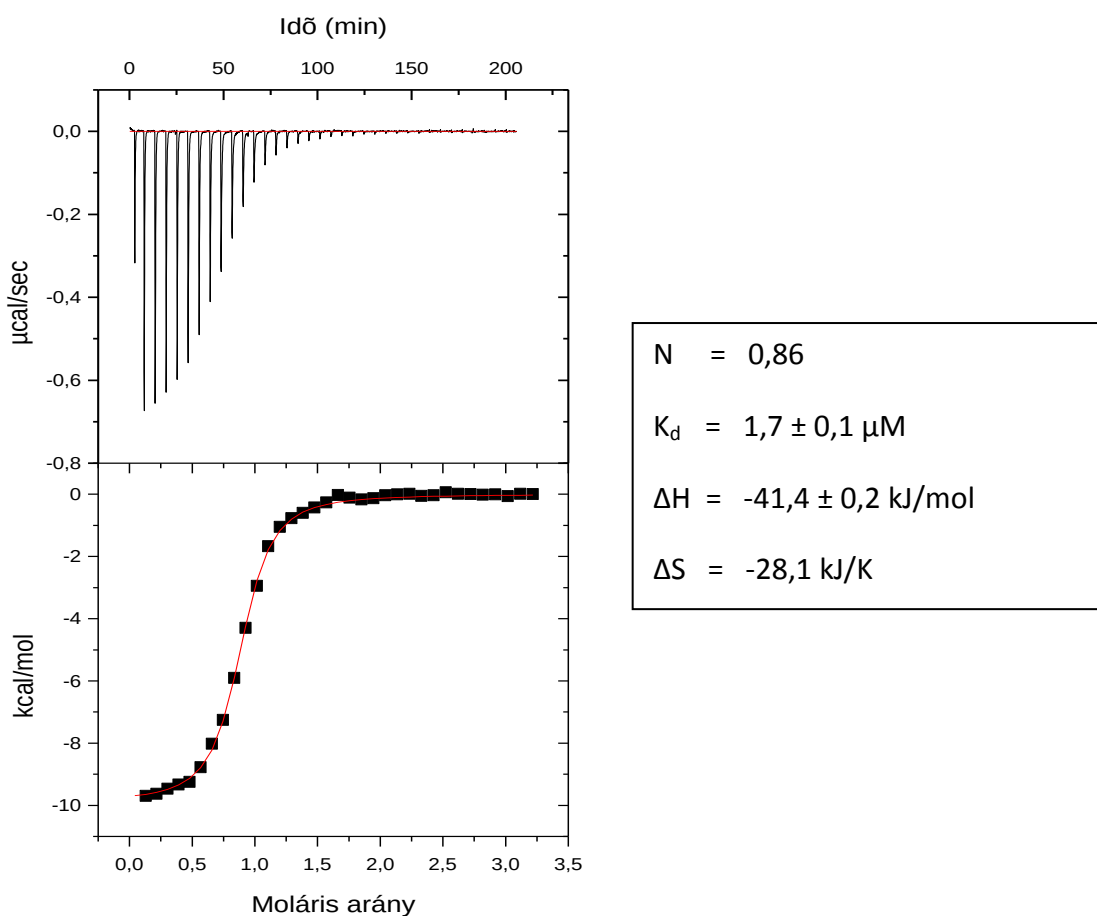


**7. ábra.** A MORC3 (634-939) és a GST-DYNLL1 közötti *pulldown* eredményét bemutató agarózgél. Az egyes zsebek tartalma: 1. MORC3 (634-939); 2. GST-DYNLL1; 3. GST; 4. GST + MORC3 (634-939); 5. GST-DYNLL1 + MORC3 (634-939). A MORC3 (634-939)-et jelző sáv csak akkor látható, ha a csali GST-DYNLL1-et is tartalmaz.

A MORC3 (634-939) méretének (34,6 kD) megfelelően futott a gélen (**7. ábra**). Jól látható, hogy az 5. oszlopnak megfelelő zsebben megjelenik a MORC3 (634-939) méretével megegyező molekulatömeget jelző sáv, míg a kontrollnál ez nem figyelhető meg. Ezzel kizárhatjuk, hogy a GST önmagában is kötné a MORC3 (634-939) fragmenst, tehát

elfogadhatjuk, hogy az extra sáv megjelenése a DYNLL1 és a MORC3 (634-939) közötti specifikus interakciónak tulajdonítható.

A DYNLL1 és a MORC3 (634-643) peptid komplexképzésének kvantitatív jellemzéséhez izotermális titrációs kalorimetriát alkalmaztam (**8. ábra**). A kísérlet alapján a két fehérje közti kölcsönhatás egyértelműen igazolható. A kötés sztöchiometriája várakozásainknak megfelelően 1:1-hez közeli érték, vagyis a dimer DYNLL1 mindkét árkába bekötődik egy-egy peptid.



**8. ábra.** DYNLL1 izotermális kalorimetriás titrálásának képe MORC3 (634-643) peptiddel, illetve a kötés modellezett sztöchiometriája, affinitása, szabadentalpia illetve entrópiaváltozása

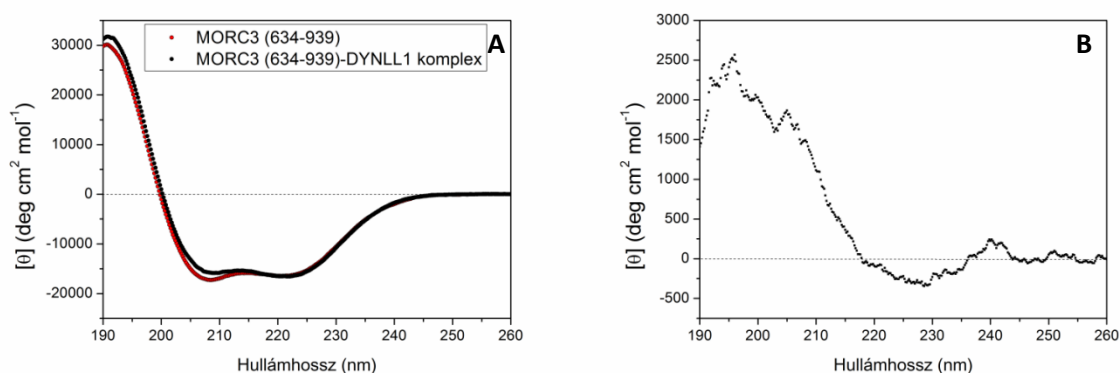
A disszociációs állandó  $1,7 \mu\text{M}$ , azaz a már ismert kötőpartnerek tartományába esik. A kötődés entalpikusan kedvező ( $\Delta H = -41,4 \text{ kJ/mol}$ ), entrópiusan kedvezőtlen ( $\Delta S = -28,1 \text{ kJ/K}$ ). Ez jó egyezést mutat a kötőszekvenciájukban (T-Q-T) motívumot tartalmazó interakciós partnereknél tapasztaltakkal (Radnai *et al*, 2010). Ezek esetében viszonylag magas szabadentalpia-változást és enyhén kedvezőtlen entrópius tagot találunk.

Ezzel szemben az (I-Q-V) vagy (V-Q-V) motívumot tartalmazó peptidek alacsonyabb szabadentalpia-változással, de pozitív entrópiával kötődnek.

### 4.3. A DYNLL1 kötés hatására a MORC3 szerkezetére és stabilitására

Az LC8 kötődése kétféleképpen változtathatja a hozzá közeli *coiled-coil* stabilitását. Egyrészt olyan konformációváltozást indukálhat a kötőhelyet is magában foglaló rendezetlen régióban, amely az  $\alpha$ -hélixek kiterjedésének növekedését idézi elő: ilyenre láthatunk példát a miozin 5a esetében is. Másrészt elképzelhető a stabilitás növekedése a hélixtartalom változatlansága mellett is, hiszen a dimerek összetartását nem feltétlenül csak a *coiled-coil* okozza.

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával távoli UV tartományában felvett spektrum alkalmas a másodlagos szerkezeti elemek arányainak nyomon követésére (Kelly *et al*, 2005). Az egyes másodlagos szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix, különféle  $\beta$ -lemezek, rendezetlen régiók) jellegzetes spektrummal rendelkeznek. Ezek az egyedi spektrumok az adott szerkezetnek a teljes fehérjében vett arányával súlyozva összeadódnak, így adva ki a teljes spektrumot. Ezáltal meghatározható a másodlagos elemek egész fehérjére jellemző százalékos megoszlása. Mivel az már korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a DYNLL1 szerkezete csak igen kis mértékben változik meg más fehérjével való kapcsolódás hatására, ezért a komplex spektrumából levonva a DYNLL1-ét megkaphatjuk a MORC3 (634-939) spektrumának esetleges változását (9/A. ábra).



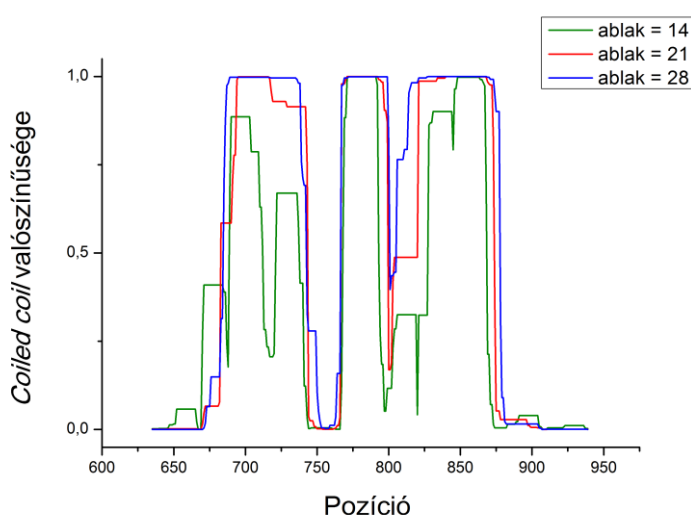
9. ábra. (A) A MORC3 (634-939) két állapotának spektruma. Piros: önállóan; fekete: DYNLL1-MORC3 komplex, előbbi spektrumának levonása után. (B) A MORC3 (634-939) szabad és kötött állapotában felvett spektrumának különbsége.

A 9/A. ábra görbéin jól felismerhető az  $\alpha$ -hélixekre jellemző kettős minimum (208 és 222 nm-nél), ami ennek a másodlagos szerkezeti elemnek a viszonylag nagy arányát jelzi. Azonban a két görbe nagyfokú hasonlóságot mutat. A Kardos József és Micsonai András által fejlesztett BestSel algoritmussal (<http://bestsel.elte.hu>; publikálás alatt) határoztam meg a másodlagos szerkezeti elemek arányát a két esetben (**1. táblázat**).

|                                  | H 1  | H 2  | AP 1 | AP 2 | AP 3 | P    | $\beta$ -kanyar | Egyéb |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----------------|-------|
| MORC3 (634-939)                  | 25,9 | 9,9  | 1    | 2,9  | 7,7  | 3,0  | 11,0            | 38,8  |
| MORC3 (634-939) - DYNLL1 komplex | 24,4 | 8,6  | 2,2  | 6,7  | 7,0  | 3,3  | 9,3             | 38,4  |
| különbség                        | -1,5 | -1,3 | +1,2 | +4,8 | -0,7 | +0,3 | -1,7            | -0,4  |

**1. táblázat.** A BestSel algoritmus által a spektrumokból generált másodlagos szerkezeti elem-megoszlás. H – hélix; AP – antiparallel  $\beta$ -lemez; P – parallel  $\beta$ -lemez

Láthatjuk, hogy az önálló MORC3 (634-939) esetében különféle  $\alpha$ -hélix-formák megközelítőleg a polipeptid 35%-ára terjednek ki, amely jó egyezést mutat a COILS *coiled-coil* predikciós program (Lupas *et al*, 1991) 45%-os előrejelzésével (**10. ábra**). A különböző csoportokba sorolt  $\beta$ -redők összesen is eléggé kis arányban képviseltetik magukat, ráadásul a harmadik csoportba sorolt antiparallel  $\beta$ -redők általában a rendezetlen régiókhoz igen hasonló jelet adnak. A szerkezet nélküli szakaszok a dekonvolúlás során az „Egyéb” kategóriába kerültek. Ezek alapján összevonhatjuk a két utóbbi csoportot, így a rendezetlen szakaszok a



**10. ábra.** A COILS program predikciója a MORC3 *coiled coil*-tartalmára, 14, 21 és 28 aminosavas ablakokra. Minden esetben azokat a pozíciókat tekintetem *coiled coil*-nak, melyekre a valószínűség 0,5-nél nagyobb volt. A három érték átlaga 45,4%.

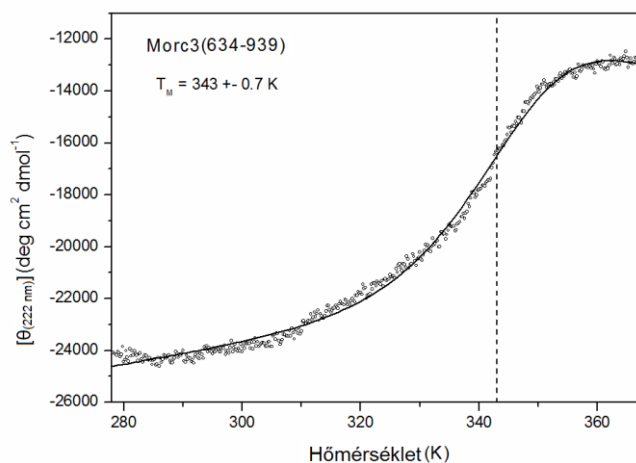
teljes lánc körülbelül 45%-át jelenthetik. Ez elég jól egybevág az IUPred már bemutatott, 30% körüli predikciójával.

A komplexben szereplő MORC3 (634-939) várakozásainkkal ellentétben nem mutatja a hélixtartalom növekedését. Ennek oka lehet a kötőhely és a *coiled-coil* közötti mintegy 30 aminosavnyi távolság, illetve

az ebben a szakaszban lévő három prolin jelenléte. Megfigyelhető viszont a különféle  $\beta$ -lemez-formák arányának enyhe növekedése, ami a kötődés hatására a fragmensben kialakuló rendezetlen-rendezett átalakulásnak tulajdonítható. Ha a komplexben lévő fragmens spektrumából levonjuk az önálló MORC3 (634-939)-hez tartozót, akkor a visszamaradó spektrum a  $\beta$ -lemez elemi spektrumához hasonlít (**9/B. ábra**). Ezek alapján a MORC3-nak az a szakasza, amely a DYNLL1-hez való kötésért felelős, az interakció során valószínűleg  $\beta$ -lemez-szerű struktúrát vesz fel, hasonlóan számos már ismert kötőpartner hasonló régióihoz.

Az állandó hélixtartalom melletti stabilitásnövekedés nyomon követésére a MORC3 (634-939) 222 nm-en vett moláris ellipticitásának változását vizsgáltam a hőmérséklet függvényében (**11. ábra**). Ezen a hullámhosszon az  $\alpha$ -hélix és a hőmérséklet-növekedés hatására kialakuló általánosan rendezetlen szerkezet elemi spektruma között igen jelentős eltérés látható, így ennek nyomon követése információval szolgálhat a fehérje letekeredését illetően.

A kísérlet szerint a MORC3 *coiled-coil*-ja extrém magas stabilitást mutat, olvadáspontja 70 °C körül van. A DYNLL1 olvadáspontja 72 °C (Hodi *et al*, 2006), így mire a *coiled-coil* elkezd letekeredni, a DYNLL1 is elveszti rendezett konformációját. Emiatt a MORC3 (634-939) és a DYNLL1 komplexének felfűtésekor nem kapunk értékelhető eredményeket, hiszen egyrészt a DYNLL1 szerkezetének változása miatt spektruma már nem lesz egyszerűen levonható a komplexéből, másrészt a küvettában kicsapódó fehérje magát a mérést is zavarja. Ez azt jelenti, hogy erre a kérdéseinkre CD-spektroszkópiával nem kaphatunk választ. Kérdéses azonban, hogy fiziológias jelentőséggel bírna egy ilyen mértékben stabil *coiled-coil* további erősítése.



**11. ábra.** A MORC3 (634-939) 222 nm-en figyelemmel követett ellipticitása a hőmérséklet függvényében.

## 4.4. Konklúzió és jövőbeli tervek

Tudományos diákköri munkám során az LC8 dinein könnyűlánc és annak feltételezett partnerének, a MORC3 fehérjének kölcsönhatását vizsgáltam. Izotermális titrációs kalorimetria és GST *pull-down* módszerekkel kimutattam és kvantitatív módon jellemeztem a két fehérje közvetlen kölcsönhatását.

Ezek alapján a MORC3 - LC8 kölcsönhatás mikromólos disszociációs állandóval rendelkezik. ITC eredmények alapján a MORC3 kötőmotívum kötődése a korábbiakban jellemzett TQT motívumot tartalmazó kötőpeptidekhez hasonlóan entalpikusan kedvező, de entrópikusan kedvezőtlen volt. A kötődés során tapasztalt kedvezőtlen entrópikus hozzájárulás valószínűleg a rendezetlen szerkezetű peptid szabadságfokának csökkenéséből, valamint az LC8 szerkezeti vizeinek felszabadulásából származik (Radnai *et al*, 2010).

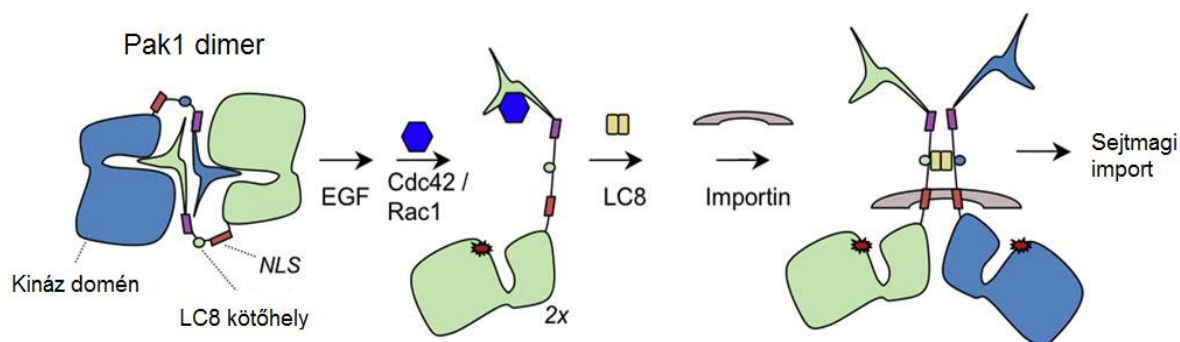
A teljes MORC3 és az LC8 közötti kapcsolatot a közeljövőben HEK-293 humán sejtvonalban is szeretném igazolni ko-immunprecipitáció segítségével. A kísérletekhez olyan emlős expressziós vektorok előállításán dolgozom, melyek FLAG-MORC3 és GST-DYNLL1 fúziós fehérjéket kódolnak. A kapcsolat létrejöttét a fúziós címkékre specifikus ellenanyagok felhasználásával tervezem kimutatni, Western-blot segítségével. A rendszer optimalizálásával az LC8 egyéb, a MORC3-hoz hasonlóan prediktált potenciális kötőpartnereinek gyors és viszonylag egyszerű igazolása válik lehetővé.

Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével megvizsgáltam az LC8-MORC3 kölcsönhatás szerkezet-funkció hatását. Ismert, hogy az LC8 kötődésének hatása több korábban meghatározott kötőpartner esetében – ilyen például a swallow (Wang *et al*, 2004) és a miozin 5a (Hodi *et al*, 2006) – a partner dimer szerkezetének stabilizálása. A MORC3 esetében azonban nem sikerült kimutatni a motívum karboxil-terminális irányában ~30 aminosav távolságra található *coiled-coil*-tartalmának, valamint hőstabilitásának növekedését. A kölcsönhatás során tapasztalt változatlan *coiled-coil*-tartalom valószínűleg egyrészt a motívum és a *coiled-coil* között található hosszú, ~30 aminosav tartalmú linkernek, valamint a *coiled-coil* és a motívum között található három prolinnak köszönhető.

A MORC3-LC8 komplex-képződése során CD spektroszkópiával  $\beta$ -lánc kialakulást tapasztaltunk. A kialakult  $\beta$ -lánc hossza összemérhető az LC8 motívum hosszával. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a MORC3 LC8-kötőmotívuma – a már ismert

kötőmotívumokhoz hasonlóan – az LC8 ismert kötőárkaiban,  $\beta$ -szerkezetben található. Előzetes szerkezeti vizsgálataink alapján valószínűsíthető, hogy a kölcsönhatás funkciója fiziológiai viszonyok között nem a MORC3 *coiled-coil* régiójának stabilizálása.

A szakirodalomban leírt példák alapján az interakció egy másik lehetséges szerepe a MORC3 olyan állapotának stabilizálása, amelyben elérhetővé válik a fehérje nukleáris lokalizációs szignálja (NLS), így a kölcsönhatás a fehérjének a sejtmagba való áthelyeződéséhez szükséges. Számos fehérjével kapcsolatban kimutatták (például a Pak1 kináz (Lightcap *et al*, 2009) vagy a veszettségvírus P-proteinje (Moseley *et al*, 2007) esetében), hogy az LC8-hoz való kötődés szükséges a fehérje nukleáris importjához. A Pak1 esetében ennek oka feltételezhetően az NLS-nek az interakció hatására történő felszínre kerülése (**12. ábra**).



**12. ábra. A Pak1 sejtmagi importjának modellje. Forrás: (Lightcap *et al*, 2009)**

A MORC3 nukleáris lokalizációs szignálja és az LC8-kötőhely egymástól csak mintegy 90 aminosav távolságban helyezkedik el, ráadásul egy valószínűleg rendezetlen régióban, feltételezhető, hogy létezik a két motívum működése között valamilyen kapcsolat. A jövőben tervezem a MORC3 LC8 kötőmotívuma és NLS-e közti kölcsönhatás vizsgálatát. Tervezem és jelenleg is azon dolgozom, hogy peGFP-N1 vektorba klónozzam a MORC3 vad típusú génjét, továbbá egy olyan MORC3 mutánst, amely az LC8-kötőhelyen TQT motívum helyett AAA mutációt tartalmaz. Ez a mutáció várhatóan tönkreteszi az LC8-kötőhelyet (Lajoix *et al*, 2004). A mutáció hatását a fehérjékhez fúzionált GFP fehérje fluoreszcenciájának konfokális mikroszkópia segítségével történő követésével tervezem.

A MORC3 és az LC8 funkcionális kapcsolatának egy másik lehetséges magyarázata a MORC3 szumoilációs állapotának befolyásolása lehet. A MORC3 nukleáris szubdoménekben (PML-NB) való lokalizációjáért a MORC3 szumoilációja és az ezekben a sejtmagi testekben megtalálható, szintén szumoilált PML fehérje felelős. A két szumoilált fehérje közötti nem-

kovalens kapcsolat a SUMO és annak lineáris motívuma, a *SUMO interacting motif* (SIM) közötti interakciók eredménye. Érdekes módon az LC8 kötőhely (635-643. aminosavak) közvetlen közelében, a 650. pozícióban álló lizin-oldallánc bizonyítottan képes kovalens módon szumoilálódni (Mimura *et al*, 2010). Ezen kívül a MORC3 szekvenciájának vizsgálata során több olyan motívumot találtam a fehérje rendezetlen régiójában, amelyek nagy hasonlóságot mutattak a más, SUMO-t nem-kovalensen kötő fehérjékből ismert SIM-ekkel (Hecker *et al*, 2006). A MORC3 szumoiláció által közvetített fehérje-fehérje interakciós hálózatának és ennek az LC8 kölcsönhatás során történő változásának vizsgálata segíthet jobban megérteni a MORC3 fiziológiai funkcióját, az általa is alkotott sejtmagi szubdomének kialakulását.

# Összefoglaló

Az LC8 dinein könnyűlánc egy, az eukariótákban általános, 10,3 kDa-os dimer csomóponti fehérje, amely a dinein komplexben elfoglalt szerepe mellett számos egyéb partnerrel is rendelkezik. Gerincesekben két paralógja van (DYNLL1 és 2), melyek szekvenciája csak kevésbé tér el, és tisztázatlan köztük a funkcionális különbség. Partnereit egy rövid lineáris motívumon keresztül köti meg, A motívum átfogó jellemzése alapján bioinformatikai módszerekkel új humán partnereket jósoltak. A lehetséges partnerek között található a 107 kDa méretű MORC3 fehérje. A MORC3 olyan egy dimer sejtmagi fehérje, ami tartalmaz egy *coiled-coil*, egy ATP-áz és egy cink-ujj domént. Valószínűleg a nukleáris szubdomének szervezésében, fehérjék szekvesztrálásában, illetve a kromatin szervezésében és transzpozabilis elemek represszáálásában vesz részt, továbbá kísérletesen kimutatták a H3 hisztonhoz való kötését is. Munkám elsődleges célja az LC8 és a MORC3 közti kölcsönhatás bizonyítása és a kölcsönhatás funkciójának felderítése volt. Első lépésben GST *pull-down* módszerrel igazoltam a kölcsönhatást, majd izotermális titrációs kalorimetria révén határoztam meg az interakció termodinamikai állandóit és affinitását. A kötőszekvenciát tartalmazó peptid a korábbiakban vizsgált azonos típusú motívumokhoz hasonló termodinamikai tulajdonságokkal köt, a disszociációs állandó értéke 1,7  $\mu\text{M}$ . Számos korábban azonosított kötőpartnerrel kimutatták, hogy az LC8 „molekuláris kapocsként” segíti azok dimerizációját, azaz stabilizálja a kötőhelyhez közeli *coiled-coil* szerkezetet. A MORC3 esetében is prediktálható az LC8 kötőmotívum közelében, attól karboxil-terminális irányban *coiled-coil*. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével kimutattam, hogy a MORC3 hélixtartalma, valamint olvadáspontja kötődés hatására nem változik lényegesen. Irodalmi adatok alapján az interakció további lehetséges funkciója a MORC3 sejtmagi importjának vagy szumoilációs állapotának befolyásolása. A jövőben tervezem, hogy sejtbioológiai módszerekkel tovább vizsgálom az LC8 és a MORC3 kölcsönhatás funkcióját és sejtelettani hatását.

# Summary

The LC8 dynein light chain is a ubiquitous hub protein with a molecular mass of 10,3 kDa, which besides its role in the formation of the dynein motor complex, also interacts with numerous other proteins in a cell. It has two human paralogs (DYNLL1 and 2), with only minor differences in their sequences and with yet unclear functional dissimilarities. LC8 binds its partners through a consensus sequence: thus it is possible to predict previously unknown binding partners by bioinformatical methods. One of the candidates is MORC3, a dimeric nuclear protein with a molecular mass of 107 kDa. It consists of an ATPase, a zinc-finger and a coiled-coil domain. Its possible functions are the formation of nuclear subdomains, sequestration of other proteins, organizing the chromatin and the repression of several genes. Our primary goal was to prove and characterize the interaction between LC8 and MORC3. It was firstly determined qualitatively by a GST pulldown assay, then using isothermal titration calorimetry we measured the affinity and the thermodynamical parameters of the interaction. The peptide containing the binding motif shows similar thermodynamical parameters to previously known examples, with a dissociation constant of 1,7  $\mu$ M. It was shown in the case of several previous binding partners that LC8 acts as a „molecular clamp”: it helps the dimerization of proteins by increasing the stability of a coiled-coil domain close to the LC8 binding motif. The topology of these regions is similar in MORC3 as well, so we investigated this possibility. Using circular dichroism spectroscopy we followed the change of helix-content and the melting temperature of the coiled-coil comparing LC8-bound and separate MORC3. We could not find signs of stabilization in either case. According to the literature, further possible roles of the interaction are the influencing of the nuclear import or the sumoylation state of MORC3. In the future I plan to investigate these other possible functions of the relation between these two proteins and its potential effects on the already known functions of MORC3.

# Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nyitray Lászlónak, amiért lehetőséget biztosított az elmúlt években munkám elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Köszönet illeti még Rapali Pétert, amiért mindig a segítségemre volt mind a gyakorlati munka, mind a dolgozat megírása során. Hálával tartozom még Biri Beának, amiért hasznos tanácsaival nagyban segítette dolgozatom elkészítését, illetve a Nyitray-labor összes többi tagjának.

# Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Póti Ádám dolgozatban bemutatott munkafolyamatok közül a következőket végeztem el saját magam:

- DNS-konstrukciók elkészítése
- Fehérjék és peptidek megtermeltetése bakteriális rendszerben
- GST *pull-down assay*
- ITC mérések
- Cirkuláris dikroizmus mérések.

Póti Ádám

Budapest, 2013. 01. 09.

# Irodalom

- Barbar, E. (2008) Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks. *Biochemistry*, **47**, 503-508.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P.P. (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 1006-1016.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**, 1188-1190.
- Day, C.L., Puthalakath, H., Skea, G., Strasser, A., Barsukov, I., Lian, L.Y., Huang, D.C. and Hinds, M.G. (2004) Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem J*, **377**, 597-605.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433-3434.
- Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. and Zhang, M. (2001) Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J Mol Biol*, **306**, 97-108.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M.H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G.J., Mann, M. and Hay, R.T. (2009) System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal*, **2**, ra24.
- Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic, I. (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*, **281**, 16117-16127.
- Hodi, Z., Nemeth, A.L., Radnai, L., Hetenyi, C., Schlett, K., Bodor, A., Perczel, A. and Nyitrai, L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry*, **45**, 12582-12595.
- Hutchins, J.R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Heriche, J.K., Sykora, M.M., Augsburg, M., Hudecz, O., Buschhorn, B.A., Bulkescher, J., Conrad, C., Comartin, D., Schleiffer, A., Sarov, M., Pozniakovsky, A., Slabicki, M.M., Schloissnig, S., Steinmacher, I., Leuschner, M., Ssykor, A., Lawo, S., Pelletier, L., Stark, H., Nasmyth, K., Ellenberg, J., Durbin, R., Buchholz, F., Mechtler, K., Hyman, A.A. and Peters, J.M. (2010) Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science*, **328**, 593-599.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, **1751**, 119-139.
- Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., Kisaki, O., Sugimoto, H., Sawamura, T., Sadano, H. and Osumi, T. (2002) The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem*, **277**, 20611-20617.
- Lajoix, A.D., Gross, R., Aknin, C., Dietz, S., Granier, C. and Laune, D. (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**, 281-290.
- Li, X., Foley, E.A., Molloy, K.R., Li, Y., Chait, B.T. and Kapoor, T.M. (2012) Quantitative chemical proteomics approach to identify post-translational modification-mediated protein-protein interactions. *J Am Chem Soc*, **134**, 1982-1985.
- Lightcap, C.M., Kari, G., Arias-Romero, L.E., Chernoff, J., Rodeck, U. and Williams, J.C. (2009) Interaction with LC8 is required for Pak1 nuclear import and is indispensable for zebrafish development. *PLoS One*, **4**, e6025.

- Lo, K.W., Kan, H.M., Chan, L.N., Xu, W.G., Wang, K.P., Wu, Z., Sheng, M. and Zhang, M. (2005) The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J Biol Chem*, **280**, 8172-8179.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Mimura, Y., Takahashi, K., Kawata, K., Akazawa, T. and Inoue, N. (2010) Two-step colocalization of MORC3 with PML nuclear bodies. *J Cell Sci*, **123**, 2014-2024.
- Moissiard, G., Cokus, S.J., Cary, J., Feng, S., Billi, A.C., Stroud, H., Husmann, D., Zhan, Y., Lajoie, B.R., McCord, R.P., Hale, C.J., Feng, W., Michaels, S.D., Frand, A.R., Pellegrini, M., Dekker, J., Kim, J.K. and Jacobsen, S.E. (2012) MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science*, **336**, 1448-1451.
- Moseley, G.W., Roth, D.M., DeJesus, M.A., Leyton, D.L., Filmer, R.P., Pouton, C.W. and Jans, D.A. (2007) Dynein light chain association sequences can facilitate nuclear protein import. *Mol Biol Cell*, **18**, 3204-3213.
- Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D.W., Sala, C., Kim, E., Craig, A.M., Weinberg, R.J. and Sheng, M. (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**, 4524-4534.
- Pfister, K.K., Fay, R.B. and Witman, G.B. (1982) Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas* flagella. *Cell Motil*, **2**, 525-547.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, **3**, 287-296.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C. and Strasser, A. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, **293**, 1829-1832.
- Radnai, L., Rapali, P., Hodi, Z., Suveges, D., Molnar, T., Kiss, B., Becsi, B., Erdodi, F., Buday, L., Kardos, J., Kovacs, M. and Nyitray, L. (2010) Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem*, **285**, 38649-38657.
- Rapali, P., Radnai, L., Suveges, D., Harmat, V., Tolgyesi, F., Wahlgren, W.Y., Katona, G., Nyitray, L. and Pal, G. (2011) 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*, **6**, e18818.
- Rapali, P., Szenes, A., Radnai, L., Bakos, A., Pal, G. and Nyitray, L. (2010) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J*, **278**, 2980-2996.
- Rodriguez-Crespo, I., Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Ortiz de Montellano, P.R. and Gavilanes, F. (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett*, **503**, 135-141.
- Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y., Shi, Y. and Gill, G. (2006) NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5308-5313.
- Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M. and Pandolfi, P.P. (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell*, **24**, 331-339.
- Takahashi, K., Yoshida, N., Murakami, N., Kawata, K., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., Zinn, A.R., Shime, H. and Inoue, N. (2007) Dynamic regulation of p53 subnuclear localization and senescence by MORC3. *Mol Biol Cell*, **18**, 1701-1709.
- Wagner, W., Fodor, E., Ginsburg, A. and Hammer, J.A., 3rd. (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**, 11564-11577.
- Wang, L., Hare, M., Hays, T.S. and Barbar, E. (2004) Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein. *Biochemistry*, **43**, 4611-4620.

Yang, W., Thompson, J.W., Wang, Z., Wang, L., Sheng, H., Foster, M.W., Moseley, M.A. and Paschen, W. (2012) Analysis of oxygen/glucose-deprivation-induced changes in SUMO3 conjugation using SILAC-based quantitative proteomics. *J Proteome Res*, **11**, 1108-1117.