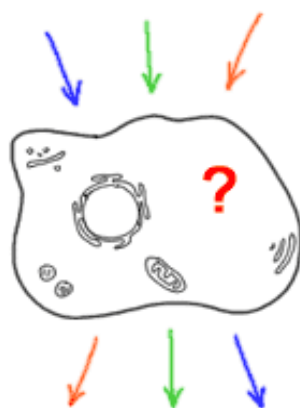


Fehérje kináz alapú jelátviteli komplexek: szerkezet, funkció és evolúció

dr Reményi Attila



Tartalomjegyzék

Előszó	4
1. Bevezetés	6
1.1. Sejtes jelátviteli pályák, sémák	
1.2. Fehérje kinázok szerepe az intracelluláris jelátvitelben	
1.3. Mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK)	
1.4. Fehérje-fehérje kölcsönhatási mechanizmusok	
1.5. Jelátviteli hálózatok evolúciója	
2. Célkitűzések	23
3. Módszerek	24
3.1. Rekombináns DNS technikák	
3.2. Fehérje expresszió és tisztítás	
3.3. Fehérje szerkezet meghatározás	
3.4. Fehérje kölcsönhatási esszék	
3.5. Fehérje kináz aktivitás esszék	
3.6. Sejtes alapú vizsgálatok	
3.7. Bioinformatikai analízisek	
3.8. Molekuláris dinamikai szimulációk és <i>in silico</i> dokkolás	
4. Eredmények	36
4.1. A Ste5 vázfehérje szerepe az élesztő konjugációs MAPK jelpályában	
4.2. MAPK kötő lineáris motívumok specificitása	
4.2.1. Az élesztő Fus3 MAPK kölcsönhatásai	
4.2.2. Humán MAPK-ok kölcsönhatásainak specificitása	
4.2.2.1. Humán MAPK dokkoló motívumok biokémiai vizsgálata	
4.2.2.2. MAPK dokkoló peptidek specificitásának szerkezeti alapja	
4.2.2.3. MAPK kötő peptidek mesterséges tervezése	
4.3. Lineáris MAPK kötő motívumok a humán proteómban	
4.3.1. Szerkezet alapú D-motívum kereső algoritmus	
4.3.2. A találatok kísérletes tesztelése	
4.3.3. D-motívumot tartalmazó fehérjék analízise	
4.4. MAPK alapú magasabb rendű jelátviteli komplexek	
4.4.1. Az ERK2-RSK1 jelátviteli komplex	

4.4.2. A MEKK3-MKK5-ERK5 MAPK modul

4.5. Lineáris motívumok az élesztő NDR/LATS kináz alapú jelátvitelben

5. Diskusszió 74

5.1. MAPK vázfehérjék: Ste5 vs. JIP1

5.2. Fehérje kinázok dokkoló kölcsönhatásai: szerkezeti evolúcióbiológia

5.3. MAPK alapú jelátviteli komplexek össze- és szétszerelése

6. Saját kutatási eredmények összefoglalása 84

Összefoglalás 85

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája 86

Összesített tudományometriai adatok 88

Köszönetnyilvánítás 89

Ábrajegyzék 90

Irodalomjegyzék 92

Függelék 99

Előszó

Értekezésemben azt a több mint tízéves kutatómunkát foglalom keretbe, mely a Kaliforniai Egyetemen eltöltött posztdoktorális, illetve a hazatérésem után itthon elkezdett önálló kutatásaim eredményeiből merít. Egy rövid kitekintés erejéig azonban említést teszek pályafutásom korábbi eredményeiről is, mert koncepcionálisan kapcsolódnak jelátvitelben fontos fehérje kinázokon végzett későbbi munkámhoz; bár más területről – génexpresszió szabályozás, transzkripció faktorok – származnak. Meggyőződésem, hogy az élő rendszerek komplex működése mögött egyszerű biokémiai törvényszerűségek rejlenek. Utóbbiak feltárásához azonban elengedhetetlen a modern biológia különböző vizsgálati szintjeit egyszerre kezelni képes kutatói tapasztalat. Akármilyen területen is dolgoztam, mindig arra törekedtem, hogy egy komplex biológiai rendszer vizsgálatakor a szerkezeti biokémikusi végzettségemből fakadó, atomi szintű fehérje-térszerkezetek feltárására irányuló érdeklődésem kiegészüljön magasabb (pl. sejtes, organizmus, evolúciós rendszerbiológiai) szintű vizsgálatokkal.

Doktori munkámat az Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumban (EMBL) végeztem (Heidelberg-Hamburg, Németország). Munkám során emlősök embrionális fejlődésében fontos ún. POU transzkripció faktorok szerkezetének illetve funkcióinak a felderítésével foglalkoztam. Változatos működésüket ezek a transzkripció faktorok egymással és/vagy más transzkripció faktor családok tagjaival komplexeket alkotva érik el. A DNS-hez kombinatórikus módon kötve szabályozzák a gének kifejeződését. Egy adott POU faktor a DNS enhanszer szekvenciájától függő módon több interakciós partnerrel is képes kölcsönhatásba lépni és ezáltal különböző aktivitású transzkripció komplexeket létrehozni. Mik azok a molekuláris mechanizmusok amik révén egy organizmus szintű transzkripció hálózat ezt a fajta változatos aktivitást viszonylag kis számú szabályzó fehérje használatán keresztül is képes elérni? Munkám során azt találtam, hogy az embrionális fejlődésben fontos gének enhancer régióiban olyan DNS szekvenciák találhatóak, melyek specifikus POU faktor dimerek, illetve a SOX transzkripció faktor család egyes tagjaival specifikus POU/SOX heterodimer komplexek létrehozását teszik lehetővé (Tomilin et al. 2000) (Reményi et al. 2001) (Reményi et al. 2003) (Reményi et al. 2004).

A Kaliforniai Egyetemen folytatott posztdoktori kutatásaimban is azokat a molekuláris mechanizmusokat vizsgáltam, melyek révén egy véges elemből álló szabályzó rendszer a folyamatosan változó körülményekhez adaptálódni képes sejtszintű működést tesz lehetővé. Itt azonban a modell rendszer a *Saccharomyces cerevisiae* (élesztő) MAP-kinázok (MAPK) által közvetített jelátviteli hálózatai voltak. Itt alapvető probléma, hogy több jelátviteli pálya

ugyanazokat a jelátviteli enzimeket használja. A központi szerepet játszó regulációs komponensek tehát itt is limitáló tényezőnek tűnnek. Ezért felvetődik a kérdés, hogy hogyan lehetséges adott bemenetre a hozzátartozó kimenet közvetítése. Ebben a jelátviteli rendszerben két alapvető felfedezést tettem: (a) rövid 10-15 aminosav hosszú fehérje fragmensek (ún. dokkoló peptidek) képesek MAPK-hoz szelektív módon kötődni és (b) jelátviteli hálózatok korábban passzív komponenseinek vélt vázfehérjéiről bebizonyítottuk, hogy aktív módon szabályozzák jelpályák aktivitását. Mindkét felfedezés hozzájárult annak a molekuláris logikának a jobb megértéséhez, mely lehetővé teszi egy komplex sejtszintű regulációs feladat megoldását véges számú szabályozó elem használatán keresztül is (Reményi et al. 2005) (Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006) (Good et al. 2009).

2007-ben a Wellcome Trust támogatásával létrehoztam a Fehérje Kölcsönhatás Laboratóriumot az Eötvös Loránd Tudományegyetemen, majd 2014-től a munkát az MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében folytattuk csoportommal az MTA Lendület Program támogatásával. Munkánk itt főleg a humán MAPK jelátviteli pályák működésére fókuszál. Az itt elért eredményeinket tettem az értekezésem gerincévé, amihez a korábbi élesztő MAPK jelátviteli pályákban szerepet játszó fehérjék tanulmányozása, illetve a néhány éve elkezdett, más fehérje kinázokra, például az AGC kinázok csoportjába tartozó NDR/LATS kinázokra kiterjesztett munkánk is szervesen kapcsolódik.

A különböző munkáimat eltérő részletességgel mutatom be az értekezésemben, néhol részletesebben s néhol csak a „lényegre” koncentrálva. Törekedtem arra, hogy az olvasó egy átfogó képet kapjon arról az atomi és rendszerbiológiai „felbontást” ötvöző megközelítésről, amiről hiszem, hogy elengedhetetlen komplex biológiai jelenségek megértéséhez. Munkám során sokszor meglepődtem azon, hogy látszólag komplex jelenségek mögött milyen egyszerű törvényszerűségek rejlenek. Ezért mondom, hogy:

„Mint biológus csodálom az élet sokszínűségét, mint biokémikus csodálom a változatosság mögött rejlő molekuláris szintű törvényszerűségek egyszerűségét.”

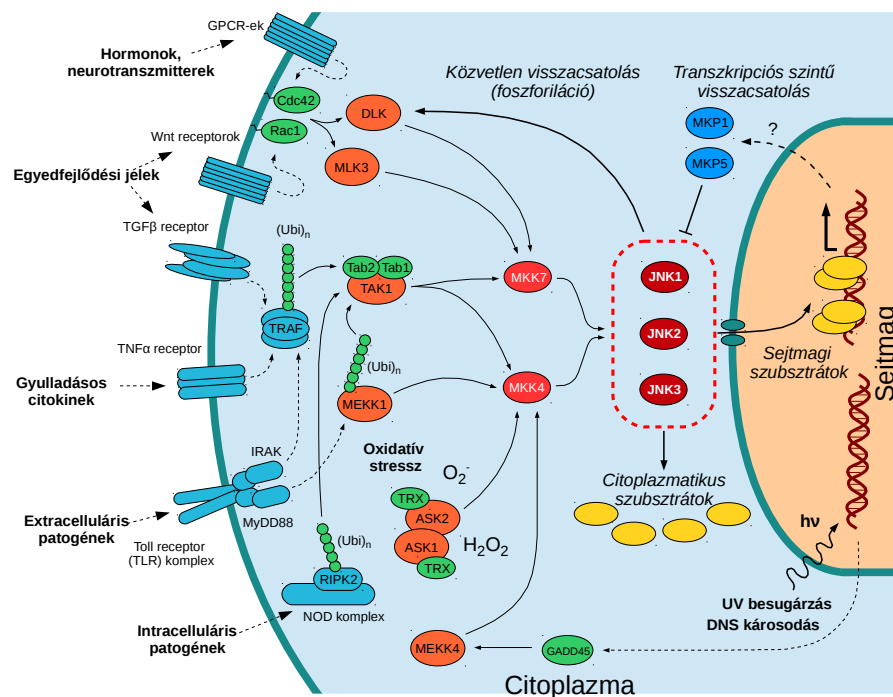
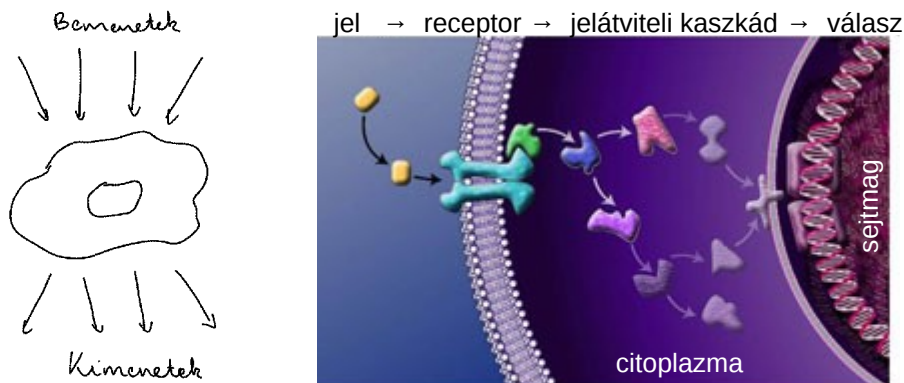
dr Reményi Attila

Budaörs, 2015. december

1. Bevezetés

1.1. Sejtes jelátviteli pályák, sémák

Sejtjeink a környezetükből érkező jelekre folyamatosan válaszolnak. A sejt számára ingerek lehetnek olyan kémia vagy fizikai természetű hatások, melyek a sejtek vagy a belőlük felépülő organizmusok szempontjából fontosak. Kémiai hatás lehet például egy hormon jelenléte a véráramban, vagy fizikai hatás lehet például a fény a retinában elhelyezkedő pálcikasejtek számára. Az ingerek jelátviteli pályák bemeneteinek tekinthetők és érzékelésük receptorokon keresztül zajlik, az ingerre adott biológiai válasz pedig olyan sejten belül lejátszódó folyamatok összességéként írható le, melyek egy adott inger hatására váltódnak ki. Biológiai válasz például a hámsejtek osztódása növekedési faktorok hatására, vagy membrán depolarizáció fény hatására pálcikasejtekben. Sok esetben a külvilágból érkező ingerek a sejtmagban gének átírását indítják el. Biológiai válaszok tehát a jelátviteli pályák kimenetei (**1. Ábra**).



1. Ábra Sejtes jelátviteli folyamatok sémája

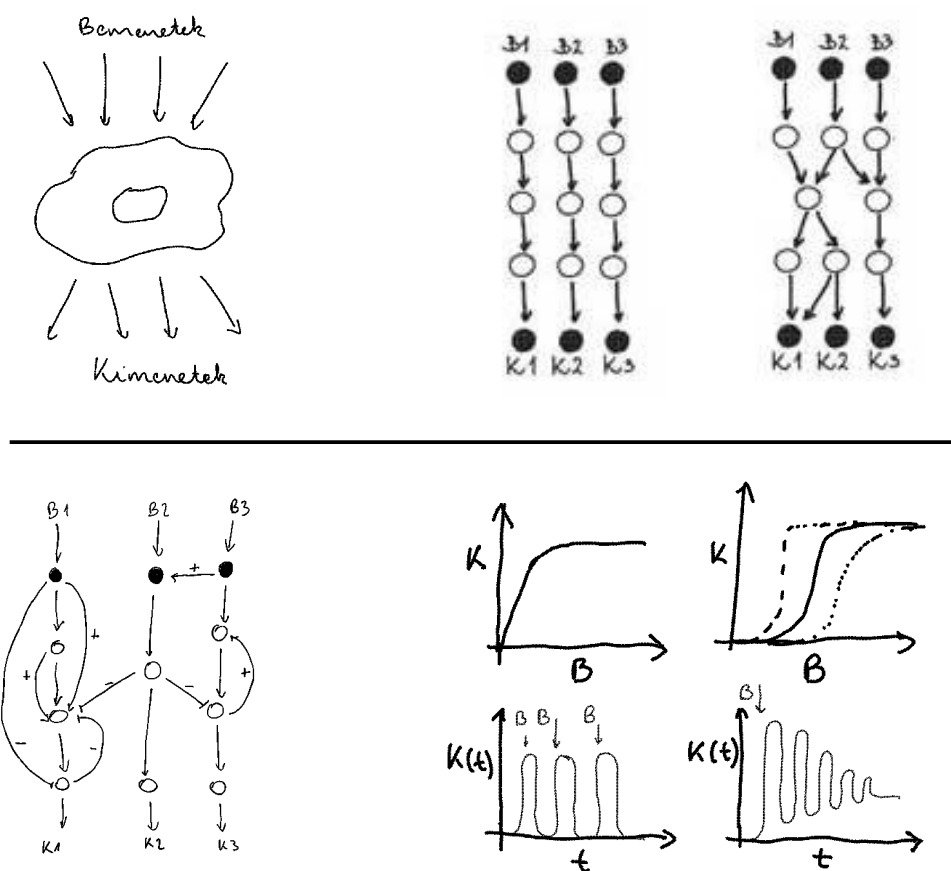
Felül: A sejteket folyamatosan bemenetek (ingerek) érik, amire jelátvitel révén (szignál transzdukció) kimeneteket (biológiai válaszokat) generálnak (balra). Sok esetben a jel érzékelése a sejtmembránban elhelyezkedő receptorokhoz való kötődés után a sejtmagban valamilyen génexpressziós válaszhoz vezet (jobbra). A sejtmembránban és sejtmagban zajló jelátviteli események között a kapcsolatot legtöbbször egy fehérje kinázoktól függő citoplazmatikus jelátviteli kaszkád teremti meg. Alul: Természetesen konkrét jelátviteli komponenseket is részleteiben is hűen tükröző (pl. egy JNK MAP kináz központú) ábrázolás a fentieknél általában sokkal komplexebb képet mutat. A panel bemutatja a különböző komponenseket megfelelő térbeli kompartmentekben elhelyezve, melyek között változatos jelátviteli mechanizmusok (pl. hierarchikus, de hálózatos kaszkád szerveződés; pozitív és negatív visszacsatolás; poszttranszlációs módosítás) biztosítják a mai tudásunk alapján a JNK alapú jelátvitel megfelelő működését. JNK alapú jelátviteli pályák aktivációját több, a külvilágból érkező (pl. morfogének, citokinek, hormonok, patogének) vagy sejten belül keletkező inger (pl. oxidatív stressz, DNS károsodás) indíthatja el. Ezek aztán (valószínűleg sejtípustól függően) a három JNK

izoforma foszforilációját eredményezik. A JNK-eknek vannak citoplazmatikus és sejtmagi szubsztrát fehérjék illetve közvetlen, foszforiláció alapú (pl. MAP3K foszforiláció) vagy közvetett, transzkripció szintű (pl. MKP1,5 foszfatázok transzkripcióját serkentő) visszacsatolásokban vesznek részt. A központi JNK modul fehérje kináz komponensei narancstól (MAP3K) sötétpirosig változnak. A MAP3K-ok aktivitását befolyásoló fehérjék zöldek, míg a tőlük feljebb elhelyezkedő fehérjék (pl. receptorok) világoskék színűek, a MAPK szubsztrátok pedig sárgák. GPCR: G-fehérje kapcsolt receptor, Ubi: nem-degradatív, K63, típusú ubikvitin láncok. Folytonos vonalak direkt kötődési eseményeket, enzimatikus reakciókat mutatnak, míg a szaggatott vonalú nyilak több lépéses folyamatokra utalnak, ahol a pontos mechanizmust még nem ismerjük.

Klasszikus értelemben a jelátviteli pálya egy olyan fehérjékből és másodlagos hírvivő molekulákból (pl. kalcium, foszfolipidek, stb) álló kaszkád, amely egy bemenetet egy kimenettel kapcsol össze. Például inzulin koncentráció növekedés és egy glükóz transzporter működése között kapcsolatot teremtő jelátviteli molekulák egy csoportját nevezhetjük a *glükóz felhasználást stimuláló* pályának. Ennek elemei a következők: inzulin, inzulin receptor, IRS, PI3 kináz, PIP3 (foszfolipid), Akt kináz, GEF, Rab GTPáz, GLUT4. Ez a példa jól szemlélteti, hogy az inzulin és a GLUT4 nevű glükóz felvételét elősegítő transzporter fehérje aktivációja között sok köztes lépés van. Ezek összessége szükséges ahhoz, hogy a GLUT4-et tartalmazó intracelluláris vezikulumok fúziója a sejtmembránnal megtörténjen: a sejtek a vérből tehát glükózt vesznek fel. A korábbi példától eltérően azonban jelátviteli pályák legtöbbször egy sejtmagi válasszal végződnek. Ilyen például a növekedési faktorok hatása a korai gének átírására (pl. c-fos, c-jun), amelyek aztán ciklin D átírást serkentenek. Egy konkrét növekedési faktor (pl. EGF) hatására aktiválódó jelátviteli molekulák csoportját nevezhetjük például az *EGF sejtosztódást serkentő* pályájának. Elterjedt azonban, hogy egy szignál transzdukciós pályára a központi komponens(ek) neve(i) alapján utalunk (pl. JNK, TNF α , TGF β , vagy JAK-STAT). Ilyen esetekben a hangsúly a közös mechanizmusokon keresztül zajló működésen van, ami sokszor vezet akár teljesen eltérő funkcionális válaszokhoz ugyanazon komponensek használatán keresztül is.

Sejtek bemenet és kimenet társítását mindenesetre nem lineáris módon szerveződött jelpályák összességéként kell elképzelnünk (**2. Ábra**). A jelátvitel inkább egy olyan folyamat, melynek során a sejt a környezetből érkező ingerek hatására egy erre specializálódott fehérjékből felépülő hálózat segítségével a beérkező ingerek összességétől függő biológia választ ad. Az emberi gondolkodás számára könnyebben kezelhető lineáris felépítésű jelátviteli pályák tehát áthallanak egymásba, és inkább hálózatos felépítést mutatnak: az egyes jelátviteli fehérjéken tehát több jelpálya is osztozhat egyszerre. Például a korábban említett *glükóz felhasználást stimuláló* pálya például nem teljesen független az *EGF sejtosztódást serkentő* pályájától. Az inzulin például korai gének aktiváción keresztül sejtosztódást is tud serkenteni. Továbbá, a klasszikus lineáris kaszkád

típusú pálya architektúra aztán tovább bonyolódik a komponensek közötti pozitív vagy negatív előre- és visszacsatolások révén (2. Ábra).



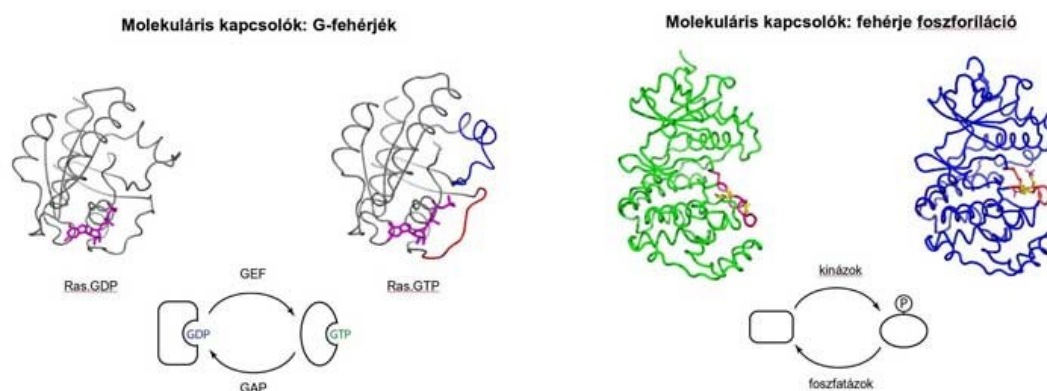
2. Ábra Különböző jelpálya architektúrák

Felül: A jobb oldalon látható inkább hálózatszerű jelpálya kevésbé lineáris, de még mindig hierarchikus szerveződést mutat. Alul: A valóságban ez a komplexebb szerveződés még tovább „bonyolódhat” különböző vissza- és előrcsatolások (serkentő pozitív vagy gátló negatív) bevezetésével, ami a hierarchikusan szerveződő lineáris kapcsolatokat a bemenetek és kimenetek között tovább bontja. Ezek aztán változatos bemenet-kimenet kapcsolatokat generálnak egy jelátviteli folyamatot jellemző dózis-válasz görbe karakterisztikájában (felső két panel: klasszikus hiperbolikus illetve ultraérzékeny viselkedés) illetve dinamikus viselkedésének tekintetében (alsó két panel: klasszikus lecsengő vagy oszcilláló viselkedés) (Tyson et al. 2003). (B: bemenet, K: Kimenet)

1.2. Fehérje kinázok szerepe az intracelluláris jelátvitelben

A jelátvivő apparátus fehérje komponensei változatos felépítésűek: például receptor tirozin kinázok (pl. inzulin receptor), foszfolipid kinázok (pl. PI3 kináz), fehérje kinázok (pl. Akt kináz, MAP kinázok) vagy foszfatázok, kis GTP-ázok (pl. Ras, Rab), stb. Jelátviteli fehérjék sokszor molekuláris kapcsolóként működnek (3. Ábra). A Ras GTP-áz, illetve az ERK2 nevű MAP kináz kétállapotú kapcsolókra szolgálnak jó példaként: mindkét molekulának közös tulajdonsága, hogy az

inaktív, illetve aktív állapotainak konformációja kissé eltér. A két állapot közötti konformációs átmenetek reverzibilis módon szabályozhatók egyéb fehérjékkel való kölcsönhatásaik révén, illetve a két állapotnak is eltérő hatása van más fehérjékre nézve.



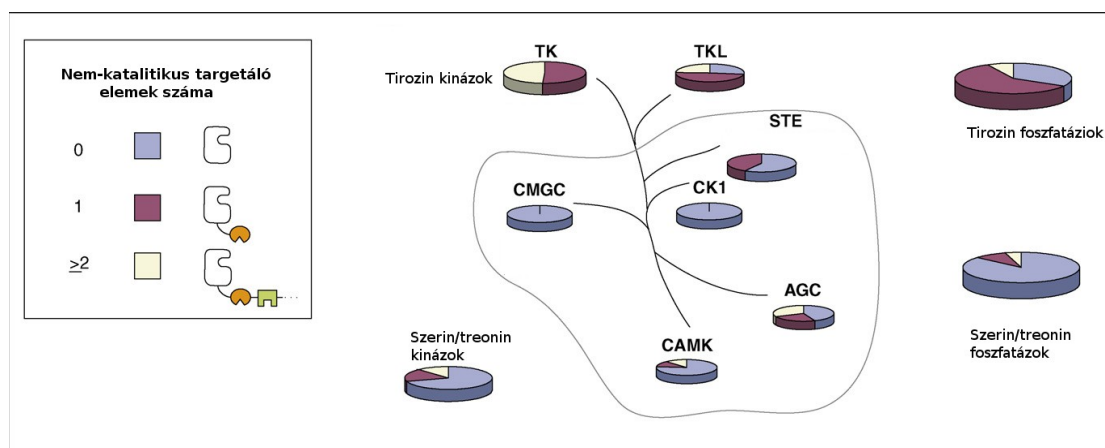
3. Ábra Molekuláris kapcsolók

Jelátviteli szabályzó fehérjék tulajdonsága, hogy aktivitástól függően különböző szerkezetet vesznek fel. A Ras G-fehérje GDP- (inaktív) és GTP-kötött (aktív) állapotának szerkezete (balra) különbözik az ún. switch (kapcsoló) hurkoknál (piros és kék), míg az ERK2 fehérje kináz (jobbra) inaktív (zöld, nem foszforilált) és aktív (kék, foszforilált) állapotában az ún. aktivációs hurok (sárga) szerkezete eltérő. Mindkét esetben az aktív és inaktív állapotú fehérjék eltérő jelátviteli szereppel bírnak, főleg a megváltozott fehérje-fehérje kölcsönhatásaiknak köszönhetően.

Egy receptor bekapcsolása után a sejt intracelluláris jelfeldolgozó apparátusában olyan változások történnek, melyek elemi információhordozó eseményeknek tekinthetők. Ennek során megváltozik a jelátviteli fehérjék kölcsönhatása, aktivitása illetve poszttranszlációs módosítások révén a fehérje-fehérje kölcsönhatások (FFK) alapvetően tranzienst természetű allosztérikus hatásai állandósulhatnak is, azaz időben az FFK megszűnése után is fennmaradhatnak. Az élőlényekben a környezeti hatások sejten belüli feldolgozására kialakult egy fehérje-foszforiláció létrehozására (fehérje kinázok), kiolvasására (foszfo-aminosavat kötő domének) illetve megszüntetésére (fehérje foszfatázok) alkalmas fehérje apparátus (Pawson & Scott 2005). Bár léteznek aszparaginsav és hisztidin oldalláncok foszforilációjára szakosodott enzimek (pl. növények és prokarióták ún. kétkomponensű rendszereiben (Stock et al. 2000), valószínűleg ezen foszfo-aminosavak vizes fázisban való instabilitása miatt nem terjedtek el széles körben. Tirozin és szerin/treonin foszforilációra szakosodott enzimek, foszfo-aminosavakhoz kötődni képes fehérjék illetve foszfatázok viszont széleskörűen elterjedtek és nagy evolúciós változékonyságot és változatosságot mutatnak. Míg a tirozin-foszforiláció megjelenése valószínűleg inkább köthető a többsejtűség megjelenéséhez, a szerin/treonin foszforiláció talán a legősibb jelátviteli mechanizmus, ami

jellemző a prokariótáktól az emberig (Lim & Pawson 2010).

A teljes emberi genom génjeinek 1,7%-át teszik ki protein kinázt kódoló gének. Míg 518 humán fehérje kinázt ismerünk, ugyanakkor csak kb. 150 foszfatáz gén ismert. A kinázok csoportosításának alapjául a katalitikus doménjeik szekvenciáit vették alapul (Hanks & Hunter 1995). Az emlős kinázok osztályozása a következőképpen alakul. Az első nagy csoport az AGC nevű csoport (pl. PKA, B, C). A következő nagy csoport a CaMK, amelyen belül a Ca/calmodulin függő kinázok családja alkotja a csoport legnagyobb hányadát. A harmadik csoport (CMGC) igen változatos. Ide sorolhatók a ciklin-függő kinázok (CDK), a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK), valamint a glikogén szintáz 3 kinázok (GSK3) családja is. Ezt a családot sokszor egyszerűen csak prolin-irányított kinázoknak nevezik, mert a foszforilálható szerin/treonin aminosavat egy prolin aminosav követi. További két nagy csoport a STE (pl. MAPK-okat aktiváló MAP2K-ok) illetve a kazein kináz I (CK1) szerin/treonin kináz csoport. A tirozin kinázok (TK) alkotják a következő nagy diverzitású csoportot, amit követ a közeli rokonságban álló tirozin szerű kinázok (TKL) szintén nagy csoportja (**4. ábra**) (Hanks 2003).



4. Ábra A humán kinóm és foszfatóm

A kinóm nagy csoportjainak sematikus evolúciós viszonya a kináz domének szekvenciája alapján van feltüntetve (középen) illetve az ábra bemutatja, hogy melyek azok a kináz vagy foszfatáz csoportok ahol jellemző a katalitikus doméneken felüli targetáló domének, régiók megléte vagy annak hiánya (jobbra) (Reményi et al. 2006).

A kinázok esetében fontos tényező a szabályozhatóság, ezért a protein kinázok jelentős hányada a katalitikus domén mellett olyan doménekkal is rendelkezik, melyeknek a fehérjék aktivitásának szabályozásában van kiemelkedő szerepük. 83 különböző ilyen domén típust azonosítottak, melyek 258 kinázban fordulnak elő. Ezek a domének egyrészt a sejten belüli lokalizáció szabályozásával, másrészt jelátviteli elemek kötésével segítik a kinázok megfelelő

működését. Ezek a szabályozásban fontos elemek lehetnek más fehérjék (citoszkeletális fehérjék, receptorok), RNS-ek, lipid típusú molekulák, GTP, kalcium/kalmodulin és foszforilált tirozin oldalláncok kötését biztosító elemek. Sejten belüli elhelyezkedésük szempontjából számos kináz a sejtmembránokhoz közel található, míg a legtöbb a citoplazmában illetve a sejtmagban lokalizálódik. Csupán három kináz található az endoplazmatikus retikulumban, és szintén kevés (5) a mitokondriális (Manning et al. 2002).

Bár a mai magasabb rendű élőlényekben megfigyelhető fehérje-foszforiláción alapuló poszttranszlációs mechanizmusok dominanciájának evolúciós okait pontosan feltárni valószínűleg sohasem lesz módunk, a különböző organizmusok fehérje kináz illetve foszfatáz összesítéseiből, az ún. kinóm és foszfatóm analízisekből, valamelyest kaphatunk betekintést a fehérje-foszforiláción alapuló jelátvivő apparátusok kialakulásába, jelentőségébe (Moses & Landry 2010). Általánosságban például megfigyelhető, hogy a tirozin foszforilációban résztvevő enzimek gyakrabban tartalmazzak ún. moduláris targetáló elemeket (pl. transzmembrán régiót vagy valamilyen fehérje-fehérje kölcsönhatásra szakosodott domént, pl. SH2, SH3, PDZ, stb) (**4. Ábra**). Mivel a humán fehérje foszfatázoknak csak kevesebb mint fele Ser/Thr foszfatáz, míg a lényegesen több humán kináz kb. két-harmada pedig Ser/Thr kináz, adódik, hogy a Ser/Thr alapú poszttranszlációs szabályozás fiziológiai enzim-szubsztrát kapcsolatai nagyon komplexek lehetnek (**4. Ábra**). Különösen, ha azt is figyelembe vesszük, hogy talán a humán proteómban minden harmadik fehérje foszforilálódik, az átlagos poszttranszlációs módosítások (PTM) száma pedig 2.5 per géntermék (s a protein foszforiláció valószínűleg több mint a PTM-ek 80%-át teszi ki) (Papin et al. 2005).

Továbbá, szintén elmondható, hogy a foszforilált aminosav oldalláncokat felismerő ún. moduláris domének száma jelentősen nő a jelátviteli kapacitással összhangban (pl. egyszerű eukariótától az emlősökig az állatvilágban; pl. SH2, PTB, WW, 14-3-3, stb, melyek a foszforiláción alapuló poszttranszlációs folyamatok hatásának funkcionális diverzitását eredményezik) (Bhattacharyya, Reményi, Yeh, et al. 2006).

1.3. Mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK)

Jelátviteli folyamatokban általános jelenség, hogy a milliányi környezeti inger sejten belüli feldolgozásában a jelátviteli fehérjéknek csupán egy meglepően kisszámú csoportja vesz részt. A fehérjék aktivitását reverzibilis foszforiláció révén szabályozó fehérje kinázok és foszfatázok például egyszerre több jelpálya köztes enzimei is lehetnek. Ennek a jelenségnek a szemléltetésére remek példa a MAP-kinázok (MAPK) csoportja (Schaeffer & Weber 1999) (**Táblázat 1**). Számuk eukarióta organizmusokban meglepően kevés, bár a sejten belüli folyamatok szabályozásában

szerepük sokrétű (pl. a *S. cerevisiae*-ban 5, míg az emberben 14 MAPK fordul elő) (Táblázat 2).

"Klasszikus" MAPK-ok					
#	Név	Szisztematikus név	Egyéb nevek	A gén kromoszómális helye (ember)	UniProt ID
1	ERK1	MAPK3	p44mapk	16p11.2	P27361
2	ERK2	MAPK1	ERK, p42mapk	22q11.2	P28482
3	ERK5	MAPK7	BMK1	17p11.2	Q13164
4	JNK1	MAPK8	JNK, SAPK, SAPK1c	10q11	P45983
5	JNK2	MAPK9	SAPK1a, p54a	5q35	P45984
6	JNK3	MAPK10	SAPK1b, p54b	4q22-q23	P53779
7	p38α	MAPK14	p38, CSBP1, CSBP2, SAPK2a	6p21.3-p21.2	Q16539
8	p38β	MAPK11	SAPK2b	22q13.33	Q15759
9	p38γ	MAPK12	ERK6, SAPK3	22q13.3	P53778
10	p38δ	MAPK13	SAPK4	6p21	O15264
Atipikus MAPK-ok					
11	ERK3	MAPK6	p97mapk	15q21	Q16659
12	ERK4	MAPK4	-	18q21.1	P31152
13	ERK7	MAPK15	ERK8	8q24.3	Q8TD08
14	NLK	-	-	17q11.2	Q9UBE8

Táblázat 1. Humán MAPK-ok

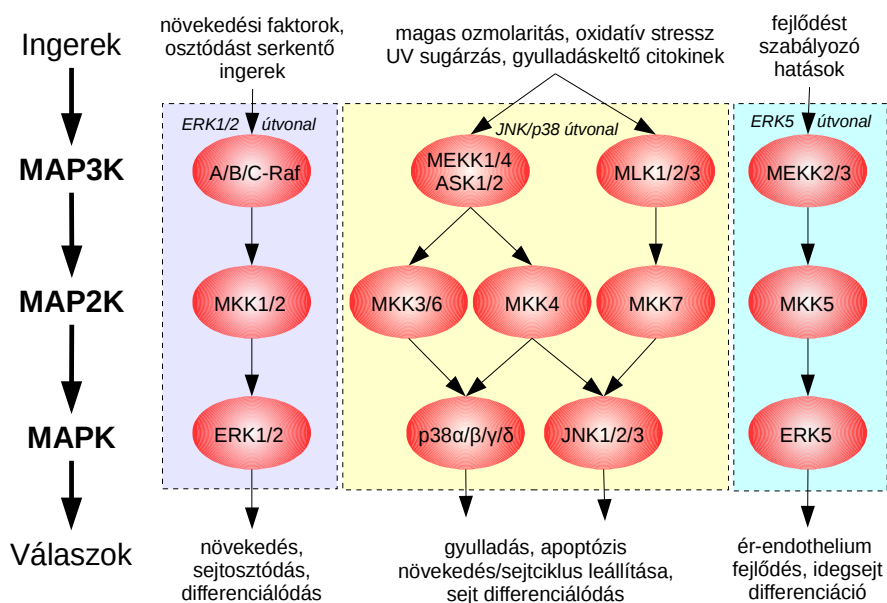
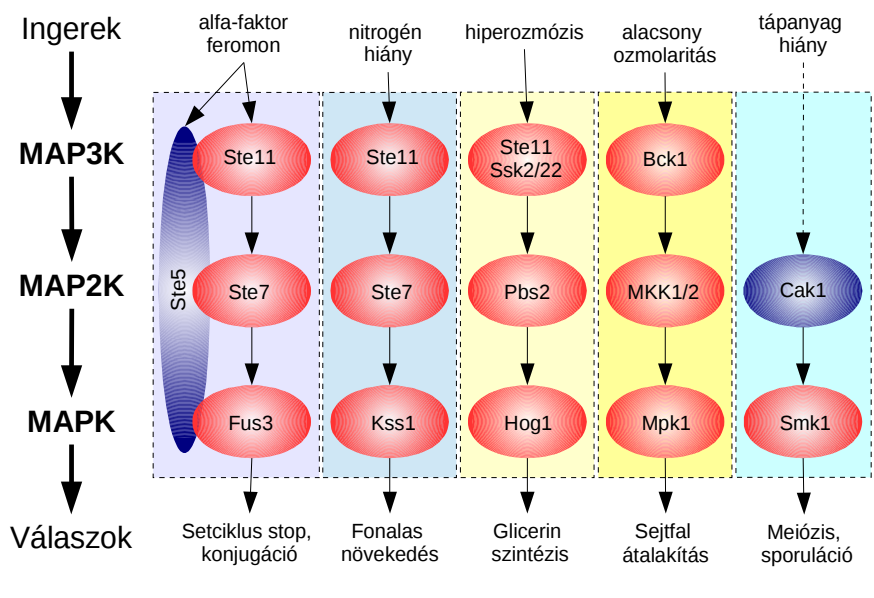
MAPK alcsalád	<i>Homo sapiens</i> & <i>Mus musculus</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ERK1/2	ERK1	Rolled	mpk-1	Fus3 és Kss1
	ERK2			
ERK5	ERK5	-	-	-
JNK-k	JNK1	Basket	jnk-1	Hog1, Mpk1
	JNK2			
	JNK3			
p38 kinázok	p38 α	p38a	pmk-1	
	p38 β	p38b	pmk-2	
	p38 γ	p38c	pmk-3	
	p38 δ			
ERK3/4	ERK3	-	-	Smk1
	ERK4			
ERK7	ERK7 (ERK8)	Erk7	C05D10.2	
NLK	NLK	Nemo	lit-1	

Táblázat 2. MAPK homológok a legfontosabb modell organizmusokból

MAP-kinázok a szerin/treonin kinázok csoportjába tartoznak, foszforiláció révén aktiválódnak, míg ők maguk szubsztrát fehérjéknek egy változatos palettáját foszforilálják. Utóbbiak mind tartalmaznak egy MAPK foszforilációs motívumot (az ún. S/TP helyet), mely a szubsztrátnak a kináz aktív helyéhez való kötődéséhez szükséges és egyben a foszforilálandó szerin vagy treonin aminosavat is tartalmazza. Érdekes módon ezek a szubsztrát-specifitásukban meglehetősen „liberális” enzimek a sejtben élet és halál urai: olyan alapvetően eltérő folyamatok regulátorai, mint például a sejtproliferáció vagy a sejthalál (Chang & Karin 2001). A jelterjedés hűségének fontosságát szem előtt tartva az alábbi kérdés vetődik fel: hogyan lehetnek az ilyen széles szubsztrát-spektrumú fehérje kinázok jelátviteli pályák kulcsenzimeit?

A Mitogén Aktivált Protein Kinázok (MAPK) a humán kinóm CMGC kináz csoportba tartoznak (Manning et al. 2002). A MAPK-ok számtalan fiziológias szerepben vállalnak fontos szerepet, amelyek során az enzimek egy három tagból álló kaszkádban végzik feladatukat (Pearson et al. 2001). A modul legelső tagja egyben a jelpálya névadó kináza is, így megkülönböztetünk 4 klasszikus MAPK útvonalat. Ezek sorrendben ERK1/2, JNK, p38 és ERK5 jelpályák. Az őket aktiváló fehérjék, azaz MAPK kinázok (MAP2K) azonos sorrend mentén a MKK1/2, MKK4/7, MKK3/4/6 és MKK5 nevet viselik. A legfelső szintet a szerkezetileg igen diverz MAPK kináz kinázok (MAP3K) alkotják (5. ábra) (Lewis et al. 1998)

Az atipikus MAPK-ok lényeges tulajdonságokban különböznek a „klasszikus” MAPK-októl. Legtöbbjüknek csak egy foszforilációs helye van az aktivációs hurkukon (míg a klasszikus MAPK-koknak mindig kettő: egy szerin/treonin és egy tirozin aminosav), talán ezért nem is a konzervált MAP2K-ok családjába eső fehérje kinázok által aktiválódnak. Továbbá hiányoznak belőlük olyan evolúciósan konzervált aminosavak, melyek az összes klasszikus MAPK-nak a partner fehérjékkel kialakított kölcsönhatásaiban szerepet játszó dokkoló hasadék karakterisztikáját adják. Ezért valószínűleg fehérje-fehérje kölcsönhatásaikat más, ma még ismeretlen mechanisztikus elvek alapján szervezik. Funkcionális jelentőségük is ma még nagy részt feltáratlan (Coulombe & Meloche 2007).



5. Ábra MAPK jelátviteli modulok élesztőben (felül) és emberben (alul)

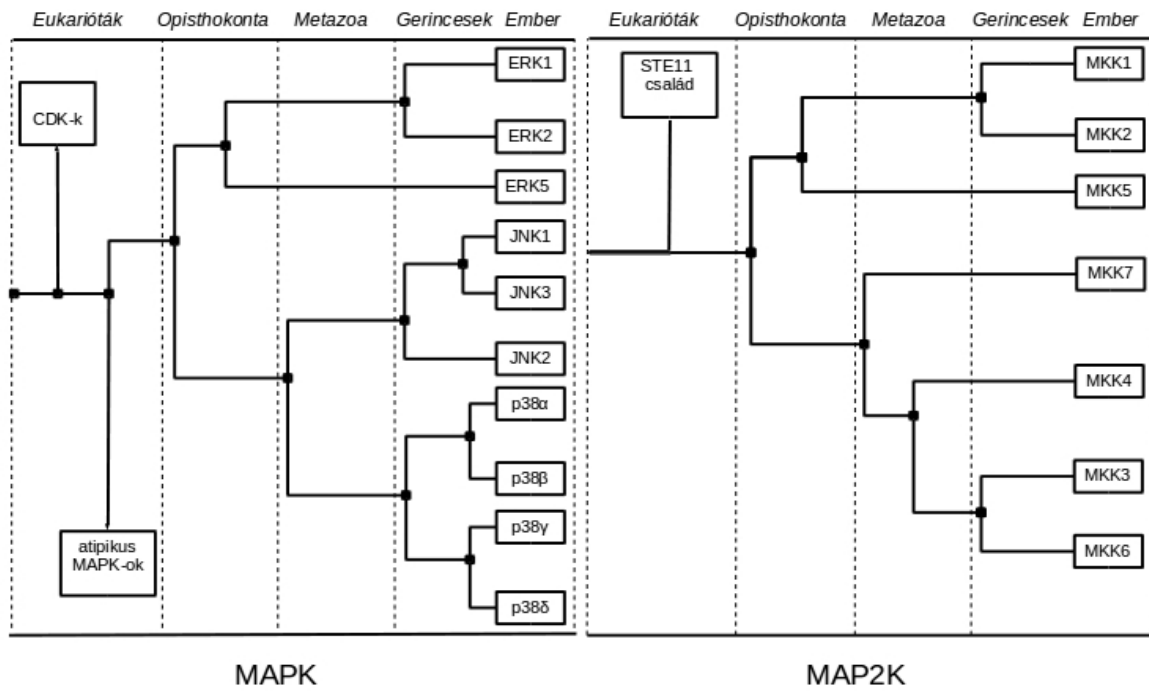
A legjobban karakterizált MAPK útvonal az ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinase) jelpálya, amit különböző növekedési faktorok indítanak be (pl. EGF, FGF, stb.). Az ERK1/2 útvonal legfelső aktivátorai közé a RAF fehérjék tartoznak, melyek a MKK1/2 fehérjék felfoszforylálásán keresztül aktiválják a kinázokat (Kyriakis et al. 1992). Az ERK1 és ERK2 fehérjék mind szerkezeti, mind fiziológiás szempontból nagy mértékben hasonlóak, például az ERK1 kiütése (pl.: géncsendesítéssel) nem eredményez látványos patológiás elváltozást, mert a ERK2 fehérje képes annak hiányát betölteni (Pagès et al. 1999).

A JNK kinázok (c-jun N-terminal kinase), melyeknek három isoformája van (JNK1, JNK2, JNK3), sok esetben különböző stressz stimulusokra aktiválódnak, s apoptotikus folyamatokat indíthatnak be (Bode & Dong 2007). Fiziológiás aktiválásuk pl. GPCR-eken vagy Wnt receptorokon keresztül azonban kiválthat differenciációt, de akár túlélést is. A JNK1 és 2 minden sejt típusban és szövetben előforduló fehérje, míg a JNK3 főleg az agyban fejeződik ki (Bode & Dong 2007). A JNK jelpályáknak számos MAP3K aktivátora van, amelyek az MKK4 vagy MKK7 MAP2K-okat foszforylálják (Wang et al. 2007).

A p38 családba tartozó fehérjék (p38 α , - β , - γ , - δ) főképp stressz válaszokban vesznek részt (pl. ultraibolya sugárzás, ozmotikus sokk, gyulladás), de emellett fontos szerepük van a különböző citokin-függő jelpályákban és ezzel kapcsolatban autofágiás és apoptotikus folyamatokban (Han et al. 1994)(Lee et al. 1994). A JNK és p38 útvonalak felső aktivátorai között sok az azonos elem, a MAP3K szinten például a MLK3, TAK1, MEKK1 és MEKK4, valamint MAP2K szinten az MKK4 kináz. Az MKK3 és MKK6 kinázok azonban csak a p38 jelpályák mediátorai (Ono & Han 2000).

Emlősökben az ERK5 valószínűleg a másik három MAPK-nál szűkebb fiziológiás szereppel bír, habár az ERK5 által közvetített folyamatok egyenlőre a legkevésbé feltártak. Főképp az érfal és neurális szövetek fejlődési folyamataiban vesz részt, azon belül is a sejtosztódás, differenciáció és túlélésben tölt be fontos szerepet (Kato et al. 1998)(Hayashi & Lee 2004)(Roberts et al. 2010). Az útvonalat különböző növekedési faktorok képesek stimulálni (pl. NGF, VEGF), melyek a MEKK2/3 MAP3K-okon és az MKK5 MAP2K-on keresztül aktiválják az ERK5-öt (Nakamura & Johnson 2003)

A egyes kaskádok azonos szintjén található fehérjék evolúciósan közeli rokonságban állnak egymáshoz, mivel az egyes MAPK pályák a korábbiak teljes duplikációjával alakulhattak ki, ebből eredendően kináz doménjeik szerkezete nagy hasonlóságot mutat egymással (**6. ábra**) (Caffrey et al. 1999).

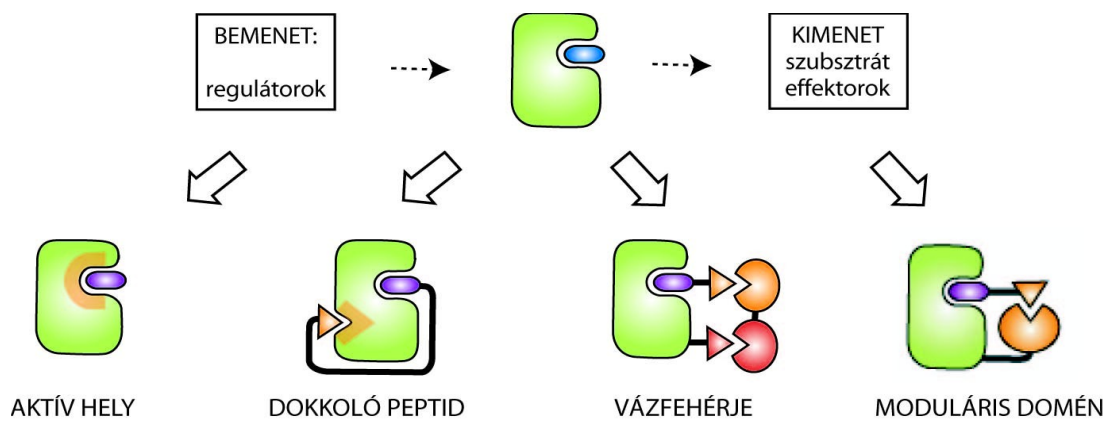


6. Ábra MAPK-ok illetve MAP2K-ok rokonsági viszonya.

A kladogramok a MAPK-ok illetve az őket aktiváló specifikus humán MAP2K-ok törzsfeljedési eredetét mutatják.

1.4. Fehérje-fehérje kölcsönhatási mechanizmusok

Számos fehérje kinázról már régóta ismert, hogy az aktív helytől független mechanizmusokon keresztül választja ki célfehérjéit; nevezetesen ún. dokkoló motívumokon, moduláris doméneken vagy vázfehérjékkel történő asszociációk révén (7. ábra) (Biondi & Nebreda 2003)(Bhattacharyya, Reményi, Yeh, et al. 2006).

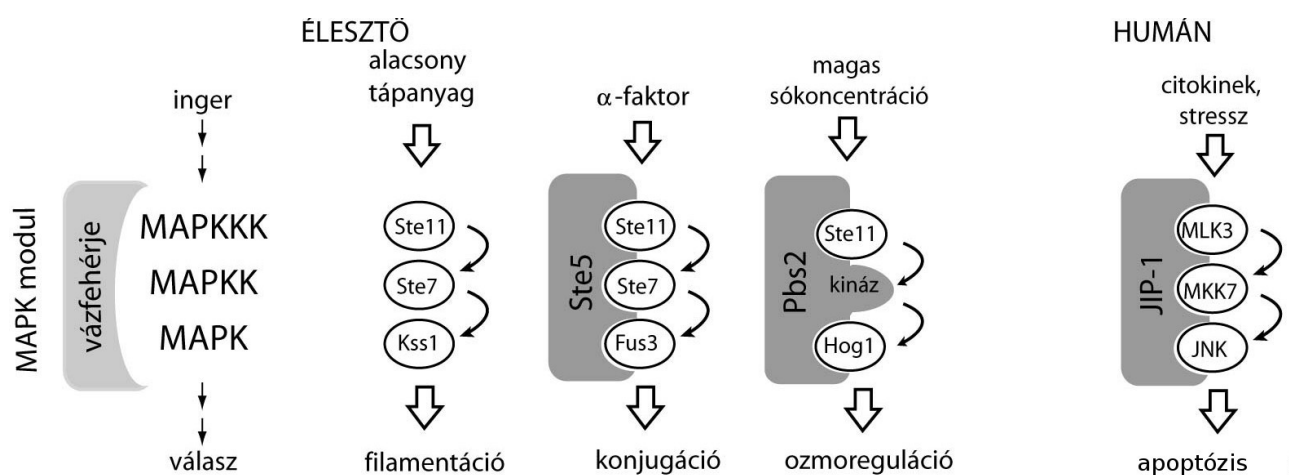


7. Ábra Fehérje kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatás mechanizmusai

A legegyszerűbb esetben a foszforilálható aminosav körüli régió kötődik a kináz aktív helyéhez, és ennek a régióknak a térbeli szerkezete határozza meg a szubsztrát-specifitást. Dokkoló kölcsönhatások esetében a kináz aktív helyétől

különálló felszíne (az ún. dokkoló hasadék) és a szubsztrát fehérjéből származó rövid régió (ún. dokkoló peptid) közötti kötődés biztosítja a kináz-szubsztrát funkcionális kapcsolat szelektivitását. Több esetben azonban a szubsztrát fehérje és az azt foszforiláló kináz csak egy harmadik fehérje (ún. vázfehérje) közreműködése révén lépnek interakcióba. Ebben az esetben a kináz-szubsztrát pár specificitása a vázfehérjével alkotott kölcsönhatásokban rejlik. Illetve lehetséges, hogy a fehérje kináz rendelkezik egy szubsztrát kötődést elősegítő extra moduláris doménnel is. Kék/bíbor: szubsztrát target szekvenciája, Narancs/piros: specificitásért felelős FFK régiók.

A dokkoló kölcsönhatások olyan bináris fehérje-fehérje kölcsönhatások, melyek a tranziens természetű enzim-szubsztrát kötődésen felül, attól eltérő módon segítik elő a kináz és a partnere közötti interakciót. Eredetileg ilyen kölcsönhatásokat kináz-szubsztrát párokra írtak le, ahol az enzimreakció K_M -jének erősítése révén a szubsztrát foszforilációját teszik hatékonyabbá (Sharrocks et al. 2000). Ma már dokkoló kölcsönhatások egyéb MAPK partnerekre is ismertek (pl. egy másik kináz aktivátorhoz, egy deaktiváló foszfatázhoz, vagy akár vázfehérjékhez való kötődés esetében.). A vázfehérjék viszont változatos interakciós doménjeik vagy lineáris motívumjaik révén képesek több kináz komponenst egyidejűleg kötni. Érdekes, hogy a humán kinómfa különböző ágaihoz tartozó kinázok eltérő módon használnak dokkoló vagy moduláris (pl. SH2, SH3 vagy egyéb targetáló) doméneket. A CMGC kináz csoportban elterjedt a dokkoló motívumokat fogadni képes kináz doméneken elhelyezkedő dokkoló árok, míg a tirozin kinázok (pl. Src, Abl), de akár az AGC szerin/treonin kinázok is moduláris doméneket tartalmaznak a legtöbb esetben (pl. Akt/PKB, PKC). Jelátviteli vázfehérjék használata pedig elterjedt mind a *Saccharomyces Cerevisiae* (innenről csak élesztő) vagy humán MAPK jelátviteli kaszkádokban is (**8. Ábra**) (Whitmarsh & Davis 1998).



8. Ábra Élesztő és humán vázfehérjék a MAPK jelátvitelben

MAP-kinázok aktivitása egy háromszintű kináz kaszkádon keresztül szabályozott. Ezek az ún. MAPK modulok sokféle jelpálya változatos bemenet-kimenet összefüggéseinek kapcsolóállomásai. Felépítésük nagymértékű hasonlóságot mutat

élesztőtől emberig. Sok esetben MAPK modulok kináz komponenseit (MAPK kináz kináz, MAPKKK; MAPK kináz, MAPKK; és MAPK) vázfehérjék szervezik komplexekbe (pl. Ste5). Vannak olyan modulok is melyek vázfehérjék nélkül működnek (pl. a filamentképző pálya esetében), vagy az egyik kináz maga tölti be a vázfehérje szerepét (pl. Pbs2). Ste5-szerű, analóg funkciót betöltő humán vázfehérjék szintén elterjedtek. Például a JIP (JNK interacting protein) fehérjék.

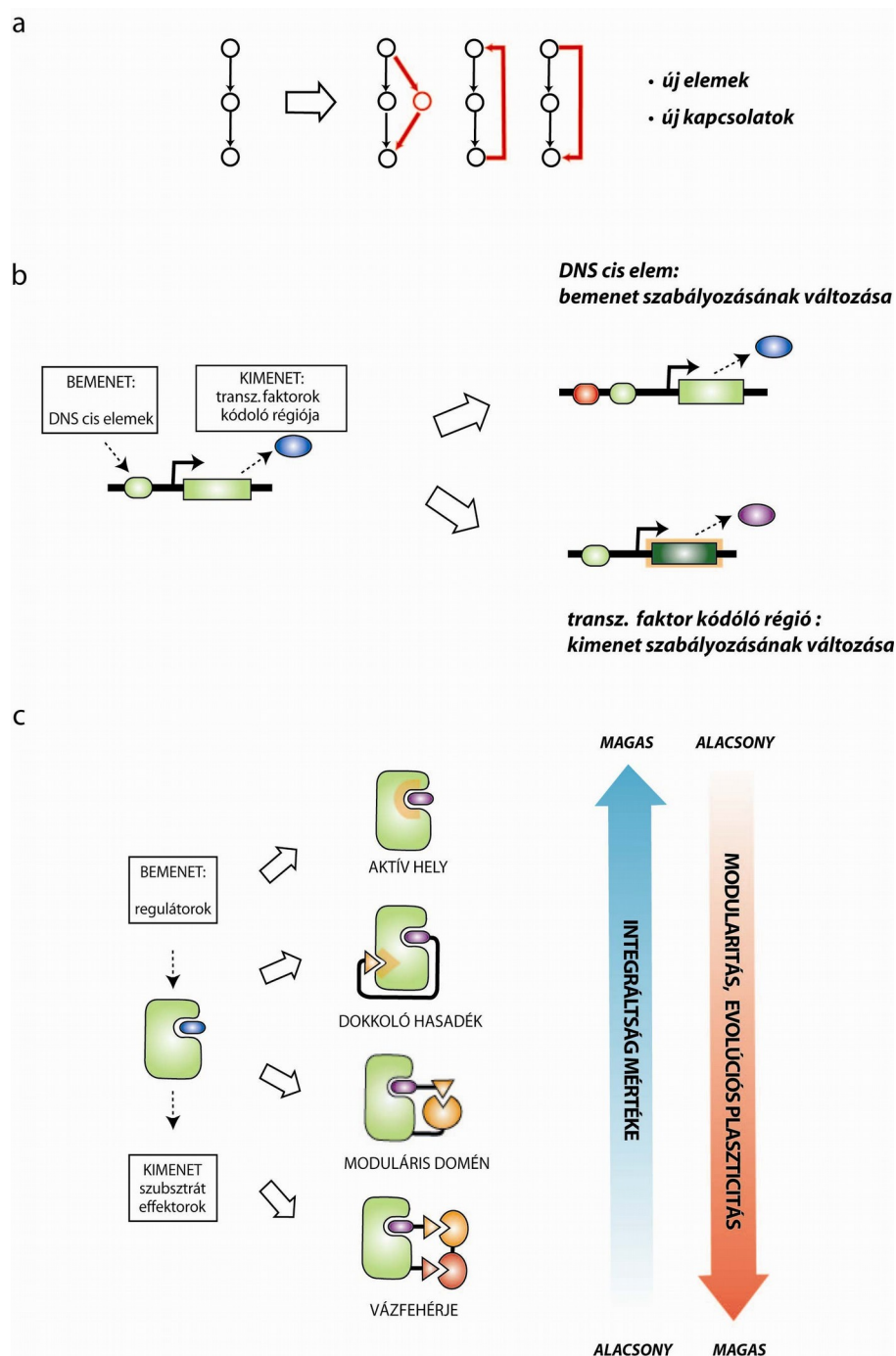
1.5. Jelátviteli hálózatok evolúciója

Regulációs hálózatok az evolúció során egyre összetettebbé válnak, mert az információ feldolgozó kapacitásra való igény egyre növekszik. A gének kifejeződéséért és a sejten belüli jelátvitelért felelős rendszereket leegyszerűsítve bemutathatjuk mint transzkripciós faktorokból illetve fehérje kinázokból álló hálózatokat, melyeket aztán gráfelméleti szempontból is lehet elemezni. Ha ezeket a hálózatokat mint gráfokat rajzoljuk fel egyes organizmusokra, akkor azt tapasztaljuk, hogy a gráfok az evolúció során egyre komplexebbé válnak. Komplexitást alapvetően kétféle módon lehet elérni: a regulációs elemek (csomópontok) számának vagy a regulációs elemek közötti kapcsolatok (élek) számának növelése révén (**9.a Ábra**). Az eddig rendelkezésre álló genom szekvencia és organizmus szintű fehérje-fehérje interakciós adatok alapján azt mondhatjuk, hogy talán az utóbbi jelenség az, ami az evolúciós létra felső fokain álló organizmusokat igazán komplexsége teszi. Erre szemléletes példa jelátviteli hálózatok esetében, hogy például a muslicát és az embert összehasonlítva nem a fehérjekináz gének száma, hanem a kinázok egymás közötti vagy más fehérjékkel alkotott interakcióinak száma nő (Bhattacharyya, Reményi, Yeh, et al. 2006).

Transzkripciós hálózatokban a génaktivitás szabályozása transzkripciós faktorok DNS enhanszer régiókkal (*cis* elemekkel) való kölcsönhatásain keresztül zajlik (Brent & Ptashne 1985). Mivel a szabályozott gének száma sokkal több mint egy organizmuson belül a feladatra rendelkezésre álló transzkripciós faktorok (effektorok) száma, ezért a DNS enhanszerek mint regulációs elemek töltenek be fontos szerepet fehérje-DNS komplexek létrehozásában. Korábban a doktori munkám során bemutattam, hogy az effektorok egymással való kölcsönhatásait a regulációs elemek kombinatorikus módon szabályozhatják az effektorok fehérje-fehérje kölcsönhatásainak modulálásán keresztül (Reményi et al. 2004). Ezeknek a hálózatoknak a létrejöttére illetve evolúciójára vonatkozó talán legfontosabb felismerés, hogy az effektor és regulációs funkciók szétválasztása révén az új kapcsolatok kialakítása lényegesen egyszerűbbé válik: egy adott gén aktivitásának szabályozása nem csak egy új transzkripciós faktor létrehozásán keresztül, hanem egy egyszerű DNS enhanszer szekvenciájának a megváltoztatása révén is megtörténhet (**9.b Ábra**).

Sejtbiológiai folyamatok egyik rejtélye, hogy kis szubsztrátspecifitású enzimeket használó jelátviteli hálózatok hogyan építenek fel az organizmus szintjén specifikusan működő jelpályákat.

Regulációs és effektor funkciók szétválasztása a hálózat elemeinek működésében itt is kiemelkedően fontos szerepet játszik. Ez ugyanis lehetővé teszi, hogy a kinázok könnyebben alakítsanak ki új kapcsolatokat az effektor (katalitikus) funkció megváltoztatása nélkül. Érdekes például, hogy jelátvitelben szerepet játszó fehérje kinázok sokkal több moduláris elemet használnak bemenet-kimenet kapcsolataik létrehozására mint a klasszikus metabolikus enzimek. Ez például egyértelműen tükröződik a kinázokhoz kapcsolódó fehérje-fehérje kölcsönhatásokra szakosodott moduláris domének változatosságában és számában (Pawson & Nash 2003). Másik érdekes jelenség, hogy sok fehérje kináz esetében az aktív hely körüli régió promiszkus módon ismeri fel és foszforíjálja a szubsztrátokat *in vitro* (Ubersax & Ferrell 2007). Fehérjekinázok szubsztrát-specifitását és más fehérjékkel való kölcsönhatásainak szelektivitását főleg az aktív helytől független mechanizmusok biztosítják. Ha kinázok különböző interakciós típusait egy evolúciós plaszticitást jelző skálán ábrázoljuk, akkor azt figyelhetjük meg, hogy míg az aktív helyen keresztüli interakciók integrált megoldások, addig a vázfehérjék által közvetített kináz asszociációk a modularitás legmagasabb fokát képviselik (**9.c Ábra**). Egy aktív hely körüli háromdimenziós struktúra nehezen transzferálható, ezért nagymértékben integrált megoldás. Ezzel szemben kinázok közötti asszociációk vázfehérjék alkalmazása révén egyszerűen, genetikailag moduláris módon változtathatóak. A fenti szempontok alapján a dokkoló peptideken valamint a moduláris doméneken keresztül zajló fehérje interakciók köztes megoldások. Az előbbi esetben egy kismértékű konszenzus szekvenciát igénylő fehérjeszakasz létrehozása egyszerűen megtörténhet akár véletlen mutációk révén, míg az utóbbi esetben a fehérje-fehérje kölcsönhatásra szakosodott moduláris domének például illegitim rekombináció vagy esetleg exon shuffling révén terjedhetnek el a genomon belül (Bhattacharyya, Reményi, Yeh, et al. 2006).



9. ábra Sejten belüli regulációs hálózatok modularitása és evolúciós plaszticitása

(a) Új regulációs hálózatok evolúciója. Egy egyszerű lineáris pálya összetettebbé alakítható kétféle módon: új elemek (nódusok) megjelenése révén melyek új elágazási pontokként szolgálnak vagy új kapcsolatok (élek) kialakítása révén már létező elemek között (pl. előre- és visszacsatolások esetében). (Új komponensek és kapcsolatok pirossal vannak jelölve.) (b) Új kapcsolatok kialakulása transzkripció hálózatokban. Transzkripció hálózatok egy nagymértékben moduláris hálózatra szolgálnak például, ahol akár kis mértékű változások is képesek a rendszeren belüli bemenet-kimenet kapcsolatokat megváltoztatni. Egy új DNS cis elem létrehozása promoterekben, enhanszer régiókban megváltoztatja egy adott gén átírásának szabályozását, míg egy gén kódoló régiójának beillesztése egy adott cis elem mögé, egy már meglévő regulációs mód átadását jelenti egy másik gén expressziójára vonatkozólag. (c) Új kapcsolatok kialakulása

jelátviteli enzimekre (pl. fehérje kinázokra). A jelátviteli hálózat csomópontjai közötti kapcsolatok négy különböző módon jöhetnek létre. Ezek az interakciós stratégiák egy modularitás vs. integráltság skálán ábrázolhatók. Nagyobb mértékű elválás katalitikus és fehérje-fehérje kölcsönhatásra szakosodott funkciók között általában hálózatok nagyobb mértékű evolúciós plaszticitást teszi lehetővé.

Összefoglalóan elmondható, hogy organizmus szintű fenotípusos változatosság és komplexitás inkább rejlik a regulációs hálózatok elemei közötti kapcsolatok sokféleségében, mintsem az új elemek folyamatos generálásában. Napjaink számítástechnikai fejlesztéseinek sikere is ennek a stratégiának a gyakorlati alkalmazásához köthető: fantasztikusan komplex módon működő logikai áramkörök építhetők egyszerű elektronikus elemekből azok változatos módon történő összekapcsolása révén. A fentiek miatt véleményem szerint fontos megérteni, hogy új bement-kimenet összefüggések sejten belüli regulációs hálózatok esetében hogyan jönnek létre, s hogy azok milyen molekuláris logika mentén szerveződnek.

Talán a következő oldalakon sikerül meggyőzőnöm az olvasót, hogy a MAPK-okon keresztüli jelátviteli folyamatok remek modellrendszerekként használhatók, akár szélesebb körben is elterjedt molekuláris törvényszerűségek feltárására. Mindenesetre, dokkoló hasadékon keresztüli illetve vázfehérjék használatán alapuló fehérje-fehérje kölcsönhatások fontos szerepet játszanak funkcionális MAPK jelátviteli hálózatokban. A moduláris domének szerepéről nem fog szó esni, mert ez a MAPK modulokon belüli jelátvitelben nem elterjedt, illetve a tirozin kinázokon alapuló jelátvitelben már egyébként is régóta intenzíven kutatott (Pawson & Nash 2003) (Kaneko et al. 2011). Az itt feltárt törvényszerűségek - például az evolúciósan gyorsan változni képes dokkoló motívumok vagy a jelátviteli enzimek kombinatorikus alkalmazását lehetővé tevő adapterek/állványfehérjék használata - valószínűleg érvényesek más fehérje kináz alapú rendszerekre is. Az értekezésem utolsó tanulmányában az utóbbira rá is mutatok. Ugyanis vizsgáltuk a lineáris motívumok és a dokkoló kölcsönhatások jelentőségét egy az AGC kinázok családjába tartozó élesztő NDR/LATS kináz-koaktivátor komplexen (Cbk1-Mob2) keresztüli jelátviteli folyamatokban is (Gógl et al. 2015).

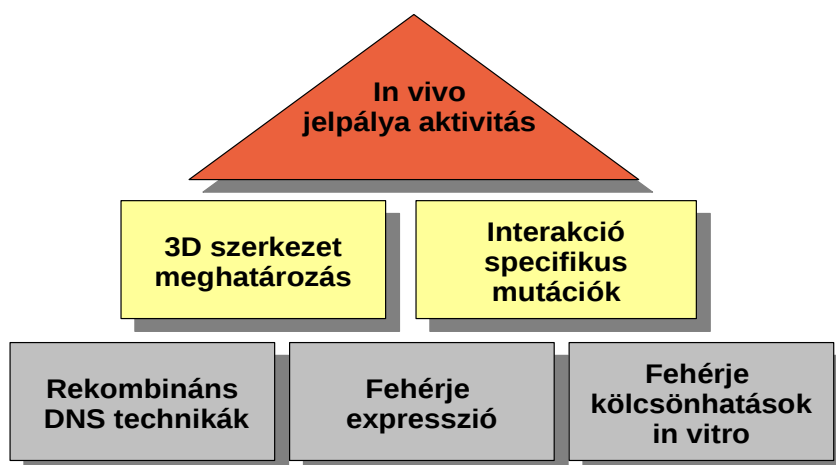
2. Célkitűzések

Munkánk során az élesztő és humán MAPK jelátviteli mechanizmusokat vizsgáltuk. Célul tűztük ki, hogy kutatók több évtizedes munkája alapján összegyűlt funkcionális tudásnak megteremtsük a molekuláris mechanizmus szintű alapjait. Ezen belül az alábbi kérdéseket tettük fel:

- 1) Milyen mechanizmusok alapján éri el a Ste5 vázfehérje a *Saccharomyces Cerevisiae* (élesztő) konjugációs jelpályájának megfelelő MAPK alapú szabályozását?
- 2) Mik a szerkezeti biokémiai alapjai a MAPK-ok és partner fehérjéik közötti bináris kapcsolatokat létrehozó rövid lineáris (dokkoló) motívumok specificitásának?
- 3) Hogyan lehet organizmusok MAPK kölcsönhatási mintázatait proteóm szinten feltárni?
- 4) Hogyan jönnek létre MAPK alapú magasabb rendű jelátviteli komplexek?
- 5) Mi a szerepe és szerkezeti alapja az AGC kinázok családjába tartozó élesztő Cbk1 kináz jelátvitelben megfigyelt dokkoló kölcsönhatásoknak?

3. Módszerek

Az alkalmazott kísérletes megközelítéseinket a jelátviteli fehérje-fehérje kölcsönhatások biokémiai, szerkezeti és funkcionális analizésére a **10. Ábra** összegzi. Rekombináns módon, heterológ expresszióval előállított, tisztított fehérjék segítségével vizsgáltuk a fehérjék kölcsönhatásait, egymásra gyakorolt hatását *in vitro*, feltártuk a kölcsönhatásért felelős régiók/komplexek háromdimenziós atomi felbontású szerkezetét, majd célzott mutációk segítségével vizsgáltuk egy-egy fehérje-fehérje kölcsönhatás jelentőségét sejtes alapú esszékben egy-egy jelátviteli folyamat kimenetelére. Az alábbiakban röviden ismertetem kísérletes megközelítéseink néhány további részletet. Természetesen ennél sokkal részletesebb leírások található az értekezésem háttérében álló már megjelent cikkeinkben. A pontos kísérleti körülményekre és a technikai kivitelezés részleteire is kíváncsi olvasót ezért „Az értekezés alapjául szolgáló publikációk listája” című részben található forrásokhoz irányítom. A fejezet megfelelő részein pedig hivatkozással jelzem, hogy a további részletek pontosan melyik cikkünkben találhatóak meg.



10. Ábra Jelátviteli komplexek működését vizsgáló kísérletes megközelítéseink sémája.

3.1. Rekombináns DNS technikák

Az értekezésben szereplő fehérje konstrukciók cDNS-ét PCR segítségével állítottuk elő saját készítésű élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) vagy humán HEK293 sejtekből származó cDNS keverékből. A PCR primerek tervezésekor az UniProt adatbázison keresztül elérhető cDNS szekvenciákat használtuk és az egyes teljes szekvenciájú cDNS klónok szekvenciáját DNS szekvenálással erősítettük meg. Munkánk során használt teljes szekvenciájú fehérjék UniProt azonosítóját a **Függelék F1 Táblázat** tartalmazza. Rövidebb konstrukciók előállítása a teljes szekvenciát tartalmazó DNS plazmid klón és PCR segítségével történt. Röntgen-szerkezetek,

interakciós felszínek/régiók fontos aminosav pozícióinak feltérképezéséhez szükséges mutánsok létrehozása a QuickChange (Stratagene) módszerrel vagy az ún. két lépéses, megaprimerek használatán alapuló PCR-rel történt a vad típusú konstrukciót tartalmazó expressziós vektorból kiindulva. A prokarióta (*E. Coli*) expresszióra szánt konstrukciókat párhuzamosan három saját fejlesztésű pET15b (Novagen) alapú vektorokba szub-klónoztuk: pBH4, PETARA és pET-MBP. Mindegyik vektorban létrehoztuk ugyanazt a multi-klónzó adapter szekvenciát, ami lehetővé tette a megfelelő helyre való gyors szub-klónozást ugyanazokkal a restriktív enzimpárokkal a három vektorban. A pBH4 vektor N-terminális His6-címkét tartalmazó fehérjék előállítását tette lehetővé, ami TEV proteázzal később levágható volt. A PETARA és pET-MBP vektorok pedig GST- illetve MBP-fúziós, szintén TEV proteázzal eltávolítható fehérjék expresszóját tette lehetővé. A C-terminális hisztidin-címke azonban a két utóbbi vektor segítségével termelt konstrukciók esetében nem volt eltávolítható.

Ha foszforilációs állapot szempontjából homogén fehérje kináz minta előállítására volt szükség, akkor egy olyan bicisztronikus, szintén saját fejlesztésű pET15b alapú vektorba (MG940) szub-klónoztuk a fehérje kináz cDNS-ét, ami tartalmazott egy GST-lambda foszfatáz vagy egy GST-aktivátor kináz fúziós konstrukciót is (pl. a foszforilált ERK2 előállításához az MKK1 MAP2K konstitutíven aktív GST fúziós változatát használtuk.)

Fehérje kinázok partnereiből származó (15-20 aminosav hosszú) rövid régiókat tartalmazó (GST/MBP) konstrukciók előállításához (pl. mesterséges foszforilációs riporterek vagy D-motívumot tartalmazó régiók pull down kísérletekhez) kémiai szintetizált egyszálú DNS oligonukleotidokat használtunk. A komplementer régiók hibridizálása után előállított ragadós végű, kettős szálú DNS darabokat fúziós fehérjék expressziójára alkalmas vektorokba ültettük, s a konstrukciókat kettős affinitás tisztítás után használtuk az in vitro kísérletekben.

3.2. Fehérje expresszió és tisztítás

A legtöbb esetben a fehérje kinázokat, kölcsönható partnereiket vagy ezekből származtatott rövidebb konstrukciókat *E. Coli Rosetta (pLysS)* (Novagen) sejtekben fejeztük ki. A konstrukciók kifejeztetése 37, 25 vagy 18 °C-on történt 3, 5 vagy 12 óráig 0.05-0.5 mM IPTG hozzáadásával LB médiumban. Sok esetben a megfelelő, legalább 1-2 mg tisztított fehérje / 1L LB médium kihozatal az expressziós eljárás optimalizációját igényelte. Ilyen esetekben a három fontos paramétert: fúziós címke, expressziós hőmérséklet és IPTG koncentráció szisztematikus módon változtattuk kis (50 mL-es) kultúrákban. Ha ezek közül egyik kondíció sem bizonyult ígéretesnek megfelelő mennyiségű oldható fehérje előállításához, akkor az SF9 rovar sejt alapú Bac-to-Bac (Invitrogen) baculovírusos rendszert használtuk a „problémás fehérjék” előállítására (pl. MKK5 és MEKK3

konstrukciók).

Mindegyik esetben az expressziós kultúra feltárása után az első tisztítási lépés a Ni-NTA oszlop használatán alapuló, hisztidin-címkére specifikus affinitás kromatográfiás eljárás volt. Ha a fehérje tartalmazott egy GST- vagy MBP-címkét is, akkor a következő lépés a megfelelő glutation vagy maltóz tartalmú gyantát használó affinitás lépés volt. Mielőtt a Ni-NTA vagy glutation/maltóz oszlopról a mintát a következő ion-csere kromatográfiás lépésre vittük tovább, az N-terminális hisztidin (pBH4) vagy GST (PETARA) vagy MBP (pET-MBP) címkét TEV proteáz segítségével távolítottuk el. Az ioncsere oszlopról (Resource Q vagy S; GE Healthcare) NaCl sógrádiens segítségével eluált mintát aztán betöményítettük legalább 10% glicerint tartalmazó tároló pufferben általában 10 mg/mL koncentrációra, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A kristályosításra szánt fehérje komplex mintákat a kölcsönható komponensek egyszerű összekeverése révén állítottuk elő, melyeket Superdex 75 vagy 200 (GE Healthcare) oszlopokon géliszűrtük.

3.3. Fehérje szerkezet meghatározás

A fehérje kinázok és komplexeik szerkezetét röntgendiffrakciós eljárással határoztuk meg, amihez a legtöbb időt és problémamegoldást a fehérjék kristályosítása vette igénybe. A fehérje kináz komplexek szerkezetének meghatározásához homológia modelleket használtunk és a szerkezetek megoldása a molekuláris helyettesítés módszerével történt.

Kristályosítási kísérleteinket ~10 mg/ml töménységű fehérje/komplex mintákkal kezdtük egy saját tervezésű PEG alapú, 48 kristályosító oldatot tartalmazó screen alkalmazásával. Ebben a screen-ben a pH és a vízfelvonó PEG-ek koncentrációja szisztematikus módon volt változtatva (grid screen), hogy felmérjük a fehérje komplexek oldhatóságát. Az itt kapott, oldhatóságra vonatkozó megfigyeléseink szolgáltak aztán alapul egyedi, mindegyik kristályosítani kívánt komplexre specifikus további, szintén PEG alapú screen-ek létrehozására (follow-up screen). Kristályosító kísérleteink az ún. függő cseppes gőzdiffúziós (vapour diffusion) módszerrel történtek. Kináz domént tartalmazó mintákhoz a koncentráció után, a kristályosítás előtt 2mM koncentrációban egy nem-hidrolizálható ATP nukleotidot (AMPPNP) adtunk. Mivel a vizsgált komplexek összeállása általában érzékeny volt a kristályosító oldatok ion-erősségére, ezért a sókoncentrációt alacsonyan tartottuk és kicsapószerként csak PEG-et használtunk; a pufferen felül adott egyéb sókoncentráció nem haladta meg a 200 mM-os koncentrációt. Az egykristály növesztéshez szükséges optimalizáció során használtunk járulékos (additive) anyagokat (pl. Additive Screen I, II; Hampton Research). A megfelelő méretű kristályokat folyékony nitrogénben, általában ~20-30% glicerinnel hozzáadása után fagyasztottuk. A végső röntgendiffrakciós adatgyűjtés az ALS Lawrence Berkeley National Laboratory-ban (USA) vagy a Swiss Light Source (SLS, Svájc) szinkrotron sugárforrásokon történt.

A kristályok előzetes tesztelését a University of California – San Francisco (UCSF, USA) illetve az ELTE Kémiai Intézet kisebb teljesítményű röntgen-forrásaival végeztük.

A MAPK-t tartalmazó fehérje-fehérje komplexeket általában 1:1,5 sztöchiometriában összekevert keverékből (a kisebb méretű fehérje javára) géliszűrővel állítottuk elő. MAPK-ok dokkoló peptidjeit kémiai szintézissel klasszikus Fmoc alapú eljárást használva állítottuk elő. Humán MAPK-ok dokkoló peptidjeikkel alkotott komplexeinek röntgendiffrakciós szerkezeti analízise során többször futottunk abba a problémába, hogy a viszonylag alacsony (1-10 mikromólos) kötődési affinitású, rövid (10-20 aminosav hosszú) peptidok nem kötődtek a vizsgált MAPK-hoz, pedig azokat a K_d feletti sokszoros (akár 100-szoros) koncentrációban használtuk a MAPK-ra nézve legalább háromszoros feleslegben. Ez sajnos legtöbbször csak a kristályszerkezet megoldása után derült ki. Az így kapott apo-ERK2 szerkezetek alapján azt találtuk, hogy ilyen esetben a MAPK dokkoló árkát egy szimmetria ekvivalens másik ERK2 molekulából származó hidrofób aminosav töltötte ki. Ezért kielemeztük, hogy ebben a „káros” pakolódásban milyen ERK2 felszíni aminosavak vesznek részt, és ezeket módosítva sikerült olyan ERK2 fehérjét előállítani, ami már képes volt úgy kristályosodni, hogy kötötte a vizsgált peptidet. Mivel a kis affinitású (mikromólos) komplexek esetében a szimmetria ekvivalensek közötti kristálypakolódásból származó hajtóerők összemérhetőek a gyengén kötődő kölcsönható partnerrel alkotott komplex képződés energiájával, ezért ez a szimmetria molekulák közötti „káros” pakolódás valószínűleg szélesebb körben is gátja lehet más jelátviteli komplexek kristályosításának. A másik megfigyelésünk pedig az volt, hogy a megoldott MAPK szerkezetek talán azért sem tartalmaztak dokkoló peptidet, mert a dokkoló árok egy kulcspozíciójában elhelyezkedő cisztein aminosava oxidálódott és ezáltal blokkolta a peptid kötődést (még redukálószerrel használata mellett is). Itt a megoldást a megfelelő szerin mutáns fehérje előállítása adta. Természetesen a kristályosítás csak egy eszköz arra, hogy eljussunk a vizsgált atomi felbontású szerkezetekhez, ezért alapvetően siker orientált tevékenység, de az ERK2 és rövid dokkoló peptidjei során felgyűlt tapasztalatainkat megkívántuk osztani szélesebb körben is, amit egy *Acta Crystallographica D: Biological Section* cikkben tettünk meg (Gógl et al. 2013).

Az értekezésemhez kapcsolódó munka kapcsán meghatároztuk a röntgendiffrakciós szerkezetét hét különböző fehérje kináznak (5 MAPK, egy NDR/LATS kináz és egy CAMK), főleg valamilyen peptiddel vagy teljes kölcsönható partnerrel komplexben. Ennek a több mint 20 apo-fehérje vagy fehérje-peptid illetve fehérje-fehérje komplexnek a listáját a megfelelő PDB kódokkal együtt a **Táblázat 3** tartalmazza.

Fehérje vagy komplex neve	PDB ID	Referencia
Fus3-pepSte5	2F49	(Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006)
Ste5ms	3FZE	(Good et al. 2009)
Fus3-pepSte7	2B9H	(Reményi et al. 2005)
Fus3-pepMsg5	2B9I	(Reményi et al. 2005)
Fus3-pepFar1	2B9J	(Reményi et al. 2005)
apoFus3	2B9F, 2FA2	(Reményi et al. 2005), (Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006)
pY-Fus3	2F9G	(Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006)
ERK2-pepMKK2	4H3Q	(Gógl et al. 2013)
ERK2-pepMNK1	2Y9Q	(Garai et al. 2012)
ERK2-pepRSK1	3TEI, 4H3P	(Garai et al. 2012), (Gógl et al. 2013)
ERK2-pepSzint_revD	4FMQ	(Garai et al. 2012)
ERK2-RSK1c	4NIF	(Alexa et al. 2015)
ERK5-PB1-D	4IC7	(Glatz et al. 2013)
apoERK5	4IC8	(Glatz et al. 2013)
JNK1-pepNFAT4	2XRW, 2XS0	(Garai et al. 2012)
p38-pepMKK6	2Y8O	(Garai et al. 2012)
Cbk1-Mob2	4LQS, 4LQP, 4LQQ	(Gógl et al. 2015)

Táblázat 3. A röntgendiffrakcióval meghatározott fehérje szerkezetek listája

3.4. Fehérje kölcsönhatási esszék

Fehérjék közötti kölcsönhatásért felelős régiók térképezésére GST/MBP alapú pull down kísérleteket használtunk. A teljes hosszúságú fehérjéknél rövidebb konstrukciókat PCR segítségével állítottuk elő. Fehérje kinázok és teljes szekvenciájú kölcsönható partnereik közötti kötődési affinitások meghatározására néhány esetben felületi plazmon rezonancia (SPR) kísérleteket is használtunk. Fehérje kinázok és dokkoló peptidjeik közötti kölcsönhatási affinitás mérését pedig egy fluoreszcencia polarizáció (FP) alapú módszerrel végeztük. A mérés során TAMRA-(tetrametilrodamin) és CF-(karboxifluorescein) jelölt peptideket használtunk fluoreszcens riporterként. A mérés elvi alapja, hogy ha egy fluoreszcensen jelölt molekulát síkban polarizált fényvel világítunk meg, akkor azok olyan fluoreszcens fényt bocsájtanak ki, melynek polarizációs fokát a molekula mérete, azaz a komplex képződés mértéke határoz meg. Minél kisebb méretű egy molekula, annál gyorsabban képes forogni az oldatban, és a mozgás gyorsaságának arányában a

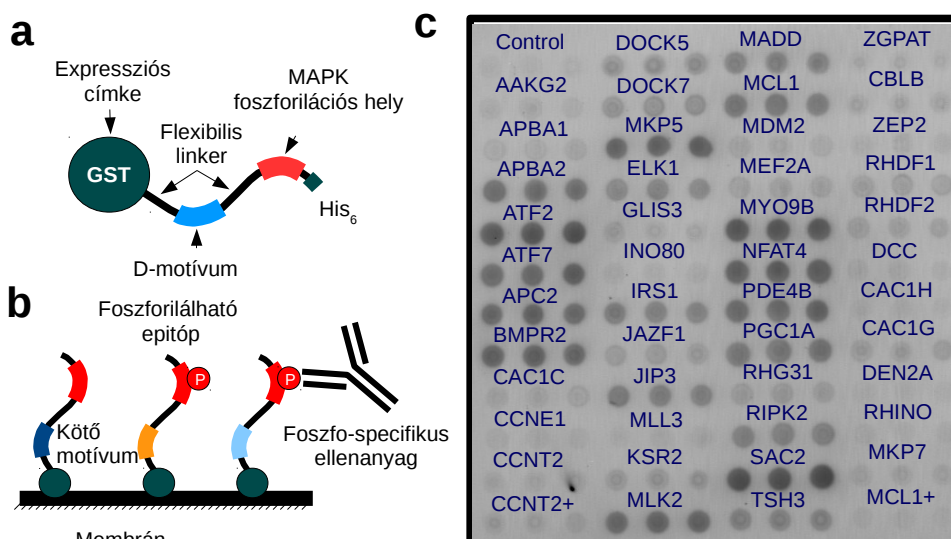
fluoreszcens fény polarizáltsága csökken vagy megszűnik. Azonban, ha a jelölt peptid egy nagyméretű fehérjéhez kötődik, akkor a forgása jelentősen lelassul (egy D-motívumot tartalmazó 10-15 aminosav hosszú peptidhez való MAPK kötődés kb. 20-szoros molekulatömeg növekedést okoz), és így a kibocsájtott fény polarizáltsága megmarad, azaz a jel nő. A módszer alkalmazható minden olyan kölcsönható partner affinitásának a meghatározására is, ami ugyanazt az interakciós felszínt használja mint a jelölt peptid. Ilyenkor egy kompetitív titrálásos esszében meghatározható a jelöletlen molekula K_i értéke (ami az utóbbi kötődési affinitását jellemzi) (Garai et al. 2012).

3.5. Fehérje kináz aktivitás esszék

A különböző aktivátor kinázokkal – pl. konstitutívan aktív, az aktivációs hurkon foszforilációt imitáló glutaminsavat vagy aszpartátsavat tartalmazó MAP3 kinázok, MAP2K-ok vagy Cbk1 és MAP kinázok (MAP2K-zal ko-expresszált vagy utólag in vitro felfoszforilált MAPK-ok) – végzett kísérletek során radioaktív ^{32}P - γ ATP segítségével vizsgáltuk a különböző szubsztrátok foszforiláltsági fokát. A kísérlet során 0,1-0,5 μM -os aktivátor és 1-10 μM -os szubsztrát koncentrációkkal dolgoztunk. A reakciót az ATP mix hozzáadásával indítottuk, majd EDTA-t tartalmazó 4 x SDS fehérje felvivő pufferrel állítottuk le. Különböző időközönként reakcióelegyekből mintát vettünk, majd SDS-PAGE-re vittük fel a mintákat. A géleket Coomassie festékkel festettük, szárítottuk, majd a foszforiláció mértékét foszfor imaging (Storage Phosphor Screen és Typhoon Scanner, GE Healthcare) segítségével határoztuk meg.

A kísérletekben vagy legalább kettős affinitás tisztításon (pl. PETARA, pET-MBP konstrukciók) vagy egy Ni-NTA és ioncsere kromatográfiás kettős tisztítási lépéseken átesett fehérje mintákat (pBH4 konstrukciók) használtunk. Fehérje kinázok aktivációs hurkon való foszforiláltságát az adott szekvenciára specifikus anti-foszfo ellenanyagok segítségével Western-blot eljárással ellenőriztük.

A MAPK D-motívumok feltérképezésére használt dot-blot membránokat Hamilton Starlet pipettázó robot segítségével készítettük, ahol kb 1 mikrogramm GST-fúziós MAPK foszforiláció szenzor konstrukciót pipettáztunk nitrocellulóz membránra, amiket aztán a membránt befedő mennyiségű kináz pufferbe adott kb ~ 100 nM-os foszforilált MAPK-zal foszforiláltattunk. A kötődés kiolvasása indirekt történt, a D-motívum által elősegített MAPK célszekvencia foszforilációjának nyomon követése révén, anti-foszfo ellenanyaggal és Western-blot eljárással (HRP, ECL). A membránokra nyomtatott konstrukciók foszforilációjának mértékét lumineszcencia detektálására alkalmas CCD kamerával végeztük (**11. Ábra**).



11. Ábra Foszforiláció alapú dot-blot módszer sémája a MAPK-D-motívumok kölcsönhatásának tesztelésére

(a) A GST fúziós mesterséges foszforilációs szenzor konstrukciókat (b) nitrocellulóz membránba pipettáztuk. A c panel mutatja egy 48 konstrukciót tartalmazó panel JNK általi foszforilációjának eredményét (három párhuzamossal, a D-motívumot tartalmazó fehérjék neveinek feltüntetésével).

3.6. Sejtes alapú vizsgálatok

Az élesztő in vivo kísérleteket, ahol az adott mutációk hatását a MAPK vagy Cbk1 alapú jelátviteli folyamatokban vizsgáltuk a UCSF-en (San Francisco, USA) dolgozó egykori kollégáim illetve a Northwestern University-n (Chicago, USA) dolgozó együttműködő partnereim végezték (Gógl et al. 2015). A MEKK2/3 nem-degradatív típusú ubiktivinációjának jelentőségét az ERK5 jelátvitelben pedig egy német kutatócsoporttal együttműködésben vizsgáltuk (Goethe University, Frankfurt). A projekthez kapcsolódó humán primér mioblastokon a kísérleteket az együttműködő csoport végezte (Takeda et al. 2014). Az alábbiakban csak a HEK293 sejteken végzett vizsgálatainknak a részleteit ismertetem röviden.

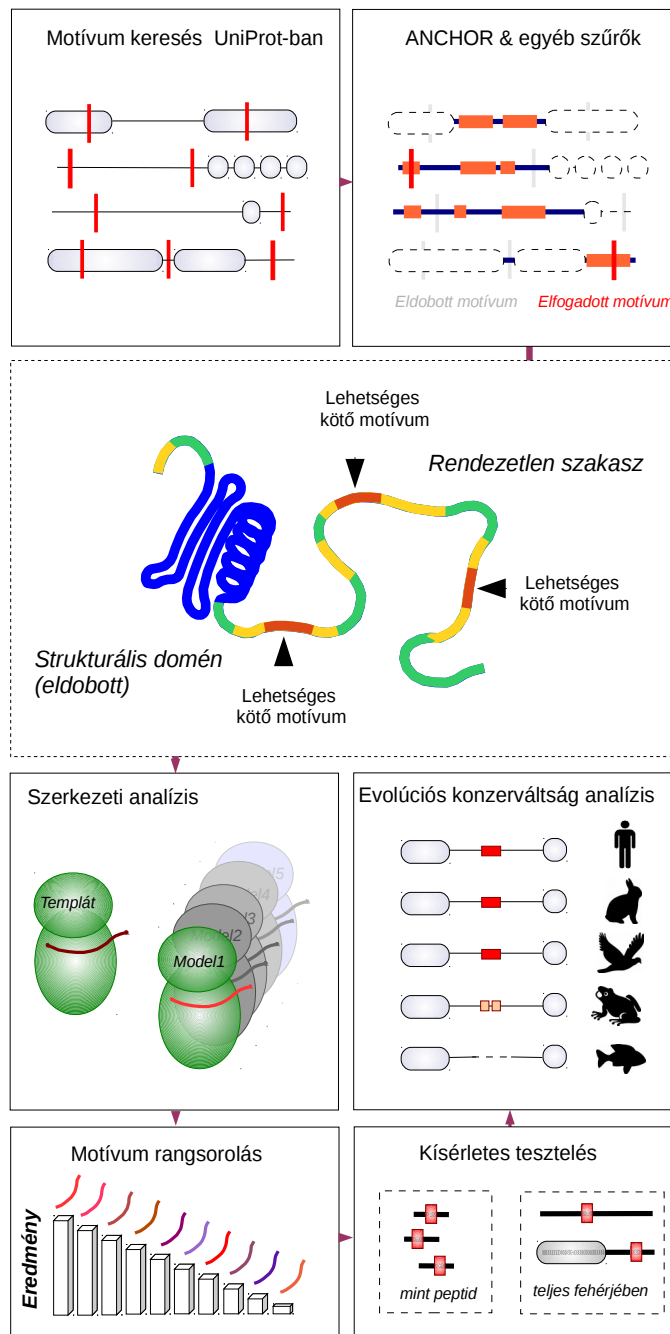
A bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció (BiFC) módszer fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatását teszi lehetővé élő sejtekben. A kísérletekhez olyan pcDNA3.1 vektorokat (Invitrogen) alkalmaztunk, amelyek tartalmazzák a YFP (sárga fluoreszcens fehérje) génjét. A komplementációs kísérletekhez úgy módosítottuk a konstrukciót, hogy a YFP fehérjét egy N- és egy C-terminális félre bontottuk a (159. aminosavnál), és a két fragmens DNS-t külön-külön építettük be a vektorokba eltérő konstrukciókat képezve ('F1 és F2 fragmensek'). A MAPK fehérje C-terminálisára az F1, míg a MAPK partner fehérje konstrukciók esetében az F2 YFP fragmentum

lett beékelve. Ha a két vektorból átíródó fúziós fehérje képes interakcióba lépni egymással, akkor az F1 és F2 YFP fragmensekből összeáll egy fluoreszcens YFP. A YFP megfelelő hullámhosszú megvilágításra fluoreszcens jelet bocsájt ki, míg a fragmensek önmagukban ideális esetben nem adnak jelet. A HEK293T sejtek DMEM tápoldatban voltak növesztve 10% FBS standard körülmények alatt. A tranziens transzfekcióhoz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) reagenst használtunk. A mérést Synergy H4 (BioTek Instruments) lemezleolvasó készülékkel végeztük, a transzgének expresszióját pedig anti-FLAG Western-blottal ellenőriztük, mert az F1 és F2 fúziós konstrukciók a C-terminálison tartalmaztak FLAG címkét. A sejtek mikroszkópos megfigyelése konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal történt.

HEK sejtekben az EGF stimuláció (50 nM) hatását az ERK2 MAPK és RSK1 MAPKAPK foszforilációra vizsgáltuk, miután a sejteken egy éjszakán át szérum mentes tápoldatban tartottuk. Az endogén ERK2-n keresztüli, pcDNA3.1 vektor segítségével tranziensen kifejezett vad típusú és mutáns RSK1 konstrukciók aktivációját anti-foszfo RSK1 ellenanyaggal, Westen-blottal követtük nyomon.

3.7. Bioinformatikai analízisek

Kidolgoztunk egy bioinformatika eljárást humán MAPK motívumok proteóm szintű azonosítására. A módszer, más lineáris motívum kereső eljárásokkal ellentétben, térszerkezeti információkat is alkalmaz egy adott konszenzussal rendelkező szekvencia „jóságának” a becslésére (12. Ábra).



12. Ábra MAPK kötő D-motívumok proteóm szintű keresésére alkalmazott módszer sémája

Az evolúciós konzerváltság analízis, a motívumok nagymértékű evolúciós plaszticitása miatt, nem volt része a motívumok rangsorolásának, hanem az analízist csak a motívumok evolúciós megjelenésének vizsgálatára használtuk. Az ANCHOR (Dosztányi et al. 2009) mellett alkalmazott egyéb szűrők magukba foglaltak az extracelluláris, hozzáférhetetlen intracelluláris kompartmentekben (pl. Golgi, ER, mitokondrium, stb) lévő vagy transzmembrán, szignál peptid illetve coiled-coil régiók kiszűrésére alkalmas bioinformatikai algoritmusokat.

Humán fehérjék rendezetlen régiójából egyszerű szekvencia mintázat kereső algoritmussal

megkerestük az összes olyan régiót ami összeférhető a szerkezeti és biokémiai vizsgálataink alapján felállított tízféle MAPK kötő D-motívum definíciók egyikével (**Függelék F2 Táblázat**). Csak a MAPKAPK szubsztrát kinázokból ismert hosszabb revD motívumokat végül proteóm szinten külön nem vizsgáltuk, s ezek nem lettek részei a bioinformatikai analízisnek. D-motívumok konszenzus szekvenciáival összeegyeztethető rendezetlen régiók nagy száma miatt (~10,000) az ANCHOR módszerrel illetve egyéb szekvencia alapú (pl. sejten belüli lokalizációt jósló és transzmembrán fehérjék esetén például topológiai szűrésre alkalmas) bioinformatikai módszerekkel a találati listát tovább szűrtük, majd az így redukált kb ~2,000 db tizenöt aminosav hosszú fehérje régiót aztán a FOLDx eljárás segítségével szerkezeti kompatibilitás analízisnek vetettük alá a megfelelő MAPK-D-peptid szerkezeti modell segítségével (Zeke et al. 2015) (**Függelék F2 Táblázat**).

Egy dot-blot alapú foszforilációs esszé segítségével meghatároztuk egy adott tesztelt D-motívum hatását a D-motívumot nem tartalmazó kontrollhoz képest minden egyes MAPK-ra. Az így kapott értékek alapján egy bizonyos küszöbérték felett teljesítő motívumokat vettük pozitívnak. A megfelelő számú motívumot tartalmazó D-motívum osztályokra felállítottunk egy-egy pozíció-specifikus pontozó mátrixot (PSSM). Ezzel lehetővé vált a humán proteómban lévő adott konszenzus szekvenciával rendelkező bármely rendezetlen régió MAPK kötődésének kvantitatív jóslása. Minél nagyobb szekvencia hasonlóságot mutatott egy adott szekvencia egy nagy számú, kísérletesen ellenőrzött D-motívumokból álló halmaz alapján előállított PSSM-mel, annál valószínűbb, hogy MAPK-hoz jól kötődik. Négy D-motívum osztályban (JIP1, NFAT4, MEF2A és DCC) sikerült annyi evolúciósan független, leellenőrzött példát összegyűjteni (21, 15, 15 és 6), a különböző gerinces ortológ organizmusokban lévő összes D-motívum szekvenciákkal való kiterjesztés után, amik alapján az első három osztályra megbízhatóan teljesítő pontozó mátrixokat tudtunk felállítani. A humán motívumokkal homológ D-motívumok bevonása a PSSM felállításához beismerten mesterséges módon növelte az ellenőrzött D-motívumok alapján létrehozható szekvencia teret, ezt valamennyire ellensúlyoztuk azonban azzal, hogy az egyes organizmusokból származó homológ szekvenciák hozzájárulását a PSSM-hez az adott organizmus embertől mért filogenetikus távolságával súlyoztuk (Zeke et al. 2015). Az így felállított három PSSM-et (JIP1, NFAT4, MEF2) már megbízhatónak ítéltük olyan osztályozó eljárások létrehozására, melyek megbízhatóan voltak képesek az ismert pozitívok és „szimulált” negatívok megkülönböztetésére. Természetesen a „training” és teszt csoportokban eltérő ismert pozitívokat használtunk, míg a „szimulált” negatívok halmazát az adott D-motívum konszenzussal egyező, de ismertén strukturált doménben elhelyezkedő régióból vettük (ugyanis ezekre feltételezhetően csupán a domén integritásáért felelős evolúciós kényszerek hatnak, s MAPK-ok számára egyébként is hozzáférhetetlenek.)

3.8. Molekuláris dinamikai szimulációk és *in silico* dokkolás

Molekuláris dinamikai (MD) szimulációk alkalmasak allosztérikus jelenségek vizsgálatára. Kristályszerkezetek viszont önmagukban nem alkalmasak a dinamikus viselkedés jellemzésére, mert egy adott fehérje vagy komplex lehetséges állapotairól általában csak pillanat felvételeket szolgáltatnak. Ezek a pillanat felvételek azonban remek kiindulási pontjai lehetnek MD szimulációs vizsgálatoknak. Fehérje kinázok tanulmányozása a negyedik (idő, 4D) dimenzióban azért is fontos, mert molekuláris kapcsolóként működnek, ahol kötődési vagy foszforilációs események allosztérikus módon változtatják meg az enzim működését. Továbbá, fehérje kinázok sokszor tartalmaznak kisebb-hosszabb flexibilis, azaz jól jellemezhető szerkezettel nem leírható régiókat. Ez az MD során kihívást jelent. Ennek ellenére Hetényi Csabával (ELTE Biokémiai Tanszék) együttműködésben az ERK2-RSK1 és Cbk1-Mob2 komplexekre sikerült olyan MD eljárásokat kidolgozni, melyek segítségével létrehozhattunk a komplexek dinamikus működésére vonatkozó modelleket. A szimuláció alapú predikciók a modellek ellenőrzésére felállított kísérletek tervezésében voltak fontosak. Utóbbiak pedig az MD-s predikciók bizonyítását hozták, s ezzel olyan újszerű betekintést kaptunk a fehérje kináz komplexek működésébe, ami klasszikus 3D szerkezeti analízisek segítségével elérhetetlen lett volna.

A molekuláris dinamikai szimulációk kiindulási modelljei vagy kristályszerkezetek (pl. ERK2-RSK1, Cbk1-Mob2) vagy ezekre illesztett homológia modellek voltak (pl. ppERK2-RSK1 vagy pCbk1-Mob2). Ha a kiindulási szerkezetekből régiók hiányoztak, akkor azokat kézi modellépítéssel pótoltuk és a hiányzó részeket általában nyújtott konformációban építettük be (pl. az RSK1 aktivációs hurkának hiányzó kb 10 aminosavas szakasza, a Cbk1-Mob2 komplexben a hidrofób motívum (HM) és kináz domént összekötő 35 aminosavas köztes régiója vagy a Cbk1 kb 80 aminosav hosszú aktivációs hurka), vagy rokon szerkezetekből szuperponálás révén a modellre illesztett homológ szakaszok konformációját követve (pl. a. Cbk1 domén α C hélice, kb 20 aminosav). Az MD szimulációk előtt minden esetben egy energia minimalizációs algoritmus segítségével optimáltuk a beépített szakaszok konformációját, majd egy megfelelő méretű vizes kockában elindított MD szimuláció során a komplexek dinamikáját legalább 100 ns-ig követtük nyomon.

A Cbk1-Mob2 komplex szabad, kényszermentes MD szimulációja során a mesterségesen beépített hosszú flexibilis szakaszok olyan nagy mértékű fluktuációt mutattak, ami lehetetlenné tette a kináz domén és HM közötti régiók allosztérikus kapcsolásának vizsgálatát. Ezért ezeket a régiókat vagy kihagytuk az MD modellből (Cbk1 aktivációs hurok) vagy egy 100 ns hosszú előzetes MD

futtatás során „egyensúlyba” hoztuk, és ebből a konformációból indítottuk a végső MD analízist.

A Cbk1 dokkoló árok *in silico* azonosítására az acetyl-DFKFP-methyl Ssd1 pentamer peptidet használtuk, ahol „vak” dokkolást végeztünk a Cbk1-Mob2 kristályszerkezetből származó α C hélixszel kiegészített NDR/LATS kináz doménon (Gógl et al. 2015). Ugyanezzel a peptiddel egy finomabb fókuszált dokkolást és elvégeztünk a „vak” dokkolások során halmozottan előforduló feltételezett dokkoló hasadékba. A dokkolás során a pentamer peptid szabadon rotáló ligandumként volt kezelve, és a naív és fókuszált dokkolási eljárások során a peptid ligandum konformációja hasonló volt. Az így azonosított Cbk1 dokkoló árkot illetve a peptid konformációját mutációs analízissel, kötődési esszékkal kísérletesen validáltuk (Gógl et al. 2015).

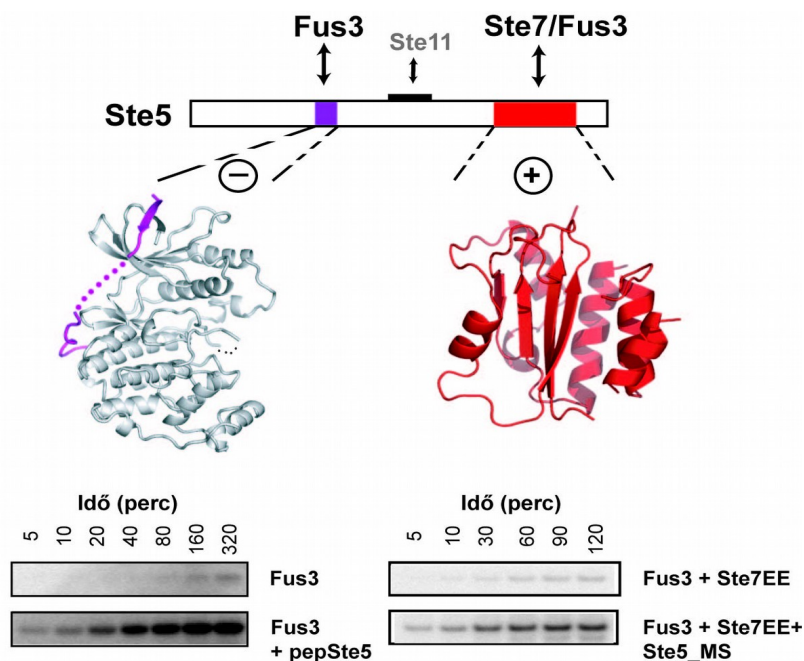
4. Eredmények

4.1. A Ste5 vázfehérje szerepe az élesztő konjugációs MAPK jelpályában

Az első jelátviteli vázfehérjét (Ste5) már több mint két évtizede leírták (Choi et al. 1994). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy vázfehérjék csupán passzív módon segítik a fehérje kinázok közötti információáramlást. Mivel ezek a fehérjék a MAPK modul több komponensének kötésére alkalmas domént tartalmaznak, így az egymást aktíváló fehérje kinázok lokális koncentrációját növelve segítik a jelterjedést (Zeke et al. 2009). Az utóbbi évek során azonban sikerült bizonyítani, hogy vázfehérjék ennél sokkal érdekesebb módon is képesek jelpályák aktivitását modulálni (Alexa et al. 2010). Ennek a munkának a keretében először arra voltunk kíváncsiak, hogy a Ste5 fehérje melyik része kötődik a Fus3 MAPK-hez. *In vitro* fehérje-fehérje interakció detektálásán alapuló kísérletekben azt találtuk, hogy egy kb. 30 aminosav hosszúságú Ste5 peptid (pepSte5) nagy affinitással képes Fus3-t kötni (Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006). Érdekes módon a peptid alloszterikus módon aktiválja Fus3-t *in vitro* (**13. ábra**). A Fus3-pepSte5 komplex kristályszerkezete fényt derített ennek a szokatlan jelenségnek a molekuláris mechanizmusára is. A pepSte5 a kináz mindkét lebenyéhez egyidejűleg kötődik, s valószínűleg a két lebeny közötti dinamikus mozgásokat módosítja oly módon, hogy az a MAPK auto-aktivációját eredményezi. A Fus3-pepSte5 kristályszerkezet birtokában lehetővé vált ennek a vázfehérje által generált alloszterikus jelenségnek az *in vivo* vizsgálata. A Ste5 génjének megváltoztatása révén olyan élesztő törzseket állítottunk elő, amelyek a pepSte5 régióba bevitt mutációk révén megszüntetik a Fus3-pepSte5 interakciót. Így ezekben a törzsekben a Ste5 által közvetített alloszterikus aktiváció hiányzik. Meglepő módon α -faktor stimuláció után mégis lényegesen nagyobb konjugációs pályaktivitást mértünk. További kísérletekkel aztán bebizonyítottuk, hogy a Ste5 vázfehérje által közvetített alloszterikus MAPK aktiváció egy, a konjugációs pályán belüli negatív visszacsatolás (feed-back) generálásában fontos. Ez a pálya aktivitást negatív módon befolyásolja, s megszüntetése a mutáns törzsekben végső soron a teljes pálya aktivitás növekedését eredményezte (Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006). Érdekes, hogy egy ilyen feed-back mutáns élesztő törzs képtelen volt az alfa-típusú konjugációs partner jelenlétét érzékelni, s annak irányába nyúlványt növeszteni, az alfa faktor grádiens érzékelésében mutatott hiányossága miatt (Malleshaiah et al. 2010).

Egy további munkánkban a Ste5 fehérje MAPKK \rightarrow MAPK információátvitelben játszott szerepének felderítését vizsgáltuk. Ez az a terület, ahol a dokkoló és vázfehérjék által közvetített fehérje-fehérje kölcsönhatások jelentősége a pályák szelektív jelterjedésében talán a legjobban

szemléltethető. Érdekes, hogy a filament képző és a konjugációs MAPK pálya ugyanazt a MAPKKK-t (Ste7) tartalmazza (lásd 5. **Ábra**). Kísérletekkel bizonyítható, hogy Ste7 aktiváció után a filament képző MAPK (Kss1) foszforilálása csupán intakt dokkoló kölcsönhatást igényel és vázfehérje jelenlétére nincs szükség (Good et al. 2009). Ez élesen különbözik a konjugációs MAPK (Fus3) példájától: a Fus3 foszforilálásához intakt dokkoló kölcsönhatás a Ste7-hez nem elégséges, de szükséges feltétel. A Ste7 → Fus3 információátvitel Ste5 jelenlétét is igényli. Ez genetikai alapú *in vivo* kísérleteken kívül szintén bemutatható tisztított, rekombináns komponensekkel is *in vitro*. Egy *in vitro* MAPK aktivitás detektálásán alapuló módszer segítségével megállapítottuk, hogy a Ste7 → Fus3 foszforiláció közvetítéséhez szükséges Ste5 régió egy ~200 aminosavat tartalmazó strukturális elem (Ste5_MS: Ste5_MiniScaffold) (**13. Ábra**). Ennek a doménnek a szerkezetét szintén meghatároztuk és további kísérletek során azt találtuk, hogy a Ste5_MS egyaránt képes Ste7-hez és Fus3-hoz is kötődni. A Ste7/Fus3/Ste5_MS tehát egy olyan fehérje komplex, amelyben dokkoló és vázfehérje kölcsönhatások egymással együttműködve hoznak létre egy produktív MAPKK-MAPK enzim-szubsztrát komplexet (Good et al. 2009).



13. ábra Ste5 vázfehérje összetett szerepe a Fus3 aktivitásának szabályozásában

Ste5, a Ste11 MAPKKK kötési régió kivételével, két jól elkülöníthető funkcióval rendelkező kináz interakciós domént is tartalmaz: pepSte5 és Ste5_MS. Előbbi szerkezete Fus3-val komplexben a bal oldalon, míg az utóbbi szerkezete a jobb oldalon látható. pepSte5 allosterikus módon növeli Fus3 autoaktivitását, ami azonban a jelpálya aktivitását negatívan befolyásolja *in vivo* (-) (lásd szöveg). Ugyanakkor intakt Ste5_MS domén szükséges Ste7 általi hatékony Fus3 foszforilációhoz, ez a domén tehát a jelpálya aktivitását növeli (+). (Az ábra alsó panelje Fus3 foszforiláció nyomon

követésére alkalmas ^{32}P autoradiogramokat mutat. Ezekben az *in vitro* kináz esszéekben tisztított rekombináns fehérje komponenseket kevertünk össze majd a MAPK foszforilációját időben követtük nyomon. Az egyes fehérjék 1 mikroM-os koncentrációban voltak jelen. Ste7EE: a MAPKK egy konstitutív aktív formája, mely Ste11 foszforilációtól függetlenül is aktív.)

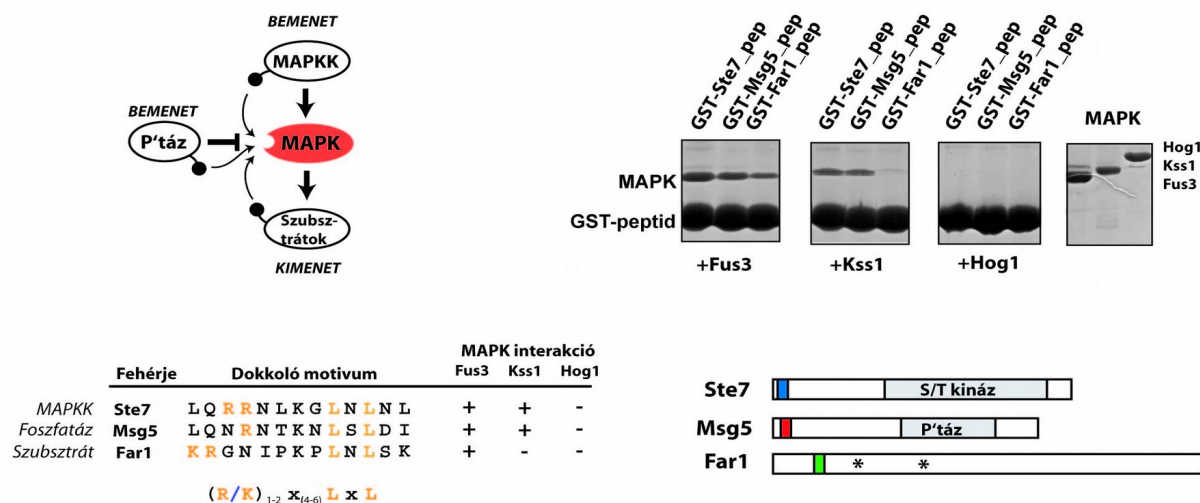
4.2. MAPK kötő lineáris motívumok specificitása

A konjugációt, filament képződést és az ozmoregulációt *Saccharomyces cerevisiae* (továbbiakban csak élesztő) esetében különböző MAP-kinázok (Fus3, Kss1 és Hog1) szabályozzák (lásd **5. és 8. Ábra**). Bár ezek a pályák alapvetően különböző sejtes folyamatokat szabályoznak, a bemenet és kimenet közötti jelfeldolgozás több esetben ugyanazon a fehérje kinázon keresztül valósul meg (Breitkreutz & Tyers 2002) (Reményi et al. 2005). Például a Ste11 MAPKKK mindhárom pálya esetében közös, míg a konjugációs és filament képző pálya megfelelő MAP-kinázának aktiválása mindkét esetben a Ste7 MAPKK által történik. Egyik tanulmányunk keretében a Fus3 és Kss1 MAPK pályák eltérő aktivációja mögötti molekuláris folyamatokat vizsgáltuk.

4.2.1. Az élesztő Fus3 MAPK kölcsönhatásai

Mivel MAP-kinázok központi jelátviteli enzimek, kölcsönhatásaik más fehérje partnerekkel szükségszerűen sokrétű. Aktivitásuk a velük kölcsönhatásba lépő egyéb kinázok és foszfatázok közreműködésével változik, míg információfeldolgozás szempontjából egyfajta kimenetként szubsztrát fehérjék (pl. transzkripciós faktoroknak, a citoskeleton, transzport vagy éppen a sejtciklus fontos fehérjéinek) foszforilációját idézik elő (**14. Ábra**). Legelőször azt vizsgáltuk, hogy a Fus3 MAPK hogyan kötődik a konjugációs pálya aktivitásában kulcsfontosságú szerepet játszó egyéb fehérjékhez. A Ste7 MAPKK α -típusú élesztő sejtekben a Fus3 enzimet aktiválja α -típusú konjugációs partner (vagy α -faktor) jelenlétében, az Msg5 foszfatáz a jelpálya alapállapotba való visszatérésében fontos az inger megszűnte után, a Far1 nevű citoplazmás fehérje foszforilációja pedig a sejtciklus átmeneti felfüggesztését eredményezi. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy mind a három eltérő funkciójú MAPK partner egy rövid peptidszekvencián keresztül lép kölcsönhatásba a Fus3-mal. Ezek közös vonása, hogy egy $(\text{R/K})_{1-2}\text{X}_{4-6}\text{LXL}$ konszenzus motívumot tartalmaznak, ahol egy vagy két pozitív töltésű aminosavat és egy hidrofób szakaszt változatos szekvenciájú köztes régió választ el. Érdekes módon ezek a rövid peptidmotívumok az élesztő MAPK-hálózat logikájának megfelelően lépnek interakcióba a három már korábban ismertetett enzimmel (Fus3, Kss1 és Hog1). Ste7 és Msg5 fehérjék a Fus3 és Kss1 aktivitását szabályozzák és ennek megfelelően a belőlük származó peptidek (Ste7_pep és Msg5_pep) egyaránt kötik mindkét MAPK-

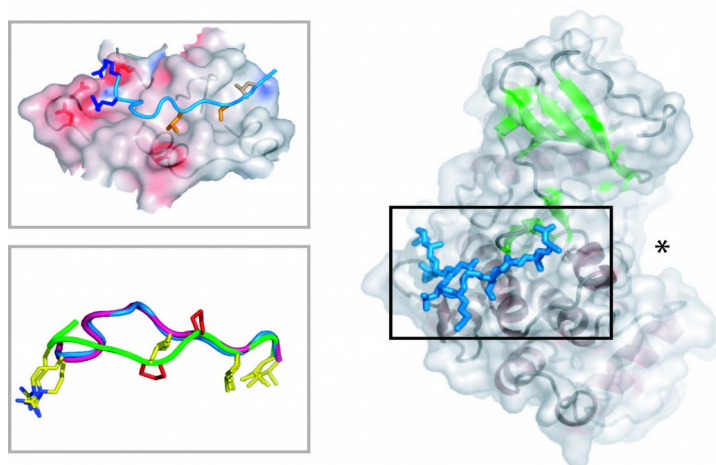
t, míg a konjugációs pályára specifikus Far1 fehérjéből származó peptid (Far1_pep) szelektív módon kötődik csak Fus3-hoz (14. Ábra).



14. ábra Dokkoló kölcsönhatások szelektivitása élesztő MAPK jelpályákban

MAPK interakciós partnerei általában tartalmaznak egy rövid (kb. 10-15 aminosav) hosszú peptidszakaszt, mely a kináz dokkoló hasadékába kötődik. A fenti fehérje-fehérje interakció detektálására alkalmas kísérlet bizonyítja, hogy a Fus3 MAPK három interakciós partneréből (Ste7, Msg5 és Far1) származó rövid peptidmotívumok szelektív módon képesek bináris asszociációkat létrehozni. A peptideket GST-fúziós fehérjékként állítottuk elő, gyantához kötöttük és a három MAPK - Fus3, Kss1 és Hog1 – kölcsönhatásait SDS-PAGE segítségével követtük nyomon. Az ismert Fus3 foszforilációs célszekvenciákat * jelöli.

A továbbiakban meghatároztuk a Fus3 MAPK kristályszerkezetét a fenti peptidekkel komplexet alkotva (15. Ábra) (Reményi et al. 2005). Ez a szerkezeti biokémiai munka a dokkoló hasadék és a dokkoló peptid komplementaritásán túl szintén fényt derített a Far1 peptid szelektivitásának hátterére. Ez a peptidszekvencia a köztes régióban két prolin aminosavat tartalmaz és ezek jelenléte egy polyprolin II típusú hélixet generál, ami összeférhetetlen a Kss1 dokkoló hasadékával. Ste7 és Msg5 peptid köztes régiója viszont β -kanyar konformációt alkot, ami lehetővé teszi mindkét MAPK-val való interakciót.

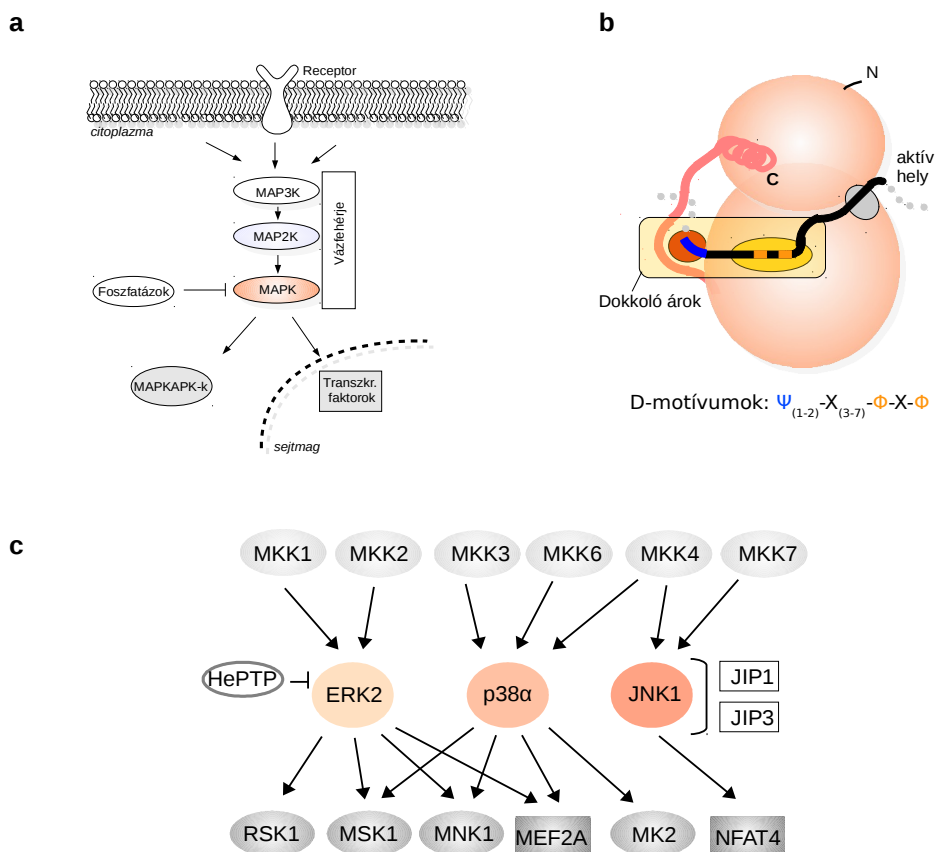


15. ábra Fus3 MAPK dokkoló kölcsönhatásainak szerkezeti analízise

A jobb oldalon a Fus3-pepSte7 komplex kristályszerkezete, míg a baloldalon felül a dokkoló hasadék nagytájtva látható. (A felület az elektrosztatikus potenciáljának megfelelően van színezve). Ezen az ábrán jól megfigyelhető a dokkoló peptid konszenzusa, $(R/K)_{1-2}X_{4-6}LXL$, és a dokkoló hasadék szerkezete közötti komplementaritás. Az alsó panel a Fus3 MAPK dokkoló hasadékába kötődő három különböző interakciós partnerből származó dokkoló peptidek konformációját szemlélteti (Ste7, kék; Msg5, bíbor; Far1, zöld). A Far1 peptidben jelenlévő, a Fus3 és Kss1 MAPK közötti specificitásért felelős prolin aminosavak pirosra vannak színezve. A Fus3 aktív helyét * jelzi.

4.2.2. Humán MAPK-ok kölcsönhatásainak specificitása

Elterjedt nézet, hogy a protein kinázok szubsztát specificitását általában az aktív helyet határoló aminosavak határozzák meg (Mok et al. 2010). Ez azonban a MAP kinázok esetében nyilvánvalóan másképp van, hiszen egy, a foszforilálható aminosavat követő prolin aminosav mint konszenzus szekvencia nem elégséges követelmény a csoport egyes tagjainak – pl. ERK, JNK vagy p38 emlős MAP kinázok – szubsztát specificitásának jellemzésére. Ma már ismert, hogy sok fehérje kináz az aktív helytől független mechanizmusokon keresztül választja ki célfehérjéit; nevezetesen ún. dokkoló vagy vázfehérjéken történő asszociációk révén (Bhattacharyya, Reményi, Yeh, et al. 2006). A dokkoló kölcsönhatások olyan bináris fehérje-fehérje kölcsönhatások, melyek a tranziens természetű enzim-szubsztát kötődésen felül, attól eltérő módon segítik elő a kináz és a partnere közötti interakciót. Ma már dokkoló kölcsönhatások egyéb MAPK partnerekre is ismertek (pl. egy másik kináz aktivátorhoz, egy deaktiváló foszfatázhoz, vagy akár vázfehérjékhez való kötődés esetében) (16.a Ábra). MAPK kötő lineáris motívumok legjobban ismert fajtája az ún. D-motívumok (D mint „docking” az angolból) (16.b Ábra) (Tanoue et al. 2000) (Chang et al. 2002) (Bardwell et al. 2009).



16. Ábra A dokkoló árok központi szerepe MAPK jelátviteli folyamatokban

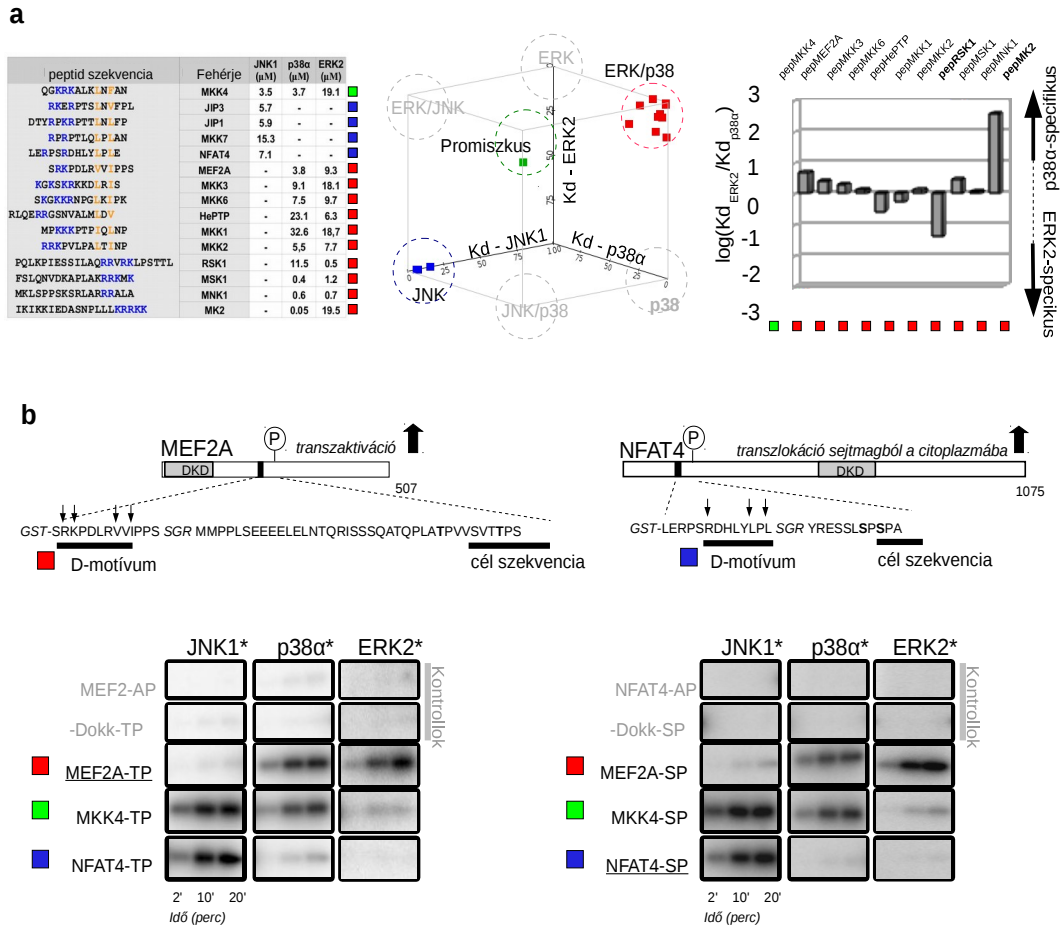
(a) MAPK jelátvitel sémája: a külvilágból érkező jelek receptorokon keresztül evolúciósan konzervált felépítésű, három szintű MAPK modulokat aktiválnak (MAP3K → MAP2K → MAPK). A MAPK foszforiláció MAPK aktivált protein kinázok (MAPKAPK) aktivációját vagy transzkripciós faktorok foszforilációját eredményezi. MAPK-ok további kölcsönható partnerei az őket aktiváló MAP2K-ok, az őket defoszforiláló foszfatázok és a modul több elemét egyszerre kötni képes vázfehérjék. (b) Minden MAPK tartalmaz egy ún. dokkoló árkot, amely egyrészt áll egy hidrofób zsebből (narancssárga) illetve egy negatív töltésű ún. CD (Common Docking) árokból. Az előbbit a dokkoló árkot kötő lineáris D-motívumok konszenzus szekvenciájában felismerhető $\Phi x \Phi$ (ahol Φ hidrofób aminosavat jelöl) motívum, míg az utóbbit arginin vagy lizin aminosavak (Ψ) oldalláncai köti (és x bármely aminosav lehet a közbülső régiókban). Az ábra egy MAPK-szubsztrát kölcsönhatás sémáját mutatja, ahol a D-motívum a dokkoló árokba, míg a foszforilálandó S/TP célszekvencia az aktív helyhez kötődik. (c) Humán MAPK-ok (ERK2, p38 α , JNK1) ismert fiziológiás kölcsönhatás mintázata. (Nyilak közvetlen foszforilációt jelölnek.)

4.2.2.1. Humán MAPK dokkoló motívumok biokémiai vizsgálata

Munkánkban először arra voltunk kíváncsiak, hogy lineáris dokkoló motívumok milyen mértékben határozzák meg humán MAP kinázok ismert és fiziológiás szempontból jól karakterizált kapcsolatait (16.c Ábra). Az irodalomból kiválasztottunk 15 jól ismert MAPK kölcsönható partnert,

és a bennük elhelyezkedő MAPK kötő fehérje szakaszokat kémiai úton megszintetizáltuk. Három humán MAPK család egy-egy képviselője és fenti peptidek közötti kölcsönhatás mintázatok feltérképezésére kidolgoztunk egy a fehérje-peptid típusú kölcsönhatások kötődési affinitásának mérésére alkalmas kvantitatív esszét. Az eredményeket a **17.a Ábra** mutatja. Kölcsönhatás mintázatuk alapján a peptidek három fő csoportba oszthatók: (a) promiszkus, mindhárom MAPK-t egyaránt jól köti; (b) ERK/p38 szelektív, ERK2-t és p38 α -t köt, de JNK1-t nem; és (c) JNK-specifikus, csak JNK1-t, de a másik kettő MAPK-t nem köti. A peptidek kölcsönhatási mintázata jó egyezést mutat a fiziológiás mintázattal. JNK1 például valóban csak a JNK-specifikus NFAT4 szubsztráttal és a JIP1,3 vázfehérjékből származó peptidekhez köt. Továbbá érdekes, hogy pepMKK4, mely egyedülálló módon egy p38/ERK szelektív MAP2K dokkoló motívuma, egyaránt jól köti mindkét MAPK-t. Nem várt módon azonban egy adott ERK vagy p38-specifikus fehérjéből származó D-peptid a két utóbbi MAPK-t egyáltalán nem tudja jól megkülönböztetni. Erre jó példa az MKK6 MAP2K-ból származó peptid (pepMKK6). Bár MKK6 fiziológiásan p38-specifikus, pepMKK6 egyaránt jól köti az ERK2-t is, míg az elvárásnak megfelelően nem köti a JNK1-t. MKK6 azonban nem foszforilálja az ERK2 MAPK-t még *in vitro* sem (nincs bemutatva), mert a MAP2K-ok aktív helye nagymértékű specificitást mutat, és ezzel csak a p38 MAPK-ok aktivációs hurka mint szubsztrát összeférhető (Garai et al. 2012). Érdekes azonban, hogy az ERK2/p38 szelektív csoportból viszont két, a klasszikus D-motívumtól eltérő szekvenciájú peptid (pepRSK1 illetve pepMK2) nagymértékű specificitással képes kötni az utóbbi két MAPK-t.

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy dokkoló motívumok biokémiai specificitása vajon képes-e meghatározni MAPK pályákon belüli foszforilációs mintázatokat. Ehhez beállítottunk egy *in vitro* kináz esszét, melyben két mesterséges dokkoló motívumok által meghatározott MAPK cél szekvencia foszforilációját tudtuk vizsgálni, melyek NFAT4 illetve MEF2A transzkripció faktorokból származtak. A **17.b ábrán** bemutatott kiméra kísérletekkel sikerült igazolnunk, hogy biológiailag releváns MAPK célszekvenciák foszforilációs mintázatát a tőlük N-terminálisan (kb 10-50 aminosav tartományon belül) elhelyezkedő dokkoló motívumok MAPK kölcsönható mintázata határozza meg.



17. Ábra MAPK kötő peptidok kötődési affinitása és specificitása

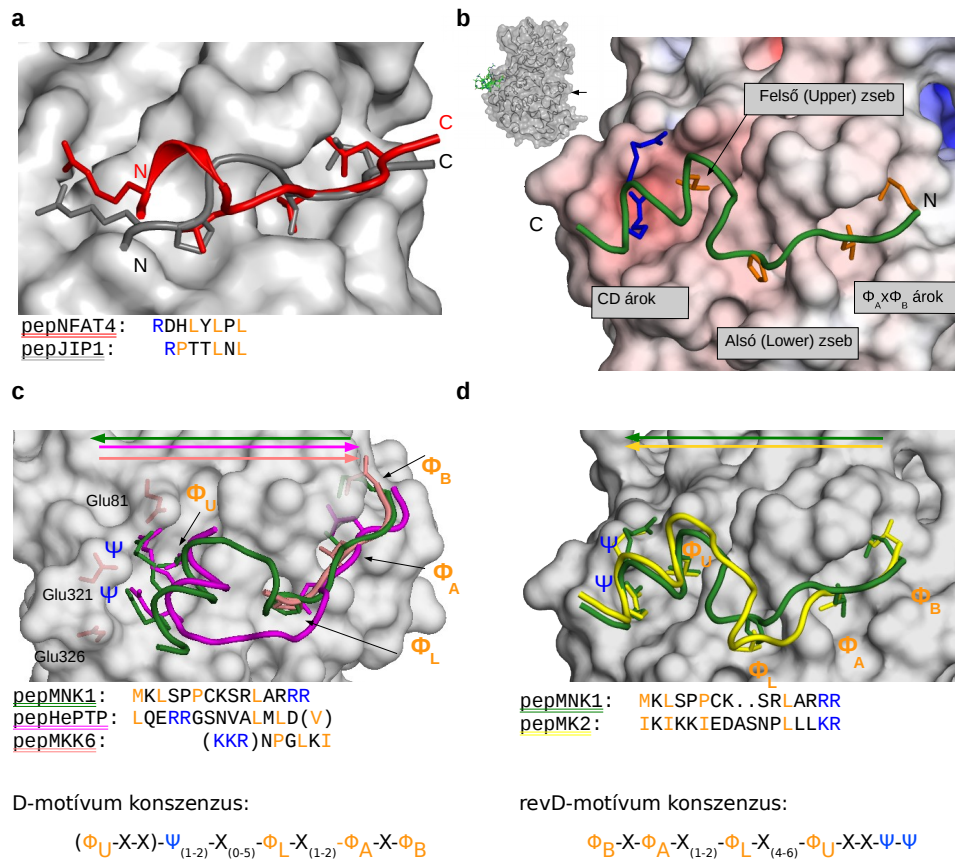
(a) MAPK-dokkoló peptidok kötődési affinitása (baloldali táblázat). A 15 kémiai szintetizált peptid a három MAPK-hez való kötődési erősségét jellemző egyensúlyi disszociációs konstansuk (Kd) alapján három csoportba oszthatók: promiszkus, ERK/p38 szelektív és JNK specifikus (középső háromdimenziós grafikon). Ha azonban nemcsak a Kd-k értékét hanem egy adott peptid kötődési erősségének arányát különböző MAPK-hoz vizsgáljuk, akkor kitűnik, hogy pepRSK1 és pepMK2 peptidok nagymértékű ERK2- illetve p38 α -specificitást mutatnak, mely összhangban áll biológia szerepükkel: RSK1-t ugyanis mitogén jelek ERK2-n keresztül, míg az MK2-t stressz jelek p38 α -n keresztül aktiválják. PepRSK1 több mint 20-szor jobban köt ERK2-t, míg pepMK2 kb 400 jobban p38 α -t. (b) Transzkripció faktorokból származó riporter konstrukciók foszforilációs mintázatát a dokkoló motívumok MAPK kötő mintázata határozza meg. MEF2A és NFAT4 transzkripció faktorok transzaktivációs képességét illetve sejtmag és citoplazma közötti mozgását olyan regulátor régiók befolyásolják, melyek MAPK S/TP célszekvenciákat tartalmaznak. Fenti szekvenciák foszforilációját dokkoló motívumuk határozzák meg. (AP konstrukciók: a célszekvenciában lévő szerin vagy treonin aminosavak alanin mutánsai; -Dokk konstrukciók: dokkoló motívum mutánsok, melyekben a konszenzus aminosavak alaninre lettek cserélve; illetve kiméra konstrukciók, melyekben az eredeti NFAT4 illetve MEF2A dokkoló motívumokat más dokkoló szekvenciákra cseréltük.) A kiméra riporterok GST-s fehérjékként lettek rekombinánsan előállítva, majd foszforilációjukat radioaktív foszfát beépülésen alapuló in vitro kináz esszével követtük nyomon, ahol

enzimként aktivált, tisztított MAPK-okat használtunk. (DKD: DNS kötő domén.)

4.2.2.2. MAPK dokkoló peptidek specificitásának szerkezeti alapja

Dokkoló motívumok MAPK specificitásának tanulmányozása után célul tűztük ki kölcsönhatásuk szerkezeti alapjainak feltárását. Megoldottuk három érdekes MAPK-dokkoló peptid komplexének röntgen diffrakciós szerkezetét: JNK1-pepNFAT4, p38 α -pepMKK6 és ERK2-pepMNK1.

Korábban már ismert volt a JNK1-pepJIP1 szerkezete, melyet összehasonlítottunk az újonnan meghatározott JNK1-pepNFAT4 szerkezettel (**18.a Ábra**). Ebből az összehasonlításból jól látszik, hogy a két eltérő szekvenciájú peptid hasonlóan érintkezik a JNK1 dokkoló felszínnel a konszenzus szekvenciát alkotó aminosav oldalláncokon keresztül, azonban a közbülső régiók konformációja eltérő. Az ERK2-pepMNK1 szerkezet pedig rávilágít arra, hogy dokkoló peptidek a klasszikus D-peptid orientációhoz képest ellentétes orientációban is kötődhetnek a MAPK dokkoló árokba (revD-motívumok), és hogy a dokkoló árok a CD és az ún. Φ x Φ árkon felül két további szerkezeti jellegzetességgel is bír: alsó (lower) és felső (upper) hidrofób zsebek (**18.b Ábra**). Az ERK2-pepMNK1, ERK2-pepMKK6 és ERK2-pepHePTP szerkezetek összehasonlítása jól mutatja a változatos konformációs lehetőségeket közbülső régiók konformációjára (**18.c Ábra**). Az ERK2-pepMNK1 és p38 α -pepMK2 szerkezetek egymásra illesztése és revD-motívumok közbülső régióinak eltérő lefutása pedig szintén azt sugallja, hogy dokkoló peptidek változatos konformációs megoldásokkal kötődnek MAPK-okhoz, bár érdekes módon a dokkoló árokkal való közvetlen van der Waals, hidrogén kötés és elektrosztatikus kölcsönhatások hasonlóak (**18.d Ábra**).



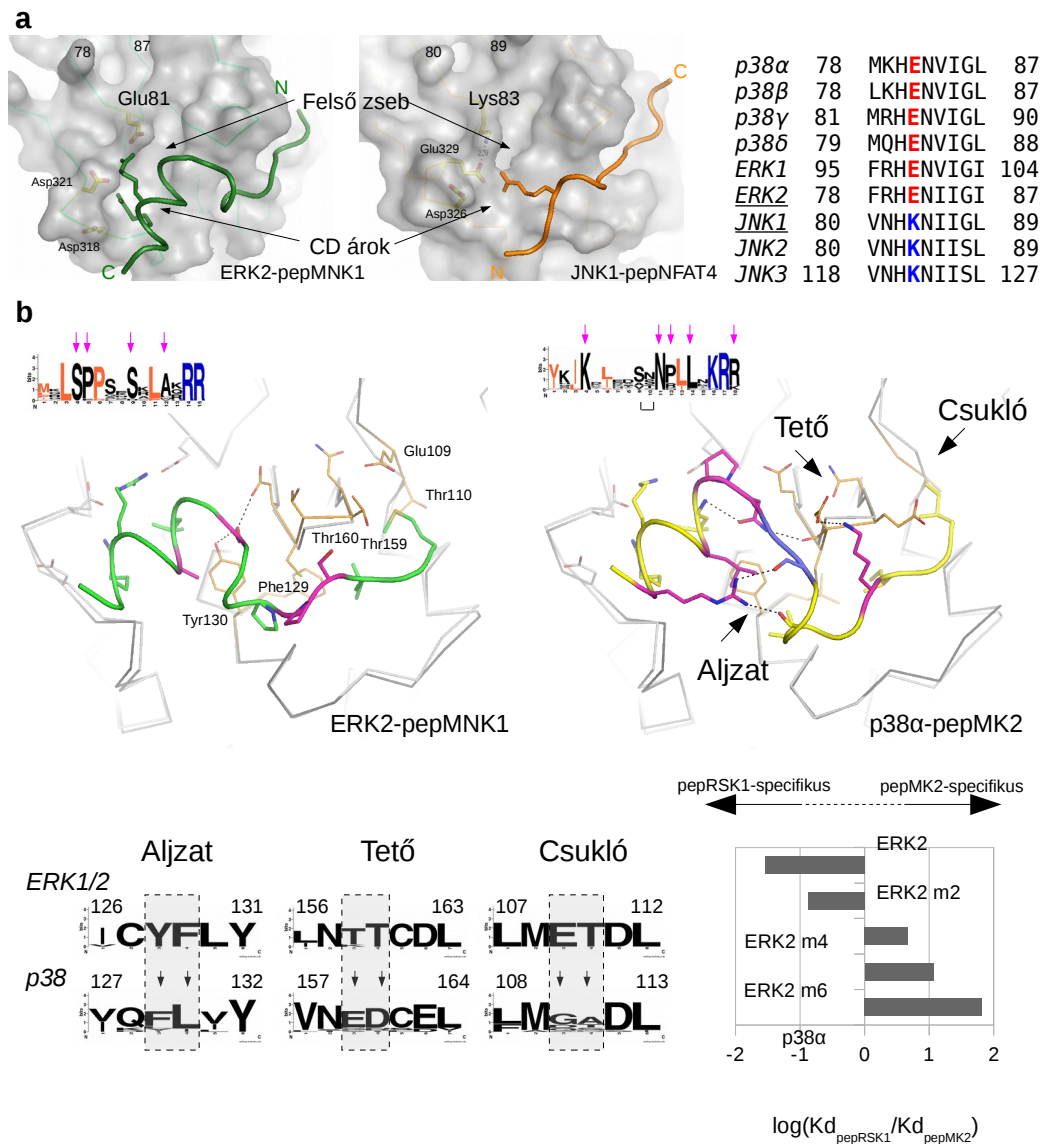
18. Ábra MAPK-dokkoló peptid szerkezetek (ERK2, p38, JNK1)

(a) JNK1-pepNFAT4 és a JNK1-pepJIP1 (Heo et al. 2004) szerkezetek összehasonlítása. A JNK1 felszíne és a pepJIP1 molekula szürke, míg pepNFAT4 pirossal van feltüntetve. (b) ERK2-pepMNK1 szerkezet részleteiben is feltárja a MAPK dokkoló árok topográfiáját. A fehérje felszínét elektrosztatikus potenciálja szerint színeztük (piros: negatív, kék: pozitív). A bal felső kisebb ábra mutatja, hogy a peptid az aktív helytől (nyíllal jelölve) teljesen elkülönülő felszínen, a dokkoló árokban, kötődik a MAPK-hez. (c) ERK2-pepMNK1, ERK2-pepMKK6 és ERK2-pepHePTP (Zhou et al. 2006) szerkezetek egymásra illesztve. (HePTP egy tirozin foszfatáz, ami aktivált MAPK-okat defoszforilál.) Különös módon a pepMKK6 peptid erősen pozitív töltésű N-terminális része (zárójelben bemutatva a szekvencián) nem látszik az elektronsűrűség térképen. Ez arra utalhat, hogy ennek a peptidnek a kötődése irányítatlan elektrosztatikus kölcsönhatások révén történik a CD árokban. (d) ERK2-pepMNK1 és p38 α -pepMK2 (ter Haar et al. 2007) szerkezetek egymásra illesztve. PepMK2 két aminosavval hosszabb közbülső régióval rendelkezik a Φ_U és Φ_L horgonyzó pontok között, és a konformációja ebben a régióban eltérő a pepMNK1-hez képest. Érdekes azonban, hogy mindkét peptid konformációja összeférhető mindkét MAPK dokkoló árokkal. (A különböző szerkezetek egymásra illesztése a MAPK-ok összes C α atomjai alapján történt. Színes nyilak a különböző peptid N \rightarrow C terminális irányát jelzik. A konszenzus motívumokban zárójelbe tett aminosavak nem feltétlenül szükségesek, és az alsó indexbe tett zárójelben lévő számok aminosav hosszúság tartományokat jelentenek.)

Fenti szerkezetek és már ismert dokkoló peptid szekvenciája alapján felállítható két jól elkülönülő D-motívum és revD-motívum konszenzus szekvencia. Ezekben a hidrofób (Φ_U , Φ_L , Φ_A és

Φ_B) és a bázikus (Ψ) horgonyzó pontok különböző D- illetve revD-típusú mintázatokban biztosítják a MAPK-okhoz való kötődést, míg a közbülső régiók aminosav összetétele és hossza változatos lehet.

A dokkoló peptidek MAPK kölcsönhatási profil analízise során azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy a peptidek több ízben is képesek voltak a JNK1 MAPK-t az ERK/p38 enzimektől megkülönböztetni, míg a legtöbb esetben a két utóbbi MAPK megkülönböztetése csak néhány esetben fordult elő (pl. pepRSK1 vagy pepMK2), pedig azt a fiziológiai kölcsönhatási mintázat több esetben is megkívánta volna (pl. pepMKK6). A komplexek szerkezeteinek részletes analízise fényt derített a JNK1-specifitásra. JNK kinázokban a CD árok és a felső zseb által határolt régió egy sóhíd kialakulása miatt beszűkült (**19.a Ábra**). Ezt a dokkoló árok topográfiájában megnyilvánuló különbséget a pepJIP1 és a pepNFAT4 peptidek egy rövidebb közbülső (Ψ és Φ_L közötti) régió keresztül aknázzák ki. A CD árok környéken létrejött sóhíd (Glu329 és Lys83 között) valószínűleg fontos a JNK dokkoló árok specifitásában, mert a JNK1 Lys83-nak megfelelő aminosavak teljes mértékű konzerváltságot mutatnak minden JNK1 ortológban, s ennek a különbségnek a rögzülése fontos esemény lehetett a p38 és JNK MAPK-ok evolúciós szétválásában valamikor a korai többsejtű eukarióta jelátviteli rendszerek kialakulása során (Caffrey et al. 1999).



19. Ábra MAPK specificitás szerkezeti okai

(a) A JNK1 dokkoló árok összeszűkült az ERK dokkoló árkához képest. (Az összes JNK humán izoenzim és ortológjaik hordoznak egy evolúciósan konzervált töltés fordulást az ERK2 Glu81-nek megfelelő pozícióban, ami végül is egy intramolekuláris sóhíd kialakulását eredményezte a JNK-ok CD árkában.) (b) Az ERK2 és *p38α* dokkoló árkok eltérő aminosav összetétele az Aljzatnál, Tetőnél és Csuklónál. Hat aminosav kicserélésével az ERK2 revD-motívum specificitása megfordítható pepRSK1 és pepMK2 specifikus peptidek kötődési affinitására nézve (jobb alsó grafikon: az értékek a korábban említett fluoreszcencia polarizáció alapú kötődési affinitás eszkéssel voltak meghatározva). (ERK2 m2: cserék az Aljzatban; ERK2 m4: cserék Aljzatban és Tetőben; ERK2 m6: cserék mindhárom régióban.) A bal alsó panelen a szekvencia logók nyolc modell organizmus MAPK szekvenciájából származnak (szivacsoktól emberig). A hasonlóan kalkulált pepMNK1 és pepMK2 szekvencia logókban pedig bíbor szín jelzi azokat a konzervált aminosavakat, amelyek a revD-motívumok közbülső régióiban helyezkednek el (felül). Az egyszerűség miatt a szerkezeti ábrák csak a három kitüntetett szereppel bíró régiók aminosav oldalláncait mutatják a MAPK-okban, míg a peptidekben csak a horgonyzópontok illetve a konzervált bíbor aminosavak oldalláncai vannak feltüntetve. Hidrogén hidakat szaggatott vonalak jelölik.

ERK2 és p38 α enzimek dokkoló árkának topográfiai hasonlósága magyarázatul szolgálhat arra a megfigyelésünkre, hogy D-motívumok nem tudnak ezekhez a fehérjékhez specifikus módon kötődni: ha egy D-peptid kötődött az egyik MAPK-hez, akkor hasonlóan jól kötődött a másik MAPK-hez is. PepRSK1 és pepMK2 peptidek azonban markánsan eltérő specifikusságot mutattak a két MAPK-hez való kötődés szempontjából. Ennek a különbségnek a szerkezeti okai azonban a szerkezetek összehasonlításán keresztül közvetlenül nem tárható fel, mert a p38 α -pepMK2 komplex szerkezetben megfigyelhető peptid konformáció jól összefér az ERK2 dokkoló árokkal (és kb 20 μ M-os affinitással kötődik is hozzá). Mivel ERK és p38 enzimek teljesen más fiziológiai funkcióval rendelkeznek, s ez a tulajdonság konzervált korai többsejtűektől emberig, összehasonlítottuk az MNK1 és MK enzimek revD-motívumainak szekvencia logóit. Míg az MNK1 enzimet mindkét MAPK fiziológiailag serkenti a revD-motívumán keresztül, addig az MK2 csak p38 által aktiválódik (Cargnello & Roux 2011). Érdekes módon pepMNK1 és pepMK2 szekvencia logók azt jelzik, hogy nemcsak a revD horgonyzópontok konzerváltak, hanem a közbülső régiók bizonyos pozíciójában elhelyezkedő aminosavak is (**19.b Ábra**). Ez arra utal, hogy ezek a közbülső pozíciók is fontos szerepet játszhatnak például MAPK-MAPKAPK interakciós profilok kialakításában.

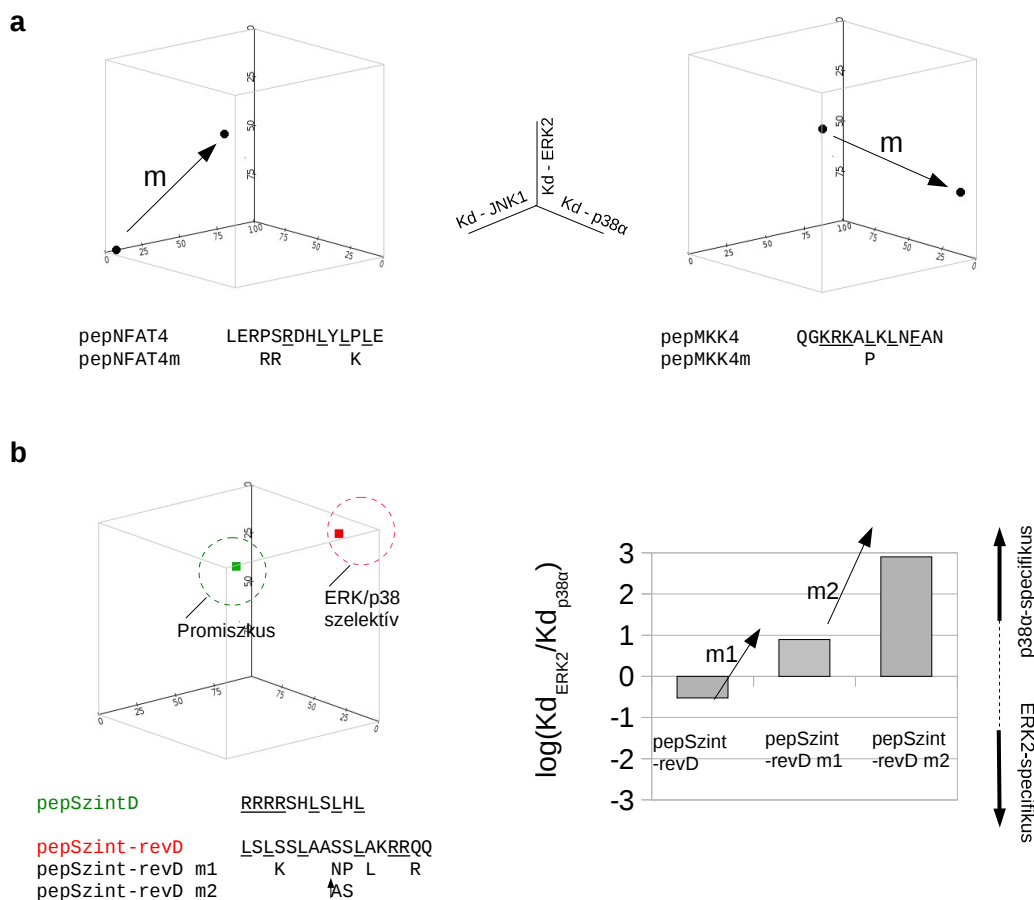
Bár a két MAPK dokkoló árkának topográfiája hasonló a direkt horgonyzó pontoknál, néhány aminosav azonban evolúciósan konzervált eltérést mutat a dokkoló árok középső-alsó (Aljzat), középső-felső (Tető) és a csukló környékén (az utóbbi az N- és C-terminális kináz lebenyt flexibilis módon köti össze) (**19.b Ábra**). Ha ezeket a pozíciókat az ERK2-ben a p38 α -ban lévő aminosavakra cseréljük, akkor hat aminosav cseréjével egy olyan ERK2 m6 fehérjét kapunk, ami pepRSK1-vel illetve pepMK2-vel fordított specifitását mutat.

Egy további kísérletsorozatban a specifikus peptidek közbülső régiójában elhelyezkedő, intra-peptid H-hidak kialakítására képes aminosavak jelentőségét vizsgáltuk. Mindegyik esetben azt találtuk, hogy ezek a valószínűleg a közbülső régiók merevítésére alkalmas oldalláncok kitüntetett szereppel bírnak a revD peptidek MAPK specifitására nézve (Garai et al. 2012).

4.2.2.3. MAPK kötő peptidek mesterséges tervezése

A feltárt szerkezeti ismeretek birtokában megpróbáltuk racionális módon megváltoztatni dokkoló peptidek specifitását. PepNFAT4 például egy JNK1-specifikus peptid, de ha köztes régióját Ψ és Φ_L horgonyzópontok között több bázikus aminosav beépítésével meghosszabbítjuk, akkor promiskussá válik, mert a lehetséges rövidebb és hosszabb közbülső régió regiszterek már megengedik mindhárom MAPK-hez való kötődést. PepMKK4 eredeti promiskuitását pedig könnyedén korlátozhatjuk, ha a fenti horgonyzópontok közötti régióba egy merev oldalláncú prolin

aminosavat építünk be, ami valószínűleg a specificitás szempontjából fontos közbűső régió konformációját módosítja (**20.a Ábra**).



20. Ábra MAPK specificitás racionális tervezése

(a) PepNFAT4 JNK1-pecifikus és pepMKK4 promiszkus peptidek MAPK kölcsönhatási profiljának módosítása. „m” jelöli az aminosav cserék (lásd alsó sor) hatását az adott peptide a kötődési affinitásokat ábrázoló három dimenziós térben. (b) Mesterséges peptidek MAPK kölcsönhatás profiljának racionális tervezése. „m1” és „m2” jelöli a feltüntetett aminosav cserék illetve egy két aminosavas (AS) közbűső hossz növekedés hatását az ERK2-höz illetve p38α-hoz való kötődés specificitásának mértékére nézve.

A továbbiakban megkíséreltünk teljesen mesterséges szekvenciájú MAPK kötő peptideket tervezni. Egy egyszerű D-motívum konszenzust kielégítő szekvencia (pepSzintD) a vártnak megfelelően promiszkus módon kötődik alacsony mikromólos (1-2 μM) affinitással mindhárom MAPK-hez (**20.b Ábra**). Egy minimális revD-motívumot kielégítő szekvenciájú peptid (pepSzint-revD) szintén a várttal összhangban azonban ERK/p38 szelektívnek bizonyult ($Kd_{(ERK2)}=15 \mu\text{M}$, $Kd_{(p38\alpha)}=30 \mu\text{M}$ és nincs mérhető JNK1 kötése). Mivel korábbi vizsgálataink arra hívták fel a

figyelmet, hogy specifikusság szempontjából a korábban egyébként lényegtelennek hitt horgonyzópontok közötti régiók a meghatározó tényezők, ezért a mesterséges pepSzint-revD peptid közbülső szekvenciáját az MK2 logó alapján változtattuk, és így valóban egy p38 α -specifikus peptidet kaptunk. Ez a módosított pepSzint-revD m2 peptid ~ 5 nM-os kötődési affinitással rendelkezik p38 α -ra, ami kb 6,000-szeres kötődési affinitás növekedést jelent a kiindulási pepSzint-revD affinitásához képest, míg az aminosav cserék az ERK2-höz való kötődést lényegesen nem változtatták. Hipotézisünk szerint a pepSzint-revD m2 peptid p38 α -hoz való kötődési sikerének oka, hogy Φ_L és Φ_U közötti közbülső régiójának szerkezetét ugyanazok a szekvencia-specifikus belső és inter-molekuláris hidrogén-hidak stabilizálják, melyek a **19.b Ábrán** láthatóak a p38 α -pepMK2 szerkezetben; ugyanis úgy tűnik, hogy ez a régió képes „letapogatni” az ERK2 és p38 α dokkoló árkok Aljzatában, Tetejében és Csuklójában lévő kis szekvencia különbségeket.

4.3. Lineáris MAPK kötő motívumok a humán proteómban

Összefoglalva elmondható, hogy a MAPK-ok partner fehérjékhez lineáris D-motívumok révén kötnek. Egy olyan módszer kidolgozása tehát, melynek segítségével megbízható módon tudnánk szekvencia alapján lineáris D-motívumokat azonosítani különböző organizmusok fehérje állományában lehetőséget adna MAPK foszforiláció révén szabályozott jelátviteli rendszerek hálózat szintű evolúciójának a feltárására is. Ehhez természetesen a MAPK-dokkoló peptid kölcsönhatások fizikai hátterének részletes vizsgálatai szükségesek.

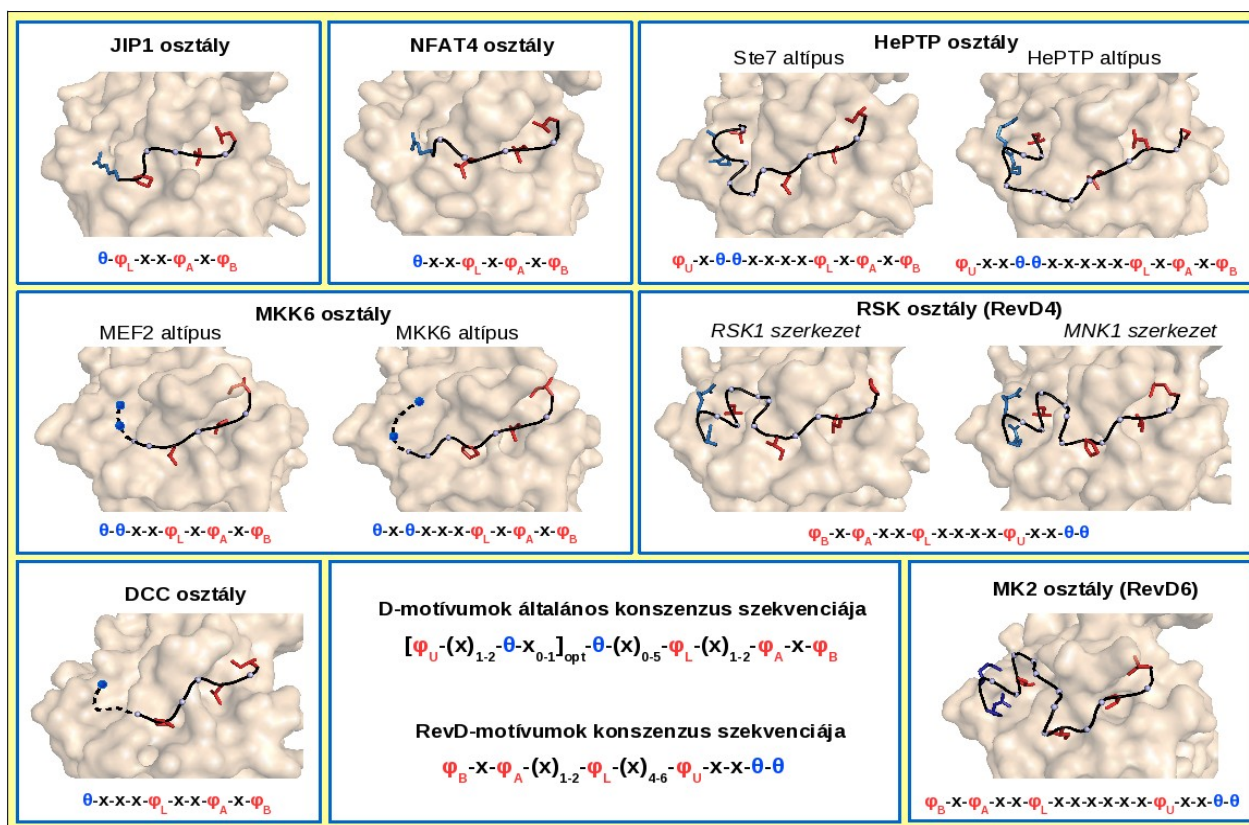
4.3.1. Szerkezet alapú D-motívum kereső algoritmus

Annak ellenére, hogy a MAPK sejtes jelátviteli útvonalairól rengeteget tudunk, és szinte nincs olyan élettani folyamat, melyben ne játszanának valamilyen szerepet, meglepően kevés szubsztrátjukat írták le eddig. A legtöbbet tanulmányozott ERK2 enzimnek például mindössze néhány tucat célfehérjéjét ismerjük, s ezen szubsztrátok jelentős része tartalmaz D-motívumot is. Mindezeket túlnyomórészt szerencsés véletlenek folytán találták meg, szisztematikus MAPK-szubsztrát keresésre eddig kevés kísérlet történt (Whisenant et al. 2010). Mivel azonban a MAPK-ok a célfehérjék többségét a D-motívumok révén találják meg, kézenfekvőnek tűnik az elképzelés, hogy a D-motívumok jelenléte által jósoljuk meg egy-egy fehérjéről, mégpedig a szekvenciája alapján, hogy lehet-e MAPK szubsztrát vagy nem, illetve hogy kialakít-e kapcsolatokat MAP kinázokkal vagy sem.

A D-motívumok megkeresése azonban nem egyszerű feladat. Ugyanis ezek a rövid, rendezetlen szerkezetű peptidláncok csak „laza” konszenzus szekvenciával bírnak, mivel a jelátvitel szempontjából releváns mikromólos affinitású fehérje-peptid típusú kölcsönhatások csupán néhány

kontakt pontot igényelnek a motívum és a kölcsönható fehérje felszín között. Ezek miatt a pusztán szekvencia alapú keresési eljárások már csak a véletlen egyezések miatt is túlságosan sok hamis pozitív találatot adnak. Olyan lineáris motívumok azonosítása pedig, melyek egy-egy MAPK-t specifikus módon kötnek, még nagyobb kihívás. A helyzet sokban hasonlít arra a feladványra, mikor az SH2, SH3 vagy PDZ doménekhez kapcsolódó fehérjéket szeretnénk azonosítani (Tonikian et al. 2008) (Kaneko et al. 2010). Ezek a domének szintén lineáris motívumokhoz kötődnek (az SH3 domének például PxxP és rokon motívumokhoz). A probléma nehézsége két fontos tényezőtől adódik. Egyrészt, viszonylag nagyszámú, egymáshoz hasonló rokon felismerő domén van az emberi fehérjeállományban. Másrészt pedig egy-egy domén kötőárka általában nem csak egyféle elrendezésben képes kötni a célfehérjék motívumait. Vagyis a motívumok alosztályokra tagolhatók, minden alosztály csak a kötő domének egy jól meghatározott csoportjával képes kapcsolatot teremteni, de ugyanekkor a doméneknek is van egy jellemző szelektivitási profilja.

Csoportomban az utóbbi években a különböző lineáris motívumok MAPK kötődési profiljai mögött rejlő fizikai determinánsokat próbáltuk felderíteni szerkezeti biokémiai módszerekkel. A munka során megoldottuk több mint féltucat dokkoló peptid szerkezetét három különböző MAP kinázzal (ERK2, JNK1, p38 α) komplexben. További korábbról ismert, számos MAPK-dokkoló peptid komplex bevonása révén végül 10 különböző dokkoló peptid főlánc konformációs megoldást azonosítottunk, melyek mindegyike összeférhető legalább egy, a három vizsgált MAPK-on lévő különböző dokkoló árkok egyikével (**21. Ábra**).



21. Ábra Különböző MAPK dokkoló peptid főlánc konformációs osztályok az ismert fehérje-peptid szerkezetek alapján

Kékkkel jelöltük a motívumokban a pozitívan töltött aminosavakat (θ), pirossal a hidrofób aminosavakat (φ). Az alsó indexek az utóbbiaknál a MAPK kötőzsebeit jelölik (U, L, A, illetve B: U: felső (upper) zseb; L: alsó (lower) zseb; A és B: a φ x φ árok két pozíciója). A köztes aminosavak (x) lánc fekete színű, és szürke gyöngyök jelölik az alfa szénatomokat. A szerkezetekben a kevésbé jól definiált régiókat szaggatott vonal jelzi. Az egyes osztályok az adott motívumot hordozó fehérjék nevei alapján lettek elnevezve. JIP1 és NFAT4: JNK kötő állványfehérje, illetve transzkripciós faktor; HePTP, MKK6 és DCC: p38 és ERK2 kötő foszfatáz, MAP2K, illetve membrán receptor fehérjék; RSK és MK2: ERK-hez és p38-hoz specifikusan kötődő MAPK szubsztrát kinázok. A szerkezeti osztályok mindenképp a töltött és hidrofób aminosavak elrendeződésében és az összekötő régiók hosszában különböznek. Néhány osztályban a köztes régiók változatossága miatt további alosztályokat is elkülöníthetünk.

A MAPK-dokkoló peptid kötődési „megoldások” száma tehát nem végtelenül nagy, és az ismert motívumok nagy része beilleszthető 10 csoportba. Egy-egy ilyen csoporton belül a peptid specifitási profilja és kötőmódja nagyon hasonló, de a legfontosabb, hogy a szekvenciájuk is közeli rokonságot mutat. Egy-egy csoporton belül az ismert példák a rögzített aminosavak miatt már elég jó „konszenzus motívummal” rendelkeznek. Ennek alapján a motívumok bioinformatikai módszerekkel megtalálhatóak, sőt jósolhatóak is fehérje szekvencia adatbázisok felhasználásával.

A dokkoló peptidek kereséséhez további ismereteket is fel lehet használni. Lényeges például hangsúlyozni, hogy ezen motívumok szinte kizárólag a fehérjék rendezetlen régióiban fordulnak elő; vagyis nincs eredendő, rögzített konformációjuk. Ezt csak a kötődési esemény közben nyerik el, így biztosítva a peptid precíz, indukált illeszkedést a MAPK dokkoló felszínéhez. Szerencsére a rendezetlen régiókat ma már egyre pontosabban meg tudjuk jósolni a fehérje szekvenciája ismeretében. Ezen kívül arra is képesek vagyunk, hogy a helyi aminosav összetétel birtokában kiszűrjük azokat a polipeptidlánc darabokat, amelyek energetikailag „nagyot nyerhetnének” akkor, ha egy másik fehérje arra alkalmas doménjéhez tudnának kötődni. Ha mindezeket az ismereteket összekötjük, egy egyszerű, szám jellegű paramétert kaphatunk az illető fehérjerégió más fehérje domének irányába mutatott viselkedéséről. Erre a pontozásra képes az ANCHOR program, amely az IUPRED nevű rendezetlenség jósló algoritmusra épül (Dosztányi et al. 2005) (Mészáros et al. 2009).

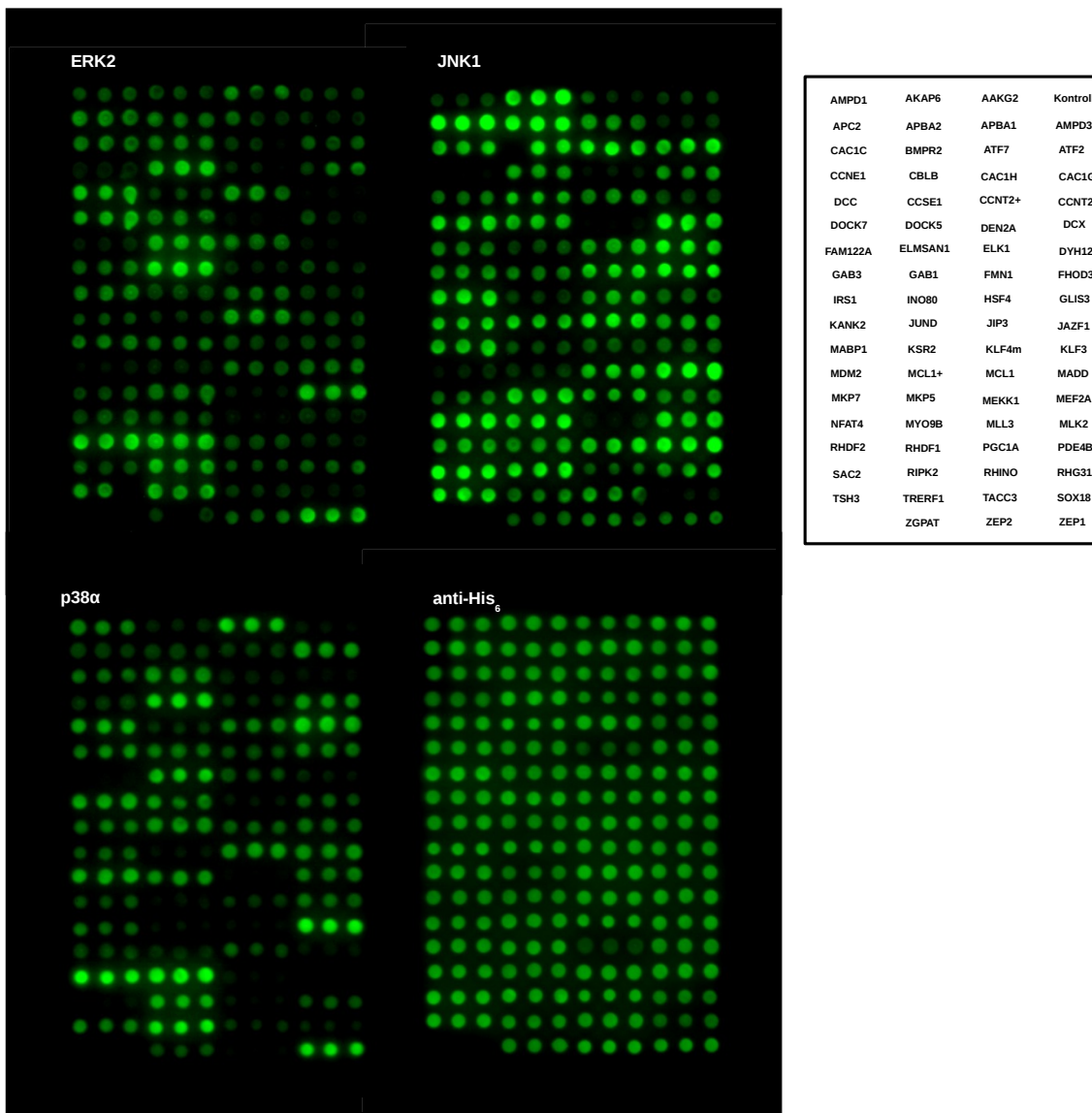
Bár az ANCHOR algoritmus képes kiszűrni a kötődésre nagyobb valószínűséggel képes peptidszakaszokat, de a valódi kötési energiát nem lehet vele pontosan megbecsülni (mivel „általános” fehérje-felszínekkel számol). Ehhez szerkezeti modellezésre van szükség. Korábbi saját és mások szerkezeti munkájának köszönhetően azonban rendelkezünk legalább egy-egy atomi felbontású szerkezettel az eddig ismert motívum osztályokra. Így a motívumkeresés, illetve egyéb sejten belüli lokalizációra vonatkozó szűrések és az ANCHOR együttes alkalmazása után a fennmaradó találatok MAPK kötődését modellezhetjük a meglévő szerkezetek aminosavainak modellbeli átépítésével (Sánchez et al. 2008) (London et al. 2011). Ezután egy becsült kötési energiát kapunk, ami az újonnan azonosított lineáris motívum adott főlánc konformációban való dokkoló árokhoz való illeszkedését/összeférhetőségét jellemzi. Az egyes motívumosztályokon belüli rangsorolás után aztán következett a találatok „élesben” történő tesztelése.

4.3.2. A találatok kísérletes tesztelése

A teljes bioinformatikai szűrést végül hét D-motívum konszenzus szekvenciára végeztük el (JIP1, NFAT4, MEF2A, MKK6, DCC, Ste7 és HePTP). A bioinformatikai szűrés végére így létrehoztunk egy kb. 10,000 potenciális D-motívumot tartalmazó listát, amit kölcsönhatás affinitás becslésnek vetettünk alá a FOLDx kötődési energia becslő algoritmus segítségével (Zeke et al. 2015). Az utóbbi eljárás egy az adott szerkezeti templáttal való komplementaritás alapján pontozza a konszenzust tartalmazó potenciális motívumokat. Az így becsült energia alapján rangsorolt listákból összesen 70-et választottunk ki az egyes listákból kísérletes ellenőrzésre.

Kézenfekvő módszernek tűnhet a motívumok tesztelésére egy olyan kötődési esszé, ami

például a kémiai szintézissel előállított peptidek kötődését vizsgálta volna a három MAPK egyikével (ERK2, p38a vagy JNK1). A szilárd fázisú peptid SPOT array-ek tesztelése azonban nem járt sikerrel a MAPK-ok nagymértékű aspecificikus tapadása miatt. Hasonlóan alkalmatlannak találtuk az 1-20 mikromólos közötti affinitású MAPK-D-peptid kölcsönhatások detektálásra a GST pull-down esszéket is. Mindezek miatt kifejlesztettünk egy mesterséges foszforilációs riporter használatán alapú esszét D-motívumok MAPK kötésének indirekt módon való tesztelésére. A GST-fúziós konstrukciók tartalmaztak egy generikus MAPK célszekvenciát, aminek foszforiláltsági állapotát foszfo-specifikus ellenanyaggal tudtuk detektálni (lásd **11. Ábra**). A célszekvencia foszforilációja csak akkor történhet meg, ha a konstrukció tartalmazott egy MAPK kötésre alkalmas D-motívum szekvenciát. Az ilyen mesterséges foszforilációs riporter használatán alapuló esszé dot-blot formátumban már alkalmas volt a talált D-motívumok közepes áteresztőképességű vizsgálatára, s ugyanakkor az ilyen foszforiláció alapú kiolvasás összhangban is áll MAPK-ok eredeti biológiai szerepével, amikor is a kinázok partner fehérjéi legtöbbször szubsztrátjaik is egyben (**22. Ábra**).



22. Ábra Foszforiláción alapuló dot-blot esszék eredményei (ERK2, p38α és JNK1)

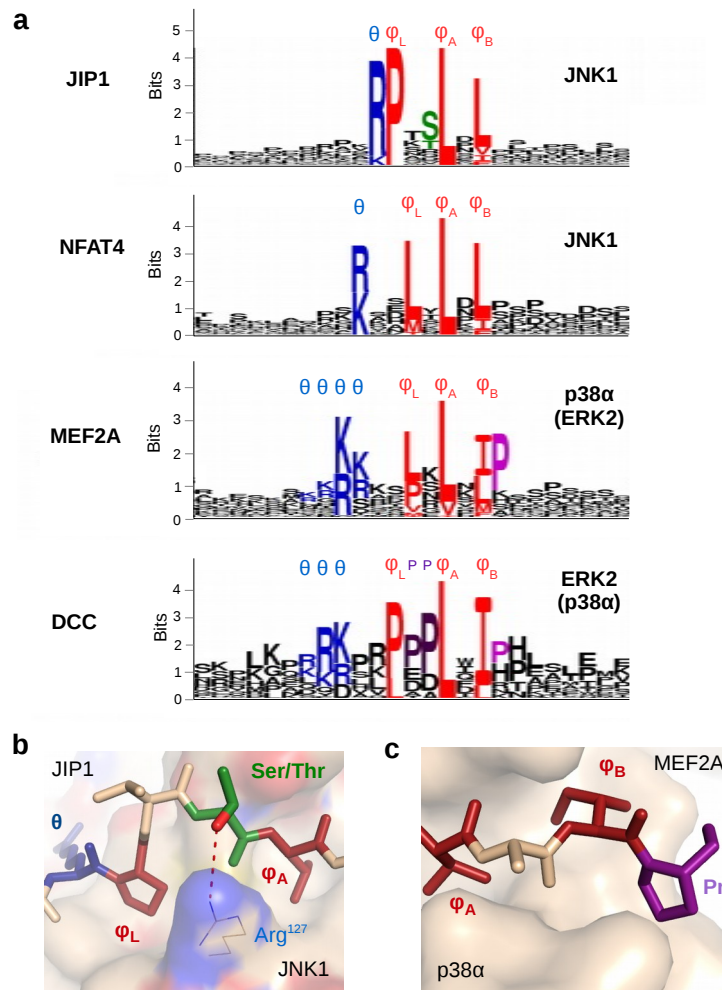
A bioinformatikai szűrés alapján kiválasztottunk 70 MAPK D-motívumot tartalmazó kb 15 aminosavas fehérje régiót a jobb oldali panelen mutatott fehérjékből, s ezeket foszforiláción alapuló dot-blot alapú esszékben teszteltük MAPK kötésre (lásd 11. Ábra). Az alsó anti-His₆ panelen a GST-fúziós konstrukciók egyenletes töltését His₆ antitesttel ellenőriztük, a többi panel kiértékelését pedig MAPK-n keresztüli foszforilációra specifikus anti-foszfo ellenanyag segítségével végeztük. Minden konstrukcióból egymás mellé három párhuzamost nyomtattunk. Az ábrán megfigyelhető, hogy az ERK2 és p38α sokban hasonló, míg a JNK1 ezektől nagyban eltérő foszforilációs (tehát egyben interakciós) mintázatot ad. Kontroll: D-motívum nélküli foszforilációs szenzor (jobb felső sarok mindegyik panelben). Az esszé alkalmas volt annak megállapítására, hogy a D-motívumot nem tartalmazó kontrollhoz képest az adott D-motívum milyen mértékben segítette elő ugyanazon MAPK célszekvencia foszforilációját.

A tesztelt motívumok jelentős hányada bizonyult pozitívnak a foszforiláció alapú dot-blot esszékben, ahol 62 motívum a vizsgált 70-ből legalább egy kinázzal a három közül mutatott

kötődést. Természetesen a három aktív MAPK-zal kivitelezett párhuzamos kísérletek alkalmasak voltak a vizsgált D-motívumok MAPK specificitásának feltérképezésére is, ahol a JIP1- és NFAT4-típusú új D-motívumok valóban a vártak megfelelően csak a JNK-hoz, míg a többi (MEF2A, MKK6, DCC, Ste7 és HePTP) vegyesen az ERK2-höz és/vagy a p38-hoz kötődött. A 62 esetből 16 esetben előállítottuk a D-motívumot tartalmazó peptideket kémiai szintézissel és bebizonyítottuk, hogy az új peptidek a MAPK dokkoló árkába kötődnek, mivel kompetíciót mutattak ismert, MAPK dokkoló árokba kötődő fluoreszcensen jelölt modell peptidekkel (Zeke et al. 2015). Továbbá, 6 esetben vizsgáltuk a D-motívum által közvetített MAPK és partner fehérje közötti kölcsönhatásokat egy sejtes, bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció alapú esszében is. Mindegyik vizsgált esetben a kulcspozíciókban mutált vagy dokkoló motívum nélküli konstrukciók kötődése a MAPK-okhoz jelentősen csökkent a vad típushoz képest, ami a D-motívumok fontos szerepére utal MAPK-ok és partner fehérjék közötti bináris kapcsolatok kialakításában teljes fehérje kontextusban és sejtes környezetben is (Zeke et al. 2015).

4.3.3. *D-motívumot tartalmazó fehérjék analízise*

Fenti szerkezet-alapú bioinformatikai szűrés és kísérletes ellenőrzés révén négy D-motívum osztályban (JIP1, NFAT4, MEF2A és DCC) sikerült annyi evolúciósan független, leellenőrzött példát összegyűjteni (21, 15, 15 és 6), ami lehetővé tette ún. pozíció-specifikus hasonlósági pontozó mátrixok (PSSM) felállítását (**23. Ábra**). Ezeknek a mátrixoknak a segítségével megállapítható, hogy egy új szekvencia mennyire hasonlít az ismert motívumok alapján felállított D-motívum halmazhoz, s így lehetséges tisztán szekvencia alapján megítélni egy adott motívum „jóságát”.



23. Ábra PSSM-ek szekvencia logói

(a) A négy különböző D-motívum osztályra felállított pozíció-specifikus pontozó mátrixok (position-specific scoring matrix, PSSM) szekvencia logója. Kulcspozícióban elhelyezkedő pozitív és hidrofób aminosavak kékre illetve pirosra vannak színezve. Az egyes motívumosztályok ezek segítségével töltik ki a negatív töltésű CD árkot illetve a különböző hidrofób zsebeket (L-lower, A és B a φ -x- φ zseb két különböző pozíciója). A köztes régióban elhelyezkedő színes pozíciók kitétetett szerepének több esetben is jól megmagyarázható szerkezeti okai vannak az ismert MAPK-D-peptid komplexek szerkezetének tükrében. (b) A JIP1-típusú motívumok esetében például egy szerin vagy treonin aminosav a φ_L és φ_A pozíciók között optimálisan helyezkedik el egy hidrogén kötés kialakítására a JNK1 Arg¹²⁷-es aminosavával. (c) Főleg a p38 α kötő motívumok esetében a φ_B pozíció utáni prolin aminosav jól illeszkedik a kináz lapos hidrofób zsebébe. Míg az inkább ERK2-t kedvelő DCC-típusú peptideknél a φ_L környéki prolin aminosavak valószínűleg egy poliprolin II-es típusú helikális struktúra kialakításában fontosak.

A JIP1-, NFAT4- és MEF2A-típusú PSSM-eket a humán proteómra alkalmazva egy ötszörös kereszt-ellenőrzött ROC (receiver operation characteristic) tesztben 0.98, 0.94 illetve 0.97 AUC (area under curve) értékeket kaptunk, míg ugyanezt az analízist megbízhatóan a DCC-típusú

PSSM-mel nem tudtuk elvégezni (az ismert és ellenőrzött alacsony motívum szám miatt). Fenti magas AUC értékeket adó osztályozó eljárásunk segítségével létrehozott listákon szereplő első 100 motívum analízise révén aztán érdekes összesítő megfigyeléseket tehettünk a humán proteómban lévő JNK (JIP1- és NFAT4-típusú) illetve az ERK/p38 kötő MEF2-típusú motívumok előfordulására, eloszlására - anélkül, hogy a több száz egyedi motívumot kísérletes ellenőrzésnek vetettük volna alá. Természetesen a 100 motívum csak egy mesterséges érték, de az ilyen elemszámú listán tett analízisek is érdekes megfigyeléseket adtak, például ha a JNK-kötő JIP1-es típusú D-motívum listát vizsgáltuk (ugyanis a kísérletesen ellenőrzött esetek száma ebben a motívumosztályban volt a legtöbb, 21, s ezért ebben az osztályban kapott predikciókat tartottuk a legmegbízhatóbbnak).

Analízisünk először világított rá a JNK kötő motívumok magas előfordulására a neuronális fejlődéshez, axon és szinapszis kialakuláshoz köthető funkcióval bíró fehérjékben, utalva ezzel a JNK általi reguláció fenti folyamatokban betöltött fontos szerepére. További érdekes megfigyelés volt, hogy a listán több olyan fehérje is előfordult (pl. MADD, IRS1, PGC1), melyeknek a szerepe korábban az inzulin jelátviteli folyamatokban volt ismert, s melyek fontos antidiabetikus gyógyszerek célpontjai. Érdekes módon a legtöbb JIP1-típusú motívumot tartalmazó fehérje citoplazmatikus volt (sok citoskeletális fehérjével), míg az ERK/p38 kötésre képes MEF2A-típusú motívumot tartalmazó fehérjék inkább nukleárisak voltak (sok transzkripciós faktorról), az NFAT4-típusú motívumot tartalmazó fehérjék pedig vegyesen voltak citoplazmatikusak vagy sejtmagiak.

4.4. MAPK alapú magasabb rendű jelátviteli komplexek

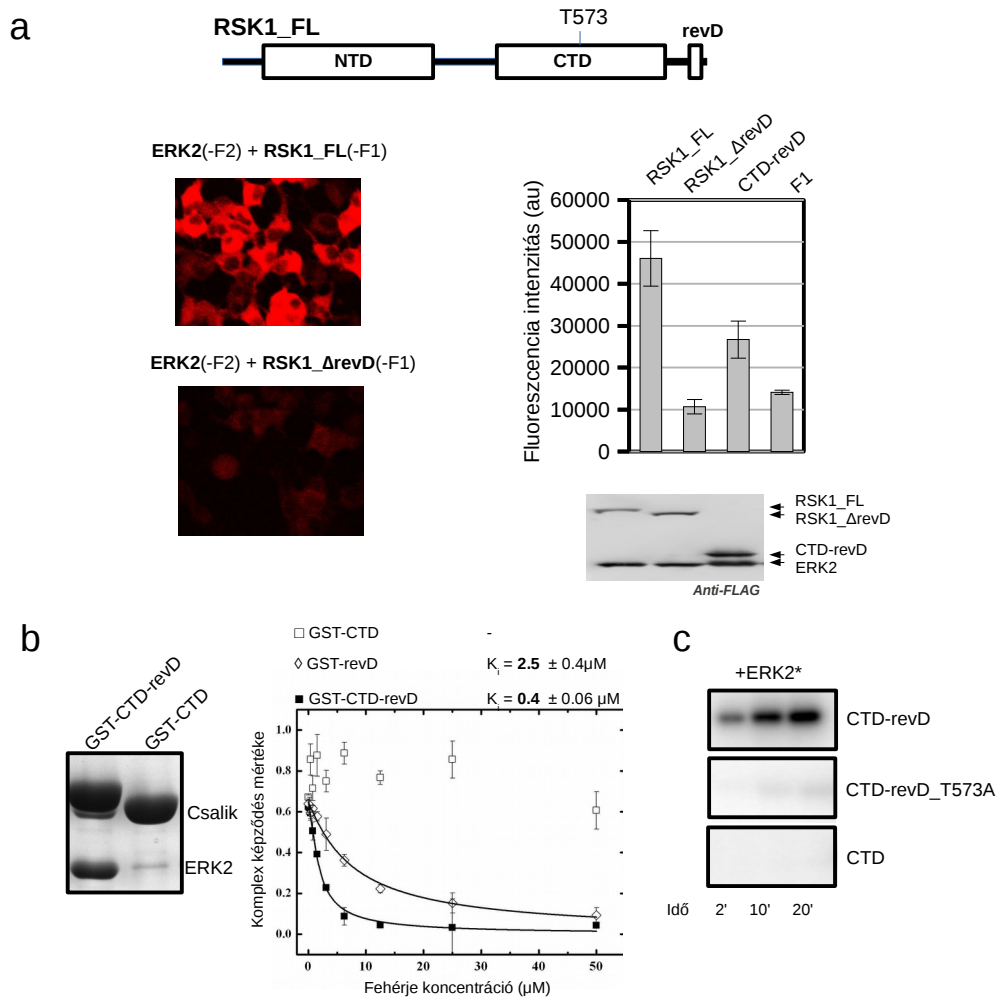
Korábbi fejezetekben bemutattam, hogy MAPK kötő lineáris motívumok autonóm módon képesek fehérje kinázokkal való kölcsönhatások kialakítására. D-motívumok azonban nagyobb fehérjeszakaszok, teljes fehérjék kontextusában fejtik ki hatásukat. További két tanulmányunk betekintést enged a lineáris motívumok magasabb rendű (negyedleges szerkezettel bíró) jelátviteli fehérje-fehérje komplexek összeállításában betöltött szerepébe. Első tanulmányunkban az ERK2 és egy az általa közvetített sejt növekedési pályában szerepet játszó ún. MAPK aktivált protein kinázok (MAPKAPK) családjába tartozó RSK1 közötti heterodimerikus kináz dimer kialakulását vizsgáltuk (Alexa et al. 2015), míg másik munkánkban az ERK5 MAPK aktivációjában fontos MKK5-ERK5 illetve MEKK3-MKK5-ERK5 komplexeket tanulmányoztuk (Glatz et al. 2013). Mindkét esetben a jelátviteli komplexek röntgendiffrakciós analízissel nyert három-dimenziós szerkezetének meghatározása révén betekintést nyertünk a jelátviteli szempontból releváns, magasabb rendű komplexek összeállításába, illetve feltártunk olyan rendszerszintű mechanizmusokat is, melyek fenti

jelátviteli komplexek sejten belüli összeállítására vannak hatással (Takeda et al. 2014) (Gógl et al. 2016).

4.4.1. Az ERK2-RSK1 jelátviteli komplex

A MAPK aktivált protein kinázok (MAPKAPK) csoportjába emlősökben 11 szerin/treonin kináz tartozik (RSK1-4, MSK1-2, MNK1-2, MK2-3 és MK5). A csoport mindegyik tagja tartalmaz egy calcium/calmodulin-dependens kináz (CAMK) domént és egy C-terminális revD motívumot. Utóbbi a MAPK-okhoz való kötődésben fontos, ugyanis a MAPKAPK CAMK doménjét ERK vagy p38 enzimek foszforilálják és kapcsolják be. Ez aztán majd közvetlenül vezet a CAMK szubsztrátjainak foszforilációjához (pl. MK és MNK) vagy az utóbbi N-terminális AGC kináz típusú domén aktivációján keresztül (pl. RSK, MSK) közvetve történik (Cargnello & Roux 2011).

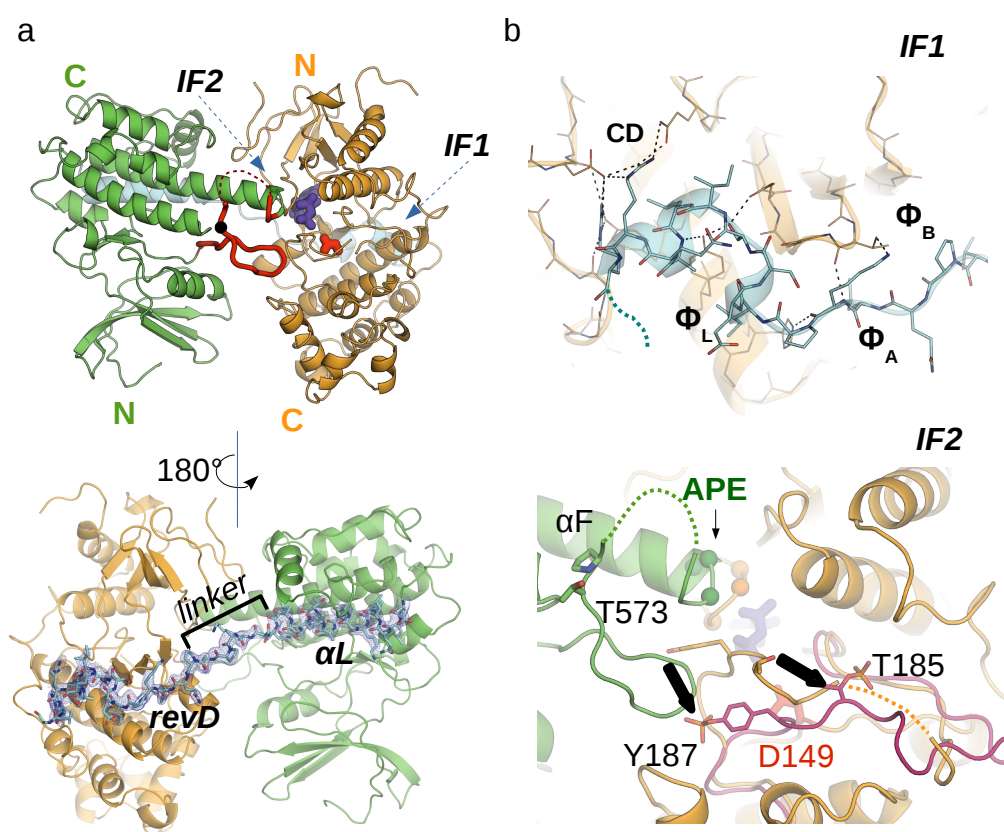
Az RSK1 esetében konkrétan vizsgáltuk a C-terminális revD szakasz szerepét az ERK2 kötésben HEK293 sejtekben BiFC esszéiben. Ez a YFP komplementáció alapú esszé bemutatta, hogy a kb 20 aminosavas C-terminális szekvencia elengedhetetlen az ERK2-RSK1 kölcsönhatáshoz. A CAMK és revD motívumot tartalmazó konstrukció (RSK1c) és ERK2 között in vitro fél mikromólos kötődést mértünk egy FP alapú kvantitatív fehérje-fehérje kölcsönhatás esszéiben. Az ERK2 az RSK1 szubsztrátján az 573-es treonin foszforilációjáért felelős, ami a CAMK domén aktivációs hurkán helyezkedik el. Ennek az aminosavnak a foszforilációját in vitro aktivált ERK2 hozzáadásával vagy HEK293 sejtekben EGF stimuláció hatására specifikus anti-foszfo ellenanyaggal Western-blottal lehet nyomon követni. Az RSK1c és teljes hosszúságú fehérje aktivációjának vizsgálatára beállított esszéink a revD motívum elengedhetetlen szerepét bizonyították (**24. Ábra**). Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a revD motívum pontosan milyen mechanisztikus szerepet játszik a MAPK és CAMK domének közötti jelátvitelben, nevezetesen arra, hogy a MAPK dokkoló hasadék és az RSK1c revD-motívuma közötti kölcsönhatás miként segíti elő a két kináz domén közötti foszforilációt. Mivel azt találtuk, hogy az RSK1c a defoszforilált ERK2-höz szubmikromólos affinitással kötődött, ezért célul tűztük ki az ERK2-RSK1c komplex kristályosítását és röntgendiffrakciós szerkezetmegoldását.



24. Ábra Az ERK2-RSK1 kölcsönhatás karakterizálása

(a) Az RSK1 teljes hosszúságú fehérje (FL) egy N-terminális AGC típusú (NTD), egy C-terminális CAMK típusú (CTD) fehérje kináz domént illetve egy C-terminális MAPK kötő lineáris motívumot tartalmaz (revD). A revD szakasz szerepét YFP alapú fragmens komplementációs esszéssel (BiFC) vizsgáltuk HEK293 sejtekben (ahol F1 és F2 a YFP két komplementációra alkalmas darabjait jelöli). A tranzien transzfekcióval bevitt plazmidokról a transzgének expressziós szintjét Anti-FLAG Western-blottal ellenőriztük. A BiFC eredmények mutatják ($n=3$, hibakorlát: átlagtól való SD), hogy a revD motívum mind a teljes hosszúságú RSK1 és a rövidebb CTD-revD (RSK1c) konstrukció esetében is elengedhetetlen az ERK2-vel való kölcsönhatásban. (b) Az ERK2-RSK1 kölcsönhatás in vitro karakterizálása rekombináns, tisztított fehérjékkel. GST-pull down bal oldalt, míg a kvantitatív FP alapú kölcsönhatási esszé a jobb oldalt látható (ahol a különböző konstrukciók kötődését ERK2-höz egy fluoreszcensen jelölt, a MAPK árokba kötődő peptid segítségével monitoroztuk.) (c) In vitro kináz esszék eredményei rekombináns, tisztított fehérjéken, ahol a radioaktív ^{32}P izotóp beépülését ATP-ből SDS-PAGE és foszforimaging segítségével vizsgáltuk. (T573A: az RSK1 MAPK célszekvencia mutánsa, ahol az 573-es treonint alaninra cseréltük).

Az ERK2-RSK1 kristályszerkezete egyrészt bemutatta, hogy az RSK1 D-motívuma ebben a heterodimerikus kináz komplexben ugyanúgy helyezkedik el mint a korábbi munkánk során megoldott ERK2-pepRSK1 komplexben (Interfész 1, IF1) (Garai et al. 2012), illetve másrészt feltárta a két kináz domén közötti negyedleges szerkezetet illetve egy olyan kináz domén-domén kontakt felszínt (IF2), amiben az RSK1 ún. APE régiója vesz részt (25. **Ábra**). A szerkezetet elemezve világossá vált, hogy a kristályszerkezetben „elkapott” negyedleges szerkezetben az ERK2 szubsztrát kötő felszíne képes lenne fogadni az RSK1 T573-as aminosavat mint MAPK célszekvenciát az RSK1c aktivációs hurkának átrendeződés után, anélkül, hogy ez a kináz domének között megfigyelhető kontakt felszíneket lényegesen megváltoztatná. Természetesen egy Michaelis-Menten típusú enzimatis komplex létrejöttéhez szükséges, hogy az ERK2 szintén aktív, azaz aktivációs hurkán duplán foszforilált állapotban legyen (ppERK2). Utóbbinak a kristályszerkezete már ismert volt (Canagarajah et al. 1997), mi pedig feltártuk az aktív állapottal összeférhető heterodimerikus kináz komplex szerkezetét, s így lehetővé vált az aktív komplex modellezése molekuláris dinamikai szimulációk segítségével (26. **Ábra**).

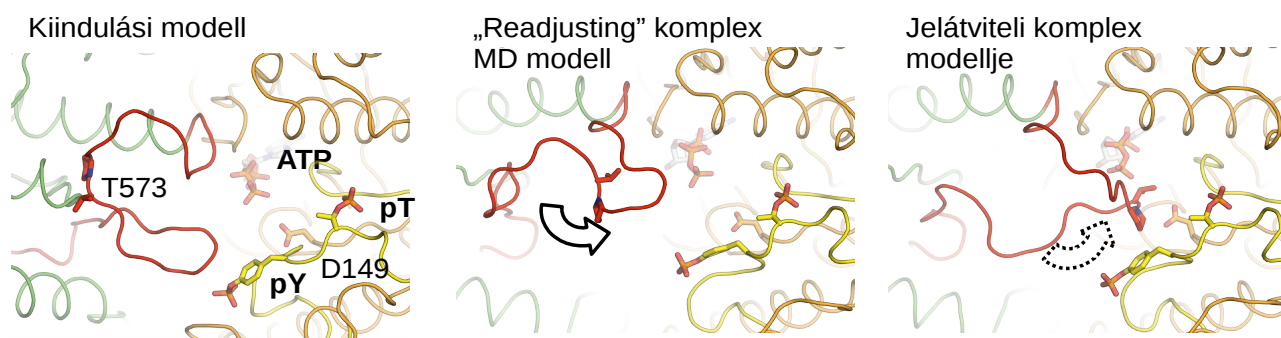


25. **Ábra** Az ERK2-RSK1c komplex szerkezete

(a) Az ERK2-RSK1c komplex kristályszerkezete (felül) és ugyanez hátról (alul). Az ERK2 az RSK1 C-terminális revD motívumához (IF1) illetve a C-terminális CAMK doménjéhez (IF2) kötődik. (A két kináz domént összetartó revD-

linker- α L RSK1 szakaszra az érintett régió kihagyásával, a végleges szerkezeti modell alapján számolt, Fo-Fc σ_A -val súlyozott elektronenzitás térkép van bemutatva.) Az ERK2-n (narancs) a katalitikus aszpartátot (D149) pirosra, az ATP-t bordóra színeztük. Az RSK1-n (zöld+világoskék) az aktivációs hurok pirosra van színezve, amin a T573-as aminosavat fekete ponttal jelöltük. **(b)** Az IF1 (felül) és IF2 (alul) kinagyítva. A felső panel a MAPK CD és hidrofób árkaiba kötődő revD motívum (világoskék) szekvencia specifikus interakciót mutatja. Alul a bíbor színű ERK2 aktivációs hurok (foszfo-T185, foszfo-Y187) és a nyilak mutatják, hogy hogyan változna az ERK2 szubsztrát kötő zsebének szerkezete, ha az foszforilált lenne. Az ERK2-RSK1c komplex kristályszerkezete az ERK2-t defoszforilált állapotban tartalmazta. A foszfoERK2-RSK1c komplex modelljét pedig szuperpozícióval állítottuk elő az ismert foszfoERK2 kristályszerkezet segítségével (Canagarajah et al. 1997). Az aktivátor és szubsztrát kináz domének közötti kölcsönhatási felszínek az RSK1 APE régiója körül jönnek létre.

A ppERK2-RSK1 és ERK2-RSK1 komplexen elvégzett párhuzamos, 150 ns hosszú, megfelelő méretű vizes kockában elvégzett MD szimulációk bemutatták, hogy a kiindulási kristályszerkezetben látható kináz domén-domén kontaktok eltérő módon változtak, ugyanakkor a dokkoló árok körüli kölcsönhatások lényegében mindkét esetben stabilak voltak. Az aktivált állapotú ERK2-t tartalmazó bináris komplexekben az újonnan kialakuló, az APE régió körüli kontaktokat kiegészítő kináz domén-domén kontaktok egyrészt kiterjedtebbek voltak, másrészt a szimulációs idő alatt kisebb fluktuációt mutattak. A kiterjedt kontaktok gyors „beállása” után a ppERK2-RSK1 komplexben inkább már csak a T573-t tartalmazó hosszú RSK1 aktivációs hurok „csapkodása” volt jellemző, és a MAPK célszekvencia távolsága az ERK2 aktív helyétől, ahol a kritikus foszfo-transzfer reakció történne az ERK2 Asp149-es aminosav segítségével az ATP-ről az RSK1 T573-as aminosavra, lényegesen csökkent.

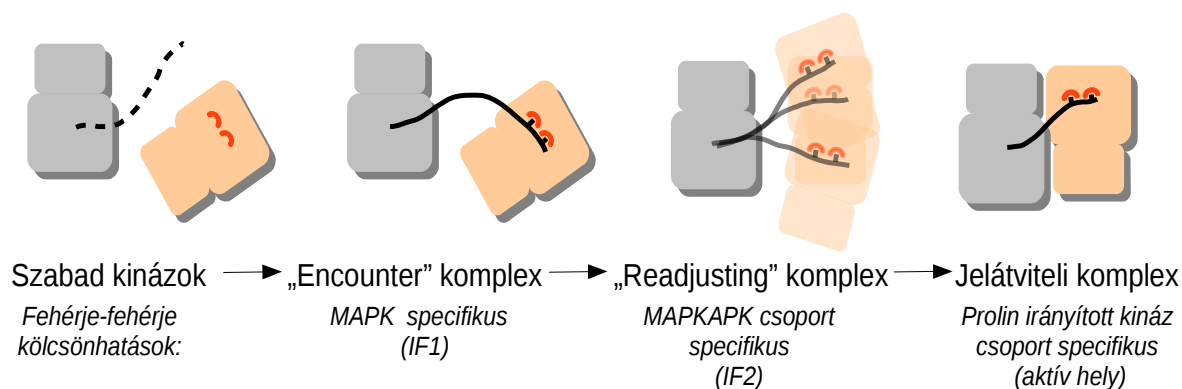


26. Ábra Az ERK2-RSK1c szerkezet MD analízise

A foszfoERK2-RSK1c komplex kiindulási modelljét szuperpozícióval állítottuk elő az ismert foszfoERK2 kristályszerkezet segítségével (Canagarajah et al. 1997). MD szimulációkkal modelleztük, hogy a két kináz domén hogyan változtatja az egymáshoz való térbeli viszonyát a revD motívum segítségével összetartott „Readjusting” komplexben, illetve a szubsztrát kinázon elhelyezkedő flexibilis aktivációs hurok (piros) hogyan kerülhet olyan közelségbe a foszfoERK2 aktív helyéhez, ami szükséges a Michaelis-Menten típusú katalitikus, vagy funkcionális

szempontból jelátvitelinek nevezhető komplexben.

A szimulációs idő alatt azonban nem láttuk az RSK1 hurok T573-as aminosavának „beugrását” a ppERK2 nyitott aktív helyére. A konkrét ppERK2-RSK1 Michaelis-Menten komplexet mégis megpróbáltuk MD-vel modellezni. A MAPK kinázokkal rokonságban álló DYRK nevű kináz szubsztrát peptidjével alkotott komplexének kristályszerkezete ismert volt (Soundararajan et al. 2013). Feltételezhető, hogy a MAPK-ok is a DYRK-hez hasonló sztereokémiával kötik a foszforilációs célszekvenciájukat, ugyanis a DYRK és a MAPK-ok egyaránt az ún. prolin irányított kinázok csoportjába tartoznak, ahol a foszforilálandó aminosavat egy prolin követi. Ha az MD futások révén modellezett ppERK2-RSK1 komplexben egy olyan „puha” kényszert alkalmaztunk az RSK1 flexibilis hurkára, ami elősegítette a T573 és az őt követő prolin (azaz a MAPK célszekvencia) DYRK szubsztrát peptidhez hasonló kötődési sztereokémia kialakulását, akkor a szabad MD futások alatt kapott komplexeknél energetikailag még kedvezőbb ppERK2-RSK1 komplex szerkezetet kaptunk (Alexa et al. 2015). Az így létrehozott MD trajektóriák alapján kielemeztük, hogy melyek azok a kináz domén-domén felszínek, melyek fontosak lehetnek a katalitikus komplex összeállításában, majd ezek módosítása révén vizsgáltuk jelentőségüket az ERK2-RSK1 jelátvitelben *in vitro* és sejtes esszéekben is (Alexa et al. 2015).



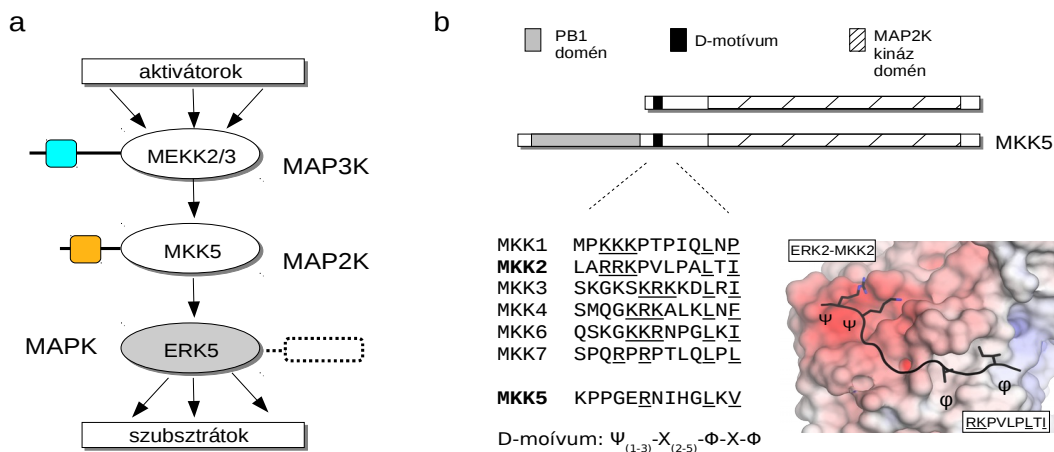
27. Ábra A jelátviteli ERK2-RSK1c komplex összeállításának sémája

Fentiek alapján felállítottunk egy modellt arra nézve, hogy hogyan jön létre a jelátviteli szempontból aktív ERK2-RSK1 komplex (27. **Ábra**). Továbbá vizsgáltuk különböző CAMK domént és revD motívumot tartalmazó MAPKAPK kimérák segítségével, hogy a korábban ismertetett eltérő revD motívum alapú MAPK kötés specificitásnak milyen jelentősége van MAPK-MAPKAPK komplexek jelátviteli specificitásában. Az ERK2 funkcionális szubsztrátja az RSK1,

míg a p38 szubsztrátja az MK2. RSK1_{pep}MK2 kimérát a p38 és az MK2_{pep}RSK1 kimérát pedig az ERK2 is jól tudta aktiválni (Alexa et al. 2015). Mindez arra utal, hogy ha a revD motívumon keresztüli kináz domén-domén rekrutáció megtörtént, akkor a jelátviteli szempontból fontos kináz domén-domén kontaktok és a dokkolással összetartott újonnan kialakuló negyedleges szerkezetek a domének között hasonlóak az összes MAPK-MAPKAPK heterodimerikus komplex párban. A MAPKAPK enzimeknek ugyanis hasonló szerkezetük van a fehérje kinázok APE régióinak nevezett részén, míg ugyanez a MAPKAPK régió működését tekintve eltérő lehet más fehérje kinázokhoz képest. Mindezek alapján pedig elmondható, hogy a MAPK-MAPKAPK jelátviteli komplexek közötti jelátviteli specifitás alapja mindjárt az eredetileg rendezetlen revD motívumok és a MAPK dokkoló árok között kialakuló ún. találkozási („Encounter”) komplexben dől el, míg az ennél az interakciónál jóval tranziensebb természetű, kisebb specifitású kináz domén-domén kontaktok inkább a katalízis szempontjából fontos „Readjusting” és „Signaling competent” (katalitikus Michaelis-Menten) komplex összeállításában fontosak.

4.4.2. A MEKK3-MKK5-ERK5 MAPK modul

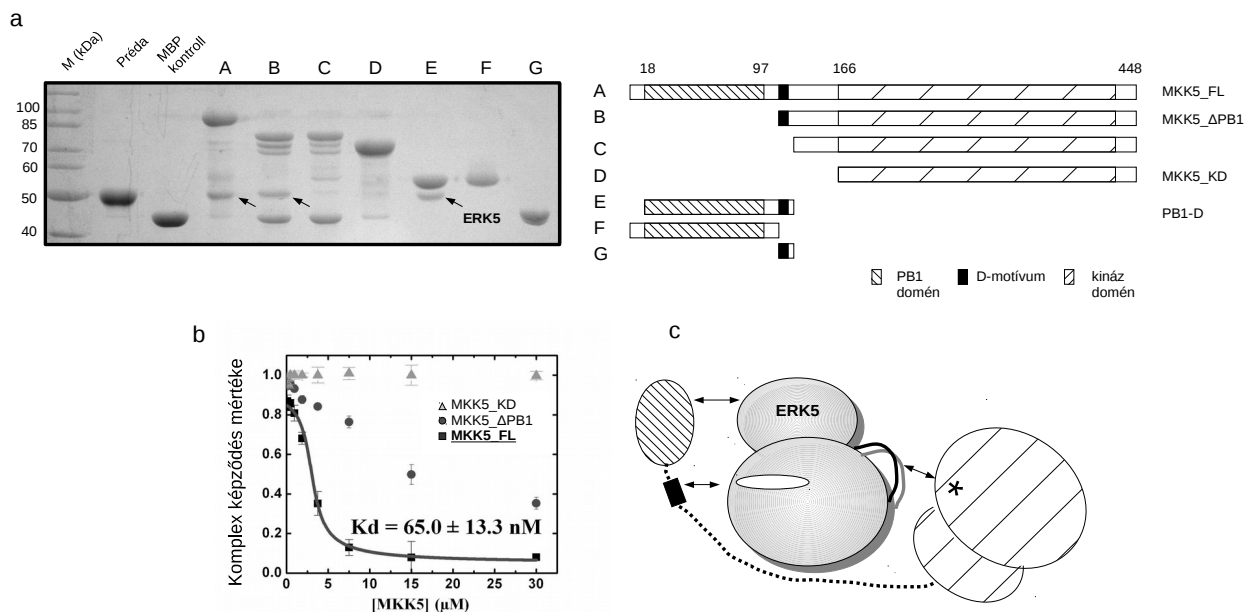
Az ERK5 aktivációért felelős jelpálya komponensei néhány érdekes szempontban különböznek a másik három klasszikus (ERK1/2, p38 és JNK) MAPK jelpálya fehérje kinázaitól. A többi klasszikus MAPK-tól eltérően, amelyek lényegében csak egy MAPK doménből állnak, az ERK5 a MAPK doménjén felül egy hosszú C-terminális régiót is tartalmaz, mely a fehérje lokalizációjának szabályzásában fontos illetve lehetővé teszi, hogy az ERK5 a sejtmagban transzkripciós transzaktivátorként is működhessen (Buschbeck & Ullrich 2005). Az ERK5 aktivátora az MKK5, ami a klasszikus MAP2K architektúrán felül (MAP2K domén és egy N-terminális D-motívum) tartalmaz egy PB1 domént is a fehérje N-terminálisán. Az ERK5 jelpálya legismertebb MAP3K aktivátor kinázai a hasonló funkciójú MEKK2 vagy MEKK3 enzimek. Ezek szintén rendelkeznek egy PB1 doménnel, ami az MKK5 PB1 doménjével alkot heterodimerikus komplexet (**28. Ábra**). Korábról ismert volt, hogy a MEKK3-MKK5-ERK5 modul komponensei sejten belül is képesek egy háromkomponensű fehérje kináz komplexbe szerveződni, bár ennek szerkezeti alapjai feltáratlanok maradtak (Nakamura et al. 2006).



28. Ábra A MEKK3-MKK5-ERK5 MAPK modul sémája

(a) Az ERK5 aktivációját a többi klasszikus MAPK kaszkádtól némileg eltérő MAP2K okozza. Az MKK5 ugyanis a klasszikus, mind a hét MAP2K-ban előforduló D-motívumon felül (b panel) tartalmaz még egy PB1 domént is (narancs), ami heterodimerikus komplexet képez a MEKK2/3 enzimekben lévő PB1 doménnel (világoskék). A b panel szerkezeti ábrája az MKK5-ERK5-tel paralóg viszonyban álló MKK2-ERK2 komplex összeállításában fontos MAPK-D-motívum peptid komplex kristályszerkezetét mutatja (Gógl et al. 2013).

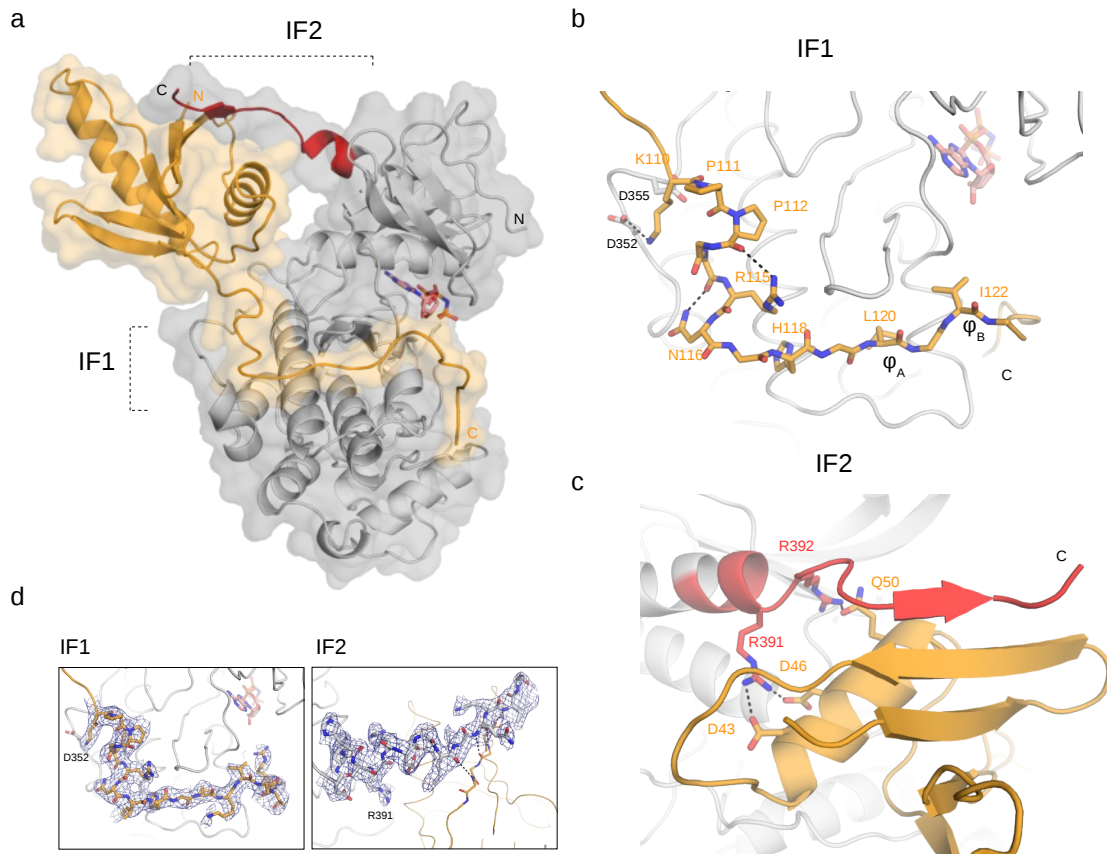
Kísérleteinkben először az MKK5-ERK5 kölcsönhatást tanulmányoztuk GST-pull down alapú darabolásos térképezéssel, majd kvantitatív FP alapú fehérje-fehérje kölcsönhatási esszékben. Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy egy nagy affinitású (< 100 nM) MKK5-ERK5 heterodimerikus kináz komplex létrejöttéhez az MKK5-ből mind a három szerkezeti egység szükséges: PB1 domén, D-motívum és az MAP2K domén (29. Ábra). Az ERK5 szerkezete még nem volt ismert, ezért célul tűztük ki az apo-ERK5 kináz domén és egy MKK5 alapú konstrukcióval (ami a PB1 domént és a D-motívumot tartalmazta; PB1-D) alkotott komplexének kristályosítását.



29. Ábra Az MKK5-ERK5 kölcsönhatás karakterizálása

(a) Az MKK5 és ERK5 kölcsönhatás darabolásos térképezése. (b) A kölcsönhatás kvantitatív jellemzése fluoreszcencia polarizációs esszével jelölt ERK5 kötő, D-motívumot tartalmazó peptid segítségével. (c) A kölcsönhatási esszék eredményei alapján felállított három kötőpontos MKK5-ERK5 modell.

Az ERK5-PB1-D komplex szerkezete feltárta, hogy az MKK5 D-motívuma és PB1 doménja pontosan hogyan alakít ki kölcsönhatást az ERK5-tel, s hogy ebben pontosan mi a szerepe a PB1 doménnek és a D-motívumnak (30. Ábra). A MEKK3-ból és MEKK5-ből származó PB1 domének heterodimerikus szerkezete korábban már ismert volt (PDB ID: 2O2V). A szerkezetek szuperpozicionálása révén, ahol a mindkét szerkezetben közös MKK5 PB1 domént vettük alapul, létrehoztuk a MEKK3(PB1)-MKK5(PB1)-ERK5 heterotrimerikus komplex modelljét, ami köré egy funkcionális MEKK3-MKK5-ERK5 modul épülhet ki (31. Ábra).

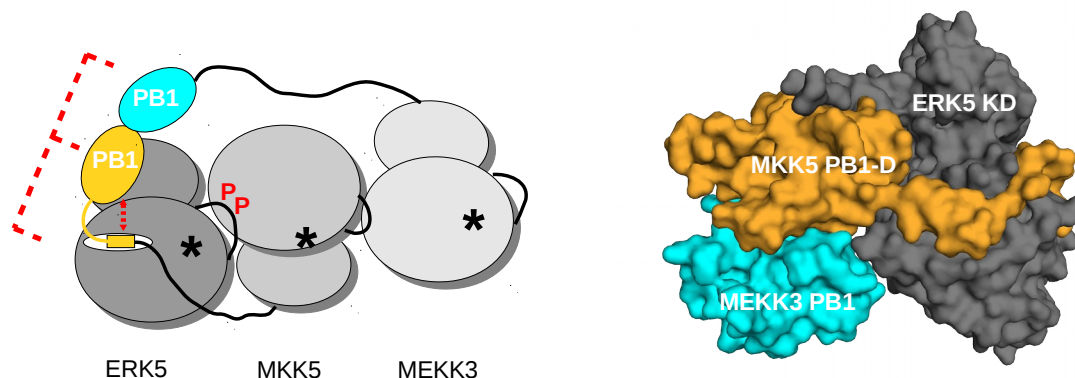


30. Ábra Az ERK5-PB1-D komplex szerkezete

(a) A komplex kristályszerkezete. Piros színezés jelzi a paralóg ERK1/2-ben nem létező, egyedi ERK5 C-terminális fehérjeszakaszt, ami a MAPK doménhez járulékosan csatlakozik. (b,c) A MAPK dokkoló árok körüli (IF1) és az ERK5 MAPK specifikus extenzió és a PB1 domén közötti kölcsönhatás (IF2) kinagyított képe. (d) Az IF1 és IF2 kialakításában fontos fehérjeszakaszok σ_A -val súlyozott Fo-Fc elektrondenzitás térképe.

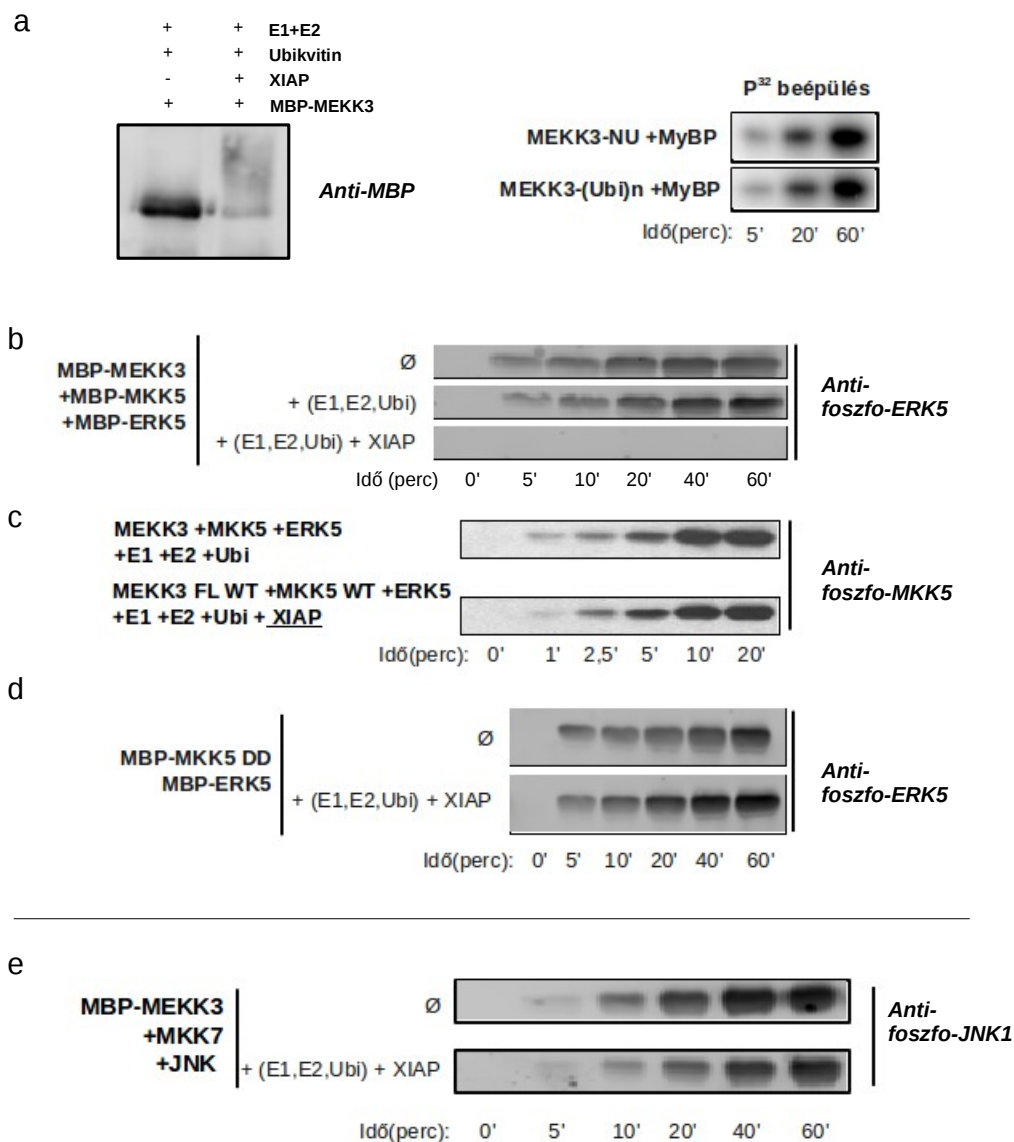
Érdekes, hogy a MEKK3 nem-degradatív (K63) típusú ubikvitinációja a XIAP ubikvitin ligáz által nagy hatással van az ERK5 jelátviteli modul működésére (Takeda et al. 2014). Kísérleteinkben rekonstruáltuk a MEKK3-MKK5-ERK5 háromszintű kináz kaszkádot in vitro és vizsgáltuk a XIAP által katalizált MEKK3 ubikvitináció mechanisztikai hatását és jelentőségét ERK5 aktiválásra. A kísérletekben általunk előállított és tisztított rekombináns MEKK3, MKK5, ERK5, XIAP és ubikvitin mintákat illetve megvásárolható E1, E2 enzimeket használtunk. Kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy a MEKK3 ubikvitináció önmagában nem változtatja meg az enzim aktivitását egy generikus fehérje kináz szubsztráton (mielin bázikus fehérje), sőt a MEKK3 → MKK5 átmenet is intakt maradt. Ubikvitináció a MEKK3 által beindított MKK5-ERK5 átmenetre hatott, míg érdekes módon a MEKK3-MKK7-JNK1 modulban a XIAP által generált MEKK3 ubikvitinációnak nem volt hatása a JNK1 aktivációra (32. Ábra). Eredményeink arra

utalnak, hogy a MEKK3-n felépült ubikvitin láncok specifikus módon képesek „szétkapcsolni” az MKK5-ERK5 bináris komplexet a trimerikus komplexben.



31. Ábra *MEKK3(PB1)-MKK5(PB1)-ERK5 komplex szerkezeti modellje*

A jobb oldali szerkezeti modellt a MEKK3(PB1)-MKK5(PB1) heterodimer (PDB ID: 2O2V) és az ERK5-PB1-D komplex kristályszerkezetek MKK5(PB1) doménon keresztüli szuperpozíciójával hoztuk létre. Az így összeállított harmadlagos komplex nem mutat sztérikus összeférhetetlenséget, s a MEKK3-MKK5-ERK5 funkcionális komplex központi kölcsönható magjának szerkezeti modelljének tekinthető, amihez a MAP2K és MAP3K domének valószínűleg flexibilis köztés szakaszokon keresztül csatlakoznak.



32. Ábra MEKK3 ubikvitináció hatása az ERK5 és JNK MAPK modulra

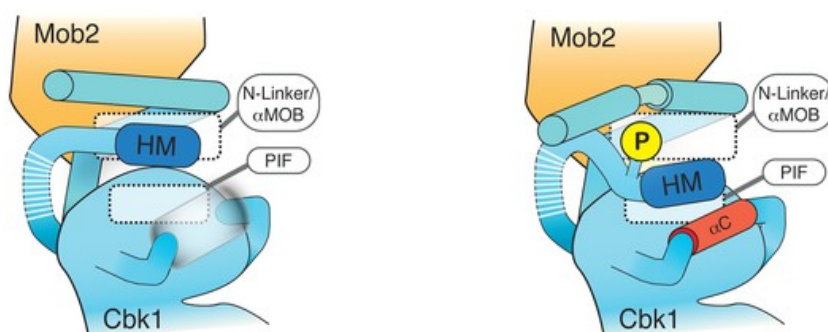
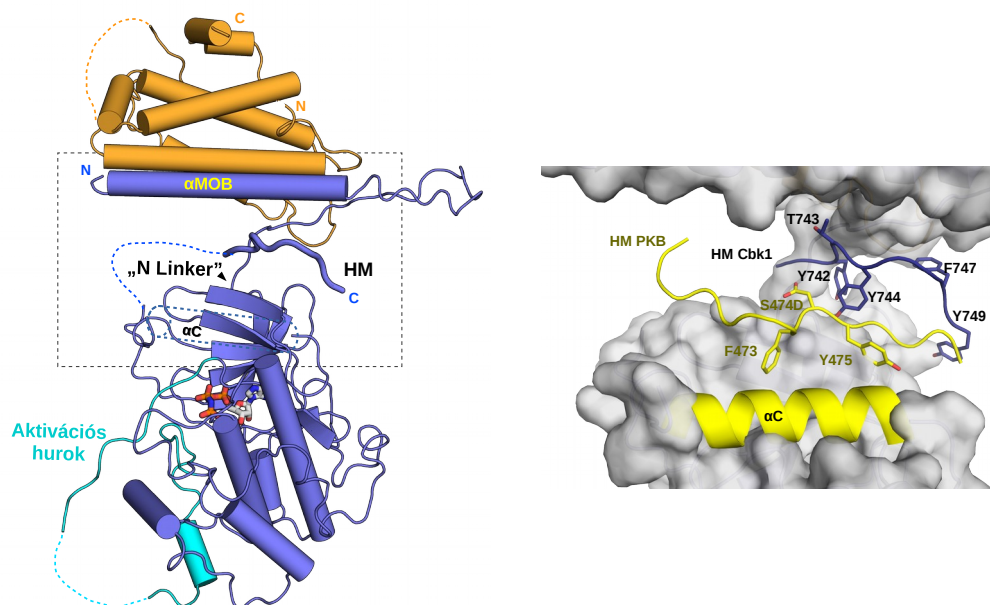
(a) Rekombináns, tisztított MBP-MEKK3 a XIAP ubikvitin E3 ligáz hatására ubikvitinálódik (balra), de az így módosított fehérje kináz aktivitása egy generikus kináz szubsztráton nem változik (MyBP: mielin bázikus fehérje). (b,c,d) In vitro rekonstitúciós esszék ERK5 MEKK3-MKK5 komplex általi foszforilációjára. A panelek különböző anti-foszfo ellenanyagokkal kivitelezett Western-blottok eredményeit mutatják. XIAP általi ubikvitináció hatására az ERK5 nem foszforilálódik (panel b), de a MEKK3-MKK5 átmenet intakt (panel c), hasonlóan az MKK5-ERK5 átmenethez (panel d), ahol az utóbbi esetben egy konstitutíven aktív MKK5 (MKK5DD) konstrukciót használtunk. (e) A XIAP általi ubikvitinációnak a MEKK3-MKK7-JNK1 átmenetekben nincs hatása.

4.5. Lineáris motívumok az élesztő NDR/LATS kináz alapú jelátvitelben

A korábbi fejezetekben bemutattam, hogy a lineáris kötő motívumok általi kölcsönhatásoknak milyen fontos szerepe van a MAPK alapú jelátvitelben. Klasszikus MAPK-D-motívum szerű

fehérje-peptid dokkoló kölcsönhatások más fehérje kinázok, sőt foszfatázok esetében is ismertek (Reményi et al. 2006). Korábban egy bioinformatikai algoritmus segítségével - amely élesztő genomok rendezetlen fehérje régióiban keresett rövid, evolúciósan nagymértékben konzervált szakaszokat - leírtak olyan motívumokat, amik a szerkezetileg korábban ismeretlen NDR/LATS kináz család élesztőből szárazó Cbk1 nevű kinázához kötődtek ([YF]_xFP motívumok) (Nguyen Ba et al. 2012). Az NDR/LATS kinázok tágabb értelemben az AGC kinázokhoz tartoznak, Mob ko-aktivátor fehérjékkel együttműködve emlősökben például a Hippo jelátviteli pálya központi regulátorai, ahol sejtosztódás és apoptózis szabályozásán keresztül szervek méreteit határozzák meg (Meng et al. 2016), míg élesztőben a citokinezis utolsó fázisában a sejtek korrekt szétválásában szerepet játszó enzimek termelődését és aktivitásáért felelnek (Brace et al. 2011).

NDR/LATS kinázok közös jellemzője egy helikális extenzió ami az AGC kináz doménhez N-terminálisan csatlakozik. Az AGC kinázokhoz tartozik egy hidrofób motívum (HM) a kináz doméntól C-terminálisan, aminek a foszforilációja - az aktivációs hurok foszforilációján túl - szükséges a kináz aktivitásához (pl. Akt/PKB, PKC). Az NDR/LATS kinázok N-terminálisan elhelyezkedő helikális extenziója (α MOB) pedig Mob ko-aktivátor fehérjék kötődését teszi lehetővé, s Mob fehérjék nélkül a kináz nem aktív. Központi funkcionális jelentőségük ellenére az NDR/LATS kinázok szerkezete korábban nem volt ismert. Az első NDR/LATS kináz szerkezetet mi határoztuk meg (**33. Ábra**) (Gógl et al. 2015). Az élesztőből származó Cbk1-Mob2 kináz-koaktivátor komplex kristályszerkezetéből kiindulva MD szimulációk segítségével feltártuk a hidrofób motívum foszforilációjának és a Mob ko-aktivátor kötődésének az együttes jelentőségét, s modelljeinket in vivo kísérletekkel ellenőriztük is (**33. Ábra**) (Gógl et al. 2015).

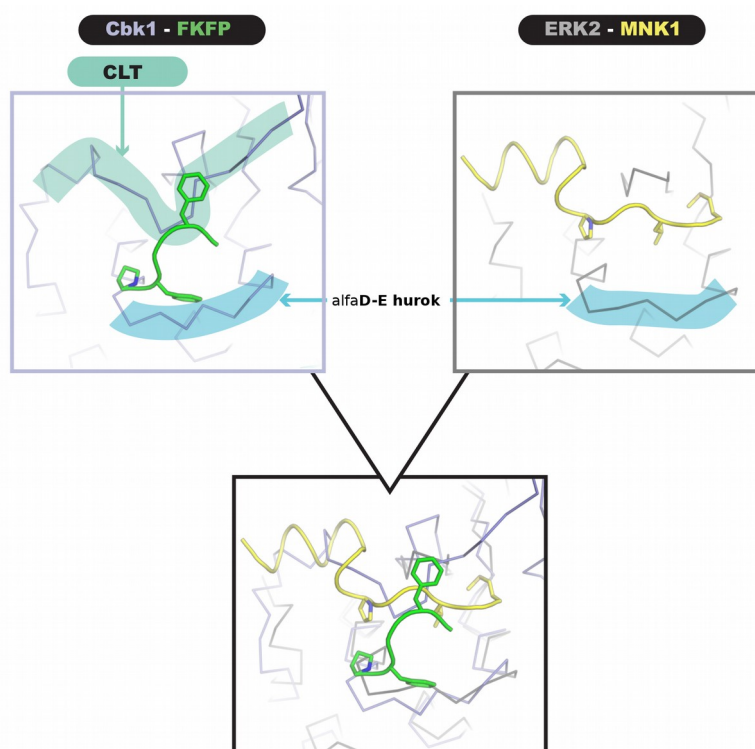
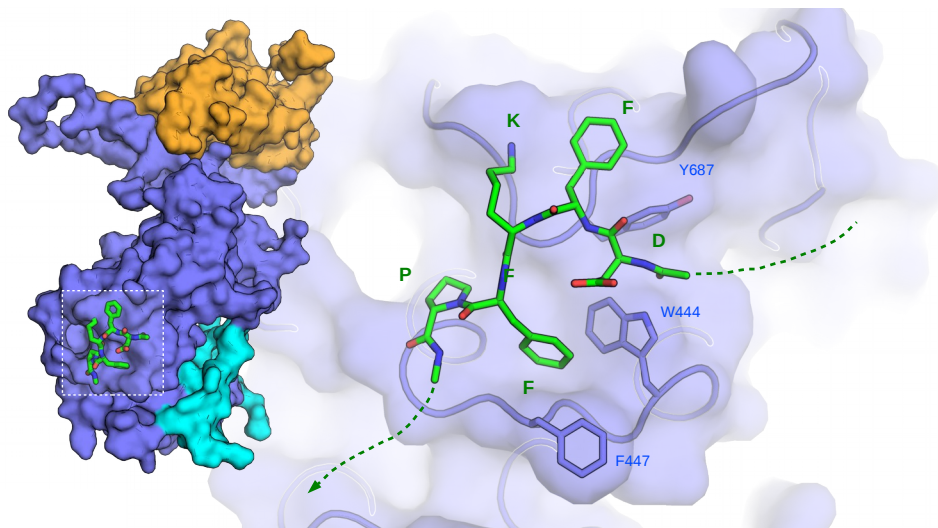


33. Ábra A Cbk1-Mob2 kináz-koaktivátor komplex kristályszerkezete és aktivációs modellje

Felül: A Cbk1-Mob2 komplex kristályszerkezete (balra) és a téglalappal jelölt rész kinagyítotva (jobbra). A bal oldali panelen a kristályszerkezetben nem látható, flexibilis régiók szaggatott vonallal vannak jelölve. A jobboldali panel a PKB α C hélixét és a PKB hidrofób (HM) régióját a Cbk1 szerkezetre helyezve mutatja. A Cbk1 HM régiója és rajta az allosztérikusan aktiváló hatású T743 aminosav jól láthatóan máshol helyezkedik el a PKB HM-jéhez képest (Yang et al. 2002). Továbbá, a Cbk1 α C hélix rendezetlen, pedig ennek a régióknak kitüntetett szerepe van a kinázok nukleotid kötésében, s ezáltal az aktivációjukban (Endicott et al. 2012). Alul: A Cbk1 NDR/LATS kináz aktivációs mechanizmusának modellje. A HM régióban lévő T743 aminosav egy felsőbb szintű kináz által foszforilálódik, ami révén a Cbk1-Mob2 komplex autoaktív lesz és aktivációs hurkának auto-foszforilációja után nyeri el teljes aktivitását (utóbbi nincs bemutatva a modellen). A panelek bemutatják, hogy a Cbk1-Mob2 komplex két kötőzsebbel rendelkezik, ami a HM szabályzó régiót kötheti: N-Linker/ α MOB hasadék illetve a PKB-ban megfigyelhető ún. PIF zseb (Yang et al.

2002). Molekula dinamikai szimulációk azt sugallták, majd amit később kísérletesen valószínűsítettünk is (Gógl et al. 2015), hogy T743 foszforiláció hatására az inaktív komplexben rendezetlen α C rendeződik a foszforiláció hatására újonnan kialakuló sóhidak miatt. A foszforiláció hatására a Mob2 koaktivátorhoz való kötődésben résztvevő α MOB régió átrendeződése miatt így végül is a HM a PIF alsó zsebbe kerül és így a kináz katalitikus aktivitásában fontos α C rendeződését s megfelelő orientációba való állítását segíti elő. (α MOB: NDR/LATS kináz konzervált helikális régió, amit a kináz doménnel az N-Linker régió köt össze; HM: hidrofób motívum, ami az AGC kinázok foszforilálható, allosztérikus szabályzó régiója; PIF: a PKB-ban először leírt foszfo-HM kötő zseb, s a modellben a PKB HM foszforilációját az S474D mutáció „utánozza”.)

Biokémiai kísérletekkel karakterizáltuk a Cbk1-Mob2 komplex kötődését két különböző szubsztrátból (Ssd1 és Ace2) származó dokkoló peptidekkel, melyek a HxRRxxS/T Cbk1 célhelyek foszforilációját segítik. *In vivo* kísérletekkel aztán sikerült bemutatni, hogy az Ssd1-ben és Ace2-ben lévő [YF]xFP típusú dokkoló motívumok a fehérjékben elhelyezkedő AGC kináz célhelyek foszforilációját növelik, s ezen keresztül az adott enzim-szubsztrát jelátviteli kapcsolat robusztusságát fokozzák *in vivo*. Továbbá a finomított konszenzusok segítségével felállított [YF]xFP dokkoló és Cbk1 célszekvenciák együttes előfordulása alapján sikerült több olyan Cbk1 szubsztrátot azonosítani, amik a citokinezis utolsó, a sejtek megfelelő szétválását biztosító folyamataiban játszanak szerepet. Sajnos ezeknek a kis affinitású (5-20 mikromólos) fehérje-peptid komplexeknek nem sikerült meghatározni a 3D szerkezetét, de *ab initio* dokkolással, majd azt követő kísérletes ellenőrzéssel sikerült feltérképezni az Ssd1-ből származó [YF]xFP motívum dokkoló árkát a Cbk1 kináz doménjén. Meglepő módon az [YF]xFP motívum az AGC kináznak abba a hasadékába kötődik, ami topológiai értelemben a MAPK-ok D-motívum kötő árkának felel meg, bár ez a hasonlóság nyilván csak konvergens evolúció révén alakulhatott ki (**34. Ábra**).



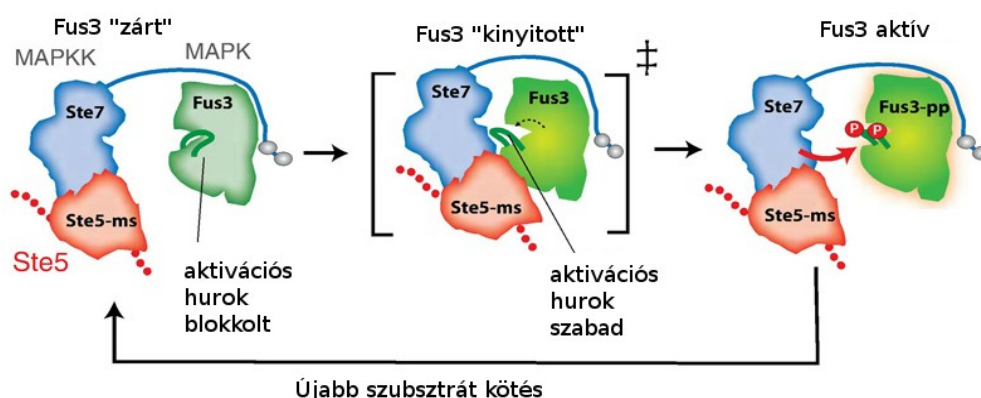
34. Ábra A Cbk1 NDR/LATS és a Fus3 MAP kináz dokkoló árka

Felül: Cbk1-Mob2-pepSSd1(DFKFP) komplex szerkezeti modellje. Alul: A Cbk1 AGC kináz doménjéhez kötődő [YF]xFP motívumok és az ERK2 MAPK doménjéhez kötődő D-motívumok ugyanahhoz a kináz domén régióhoz kötődnek, bár a két kináz domén eltérő sajátosságai miatt a kötődési módok teljesen eltérőek. CLT: „C-lobe tether”, ami az AGC kinázokra jellemző szerkezeti elem; a C-terminális hidrofób motívum (HM) régiót a minden fehérje kinázban hasonló kináz domén „maggal” köti össze. Utóbbinak részei a konzervált α D és α E hélixek, s a köztük lévő hurok az ábrán mindkét esetben a dokkoló árok része.

5. Diszkusszió

5.1. MAPK vázfehérjék: Ste5 vs. JIP1

A Ste5 élesztő vázfehérjére vonatkozó mechanisztikus munkánkat szeretnénk volna kiterjeszteni a JIP1 humán vázfehérjére is. A kutatás azonban egy sikerközpontú tevékenység, ezért „negatív” eredményeket nehéz publikálni. Előfordulhat, hogy sokszor logikusnak tűnő hipotézisek nem állják ki a kísérleti tesztelés próbáját. Ezek azonban mégis előrébb visznek, mert legalább arra elegendőek, hogy egy nyilvánvaló lehetséges mechanizmust kizárjunk. A következő sorokban röviden beszámolok azokról az eredményeinkről, amik nem kerültek ugyan publikálásra, de mégis ahhoz vezettek, hogy ma már meggyőződéssel mondhatom, hogy a JIP1 és Ste5 vázfehérjék mechanisztikailag teljesen másképp érik el ugyanazt, azaz MAPK-ok specifikus aktivációját (lásd **8. Ábra**). Élesztőn való munkánk bemutatta, hogy a Ste5 egy komplex biokémiai vázfehérjeként működik és például aktívan segíti a Ste7-Fus3 jelátvitelt (**35. Ábra**) (Good et al. 2009). Sőt, később mások még egyéb érdekes biokémiai „trükkökre” is fény derítettek (Good et al. 2011).

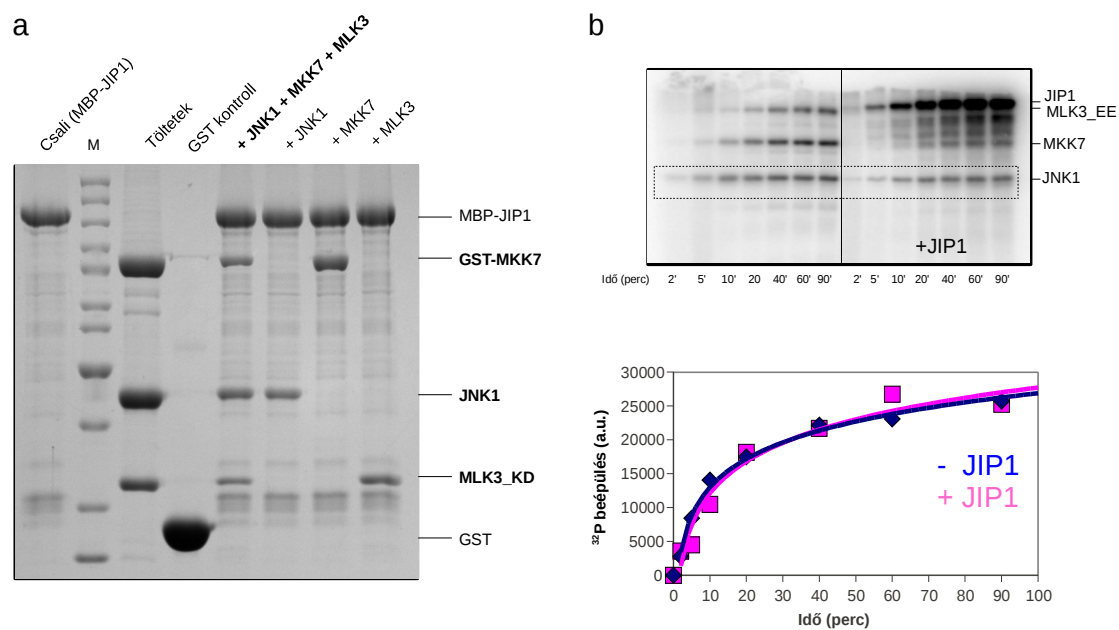


35. Ábra A Ste5 jelátviteli vázfehérje mint koenzim

A Ste5 vázfehérje tartalmaz egy szerkezeti elemet (Ste5-ms: 593-786; ms: mini scaffold), ami a Ste7 MAP2K Fus3 szubsztrátra specifikus ko-aktivátoraként szolgál. A Ste7-Fus3 bináris komplexet a Ste7 rendezetlen N-terminálisában lévő D-motívum tartja össze, de ebben a komplexben a Ste7 nem képes a Fus3 aktivációs hurkának foszforilációjára, mert utóbbi „zárt” konformációban van. A hurok „fellazítása”, s ezáltal a hatékony Ste7 → Fus3 jelátvitel csak a Ste5-ms:Ste7:Fus3 komplexben történik meg (Coyle et al. 2013).

Csoportomban kidolgoztunk eljárásokat arra, hogy a Fus3 élesztő MAPK modulon végzett munkánkhoz hasonlóan a humán JNK modul komponenseit rekombináns módon, tisztított formában állítsuk elő (MAP3K: MLK3, MAP2K: MKK7 és MAPK: JNK1) és JIP1 hatását in vitro

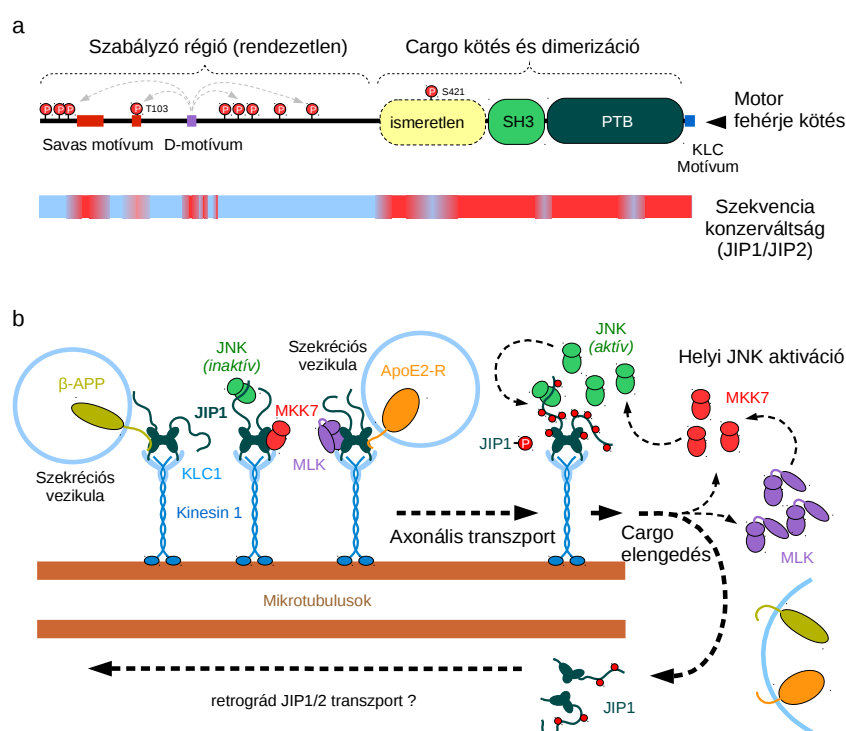
esszékben tanulmányozhassuk. Ez a megközelítés alkalmas lett volna a JIP1 mechanisztikai szerepének a tisztázására. A JIP1 hatása sejtes rendszerekben a JNK aktivációjában korábban ugyanis jól dokumentált volt (Whitmarsh et al. 1998), de mechanisztikailag a működése nem ismert. Csalódottan kellett azonban megállapítanunk, hogy a JIP1-nek nincs hatása a MAP3K-tól a MAP2K-on keresztül terjedő MAPK aktivációra *in vitro* rekonstitúciós esszékben, bár valóban képes mind a három JNK MAPK modul komponens kötésére *in vitro* (36. Ábra). Sőt redukált *in vitro* rendszerekben inkább gátló hatása van, mert a JIP1-ben lévő JNK dokkoló motívum hatékonyan kompetál az MKK7-JNK1 aktivációhoz szükséges szintén dokkoló hasadékat használó interakcióval (nincs bemutatva). Sőt az is lehetséges, hogy az irodalomból jól ismert JIP1 D-motívum egy JNK aktivációra nézve negatív elem, ami valamiféle JIP1 foszforiláción alapuló negatív visszacsatolás miatt fontos. Ilyen szempontból viszont talán mégis hasonlít működésében valamelyest a Ste5-höz (Bhattacharyya, Reményi, Good, et al. 2006).



36. Ábra A JIP1 nem egy „biokémiai” vázfehérje

(a) MBP pull-down kísérletek rekombináns, tisztított JNK MAPK modul komponensekkel. Az SDS PAGE gél Coomassie fehérje festékkel volt festve (MLK3_KD: kinase domén konstrukció; M: fehérje méret marker; alulról felfelé: 25, 30, 40, 50, 85, 100, 120, 135, 150, 185, 200 KDa). (b) *In vitro* kináz esszékben a JIP1 fehérjének nincs hatása az MLK3-MKK7-JNK jelátvitelben. (MLK3_EE: konstitutíven aktív kináz.) A felső panel a foszfor imaging segítségével készített SDS-PAGE autoradiogramját mutatja, alul pedig ebből a JNK1 foszforiláció kinetikai profilja van bemutatva. (Az fehérjék defoszforilált állapotban kerültek a reakcióba és 1 mikromos koncentrációban voltak jelen. „+JIP1” kísérletben látható masszív fekete sáv a JIP1 JNK általi foszforilációjának feleltethető meg.)

Ma úgy gondolom, hogy a JIP1 nem egy Ste5-típusú „biokémiai” vázfehérje, hanem inkább egy, csak a sejtes kontextusban értelmet nyerő jelátviteli modulátor. A JNK aktivációra kifejtett pozitív hatását annak köszönheti, hogy a MAPK-t illetve a JNK modul egyéb aktivátor kinázait a sejten belül olyan térbeli kompartmentekbe szállítja, ahol ezek koncentrációja megnőhet és így közvetetten növeli az egyes modul komponensek lokális koncentrációját (**37. Ábra**). Sajnos az utóbbira konkrét kísérletes bizonyítékom nincs, de egy korábbi logikusnak tűnő hipotézis ledöntése révén felállt egy újabb, aminek mentén a jövőbeli vizsgálatainkat a JIP1 vázfehérje működésének megértésére tervezzük.



37. Ábra A JIP1 szerepe a jelátviteli cargo szállításában

(a) JIP1 fehérje domén architektúrája. Az N-terminális régió rendezetlen, míg a C-terminális rész több szerkezeti domént tartalmaz (pl. SH3, PTB) illetve egy rövid kinezin (KLC) kötő motívumot. Az N-terminális régió tartalmaz egy JNK kötő D-motívumot, egy ismeretlen funkciójú, negatív töltésű (savas) aminosavakban gazdag régiót, illetve számtalan JNK foszforilációs célhelyet, melyek közül kettőről (T103, S421) feltételezhető, hogy van szerepe a kinezin-cargo kötés JNK-n keresztüli regulációjában (Fu & Holzbaaur 2013). Az alsó diagramon a különböző gerinces JIP1 és JIP2 homológok közötti szekvencia konzerváltság mértéke van feltüntetve (piros: erős, kék: gyenge). (b) JIP1 vázfehérje szerepe a mikrotubulus függő, idegsejteken belüli transzport folyamatokban. JIP1 dimerek képesek membrán fehérjék szállítására (pl. β -APP és ApoE2-R), melyek szekréción vesikulákhoz kötődnek (Horiuchi et al. 2007). A szállításban a kinezin motorfehérje vesz részt, melyekhez a különböző cargo fehérjék a kinezin könnyű láncán (KLC)

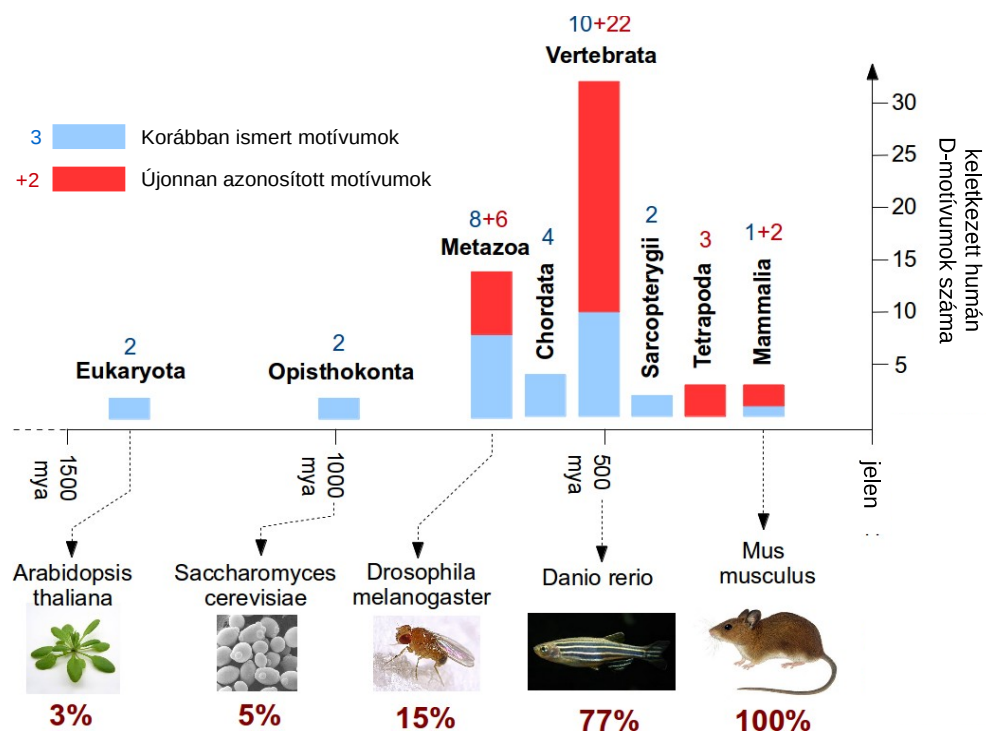
keresztül kötődnek. A KLC képes kötni a JNK modul felsőbb szintű kinázait is (MAP2K: MKK7, MAP3K: MLK3 és DLK), melyeket aztán axon terminálok közelébe szállít. Ez a JIP1/2 függő transzport folyamat a modell alapján végül lokális JNK aktivációt eredményezhet bizonyos sejten belüli régiókban, és a JIP1 kiütése sejten belül vagy *in vivo* valóban JNK pálya aktivitás csökkenéshez vezet (Dajas-Bailador et al. 2008). Ennek azonban csak sejtes folyamatokon keresztül megnyilvánuló mechanisztikus okai vannak, ami egy *in vitro*, csak a MAPK modul komponenseket tartalmazó redukált rendszerben nem nyilvánulhat meg.

5.2. Fehérje kinázok dokkoló kölcsönhatásai: szerkezeti evolúcióbiológia

Lineáris kötő motívumok azonosítása szekvencia alapon nehéz feladat a konszenzus pozíciók csekély száma valamint a kevés ismert példák alapján felállítható konszenzus szekvenciák bizonytalansága miatt (Tompá et al. 2014). A probléma sokszor kettős: egyrészt nagy léptékű, proteóm szintű kereséshez kevés az információ a csupán pár pozícióban konzervált, rövid (10-15 aminosavas) fehérjeszakaszokban, másrészt a nem szisztematikus módon kivitelezett tanulmányokból gyűjtött példák felépített konszenzusok nem tükrözik fizikailag egységes kötődési módokat. MAPK kötő D-motívumok proteóm szintű azonosításához szükséges volt mindkettő problémát egyszerre kezelni. A megoldást egy szisztematikus tanulmány hozta, ami képes volt a korábbi „laza” konszenzusokat szerkezetileg egységes rendszerben kezelni, s a keresés során a szekvencia egyezéseken túl szerkezeti kompatibilitás kényszereket is alkalmazott (Zeke et al. 2015). A MAPK D-motívumok nagy léptékű, proteóm szintű azonosítására tehát a szerkezeti biológiai megközelítés hozta meg az áttörést. Valószínűnek tartom, hogy hasonló, a kölcsönhatások fizikai természetét is megragadni képes szerkezet alapú megközelítések más fehérje kinázok vagy foszfatázok esetében is sikerrel lesznek használhatók. Persze mindehhez az adott fehérje-peptid típusú kölcsönhatás részletes karakterizálása szükséges. A következő sorokban bemutatom, hogy a MAPK D-motívumok szisztematikus azonosításának eredményeképpen létrehozott magas, kísérletesen validált elemszámok birtokában fontos megfigyeléseket tehetünk egy fehérje kináz alapú jelátviteli rendszer kölcsönhatásainak evolúciójára vonatkozólag.

Evolúciós szempontból például érdekes volt megvizsgálni 62 validált humán D-motívum előfordulását a humán fehérjék ortológjaiban (**38. Ábra**). Az analízis alapján elmondható, hogy a legtöbb ma ismert, humán fehérjékben előforduló motívum (54/62) az előgerinchúrosokban/gerincesekben jelent meg először és csupán néhány motívum vezethető vissza az egysejtű eukariótákig (pl. a MAP2K-ok D-motívuma). Ez azért is meglepő, mert a MAPK-ok evolúciósan konzervált enzimek: az élesztő Fus3 MAPK-a például jól köti a humán D-motívumokat és ez fordítva is igaz: humán MAPK-ok kötnek élesztő D-motívumokat is (Grewal et al. 2006). Ez azt mutatja, ami egyébként szerkezetekből is jól látszik, hogy a MAPK dokkoló árkok élesztőtől az

emberig csak a paralógok között változtak, de az ortológokban drámai módon konzerváltak maradtak. A D-motívumok evolúciós analiziséből azonban az tűnik ki, hogy a MAPK-ok partnerei az evolúció során gyorsan változtak. Például léteznek olyan motívumok is, melyek csak emlősökben találhatóak meg, de korábbi ortológokból hiányoznak.

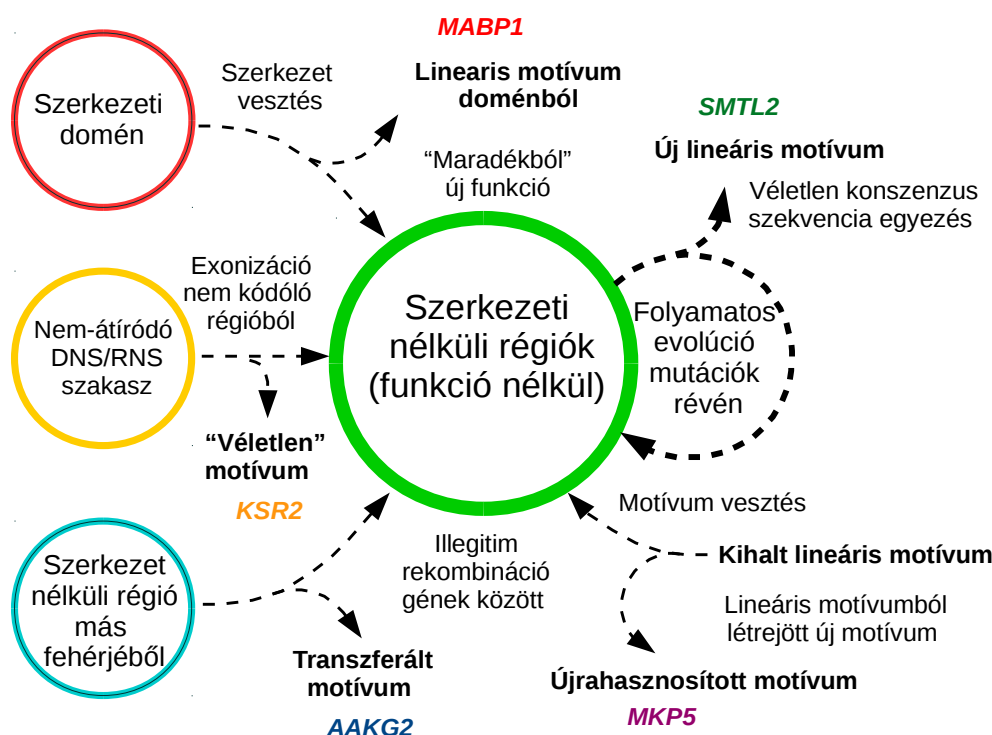


38. Ábra D-motívumok evolúciós analizise

Az ábra összegzi a korábban ismert és a legutóbbi tanulmányunkban újonnan azonosított humán D-motívumok eloszlását a különböző ma élő organizmusokban (Zeke et al. 2015). A felső grafikon mutatja, hogy a 62 validált humán motívumból melyik meddig követhető vissza a homológ fehérjékben. Alul a % értékek azt mutatják, hogy egy adott modell organizmusban az ismert humán motívumok mekkora része található meg. (A grafikon x tengelye a közös ősből való elválás hozzávetőleges idejét tünteti fel; mya: millió évvel ezelőtt.)

A D-motívumot tartalmazó humán fehérjéknek sok esetben vannak paralógjai (1,2 vagy 3), melyeknek létrejötte valószínűleg a korai gerinces evolúció két független genom duplikációjára (illetve a későbbi néhány egyedi génvesztésre) vezethető vissza (Ohno 1993). A D-motívumok paralógokban való megoszlása azt sugallja, hogy a D-motívum létrejötte lehetővé tette egy génduplikációval újonnan létrejött fehérjének az ősi MAPK jelátviteli rendszeren keresztüli specifikus regulációját (Zeke et al. 2015). Ez felveti, hogy milyen genetikai mechanizmusok révén jöhetnek létre D-motívumok fehérjékben? Ennek a kérdésnek a megválaszolását a tanulmányunk során nagy számban kísérletesen ellenőrzött humán D-motívumokat tartalmazó fehérjék

törzsfajlódási szekvencia analízise tette lehetővé. Funkcionális MAPK kötő régiók létrejöttenek valószínűleg leggyakoribb mechanizmusa a véletlen mutáció fehérjék rendezetlen régióiban. De számos más mechanizmusra is találhatunk példákat: illegitim rekombináció gének között, intronok exonizációja, vagy korábbi strukturált domének szétesése mutációk révén (39. Ábra).



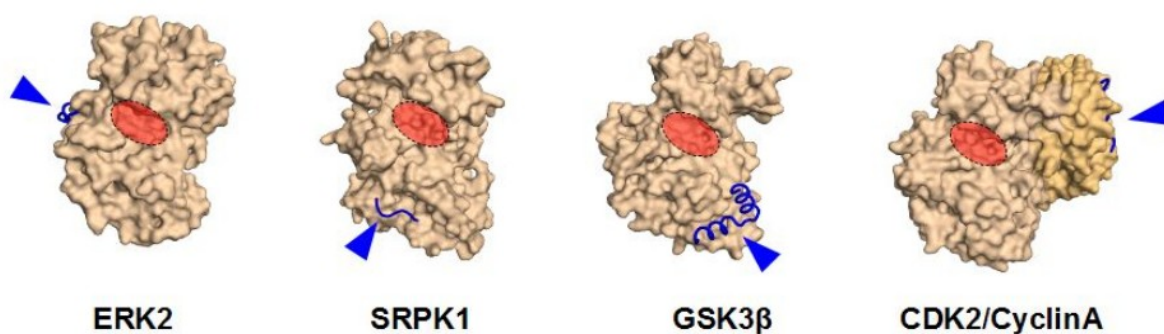
39. Ábra D-motívumok létrehozását biztosító genetikai mechanizmusok

D-motívumok sokféle módon keletkezhetnek, amit néhány D-motívumot tartalmazó fehérje példáján keresztül szemléltethetünk. Leggyakrabban fehérjék szerkezet nélküli szakaszait érintő véletlen pontmutációk révén (pl. SMTL2). De keletkezhetnek korábban strukturált doménekből is azok rendezetlenné válása révén is (pl. MABP1), vagy teljesen *de novo* korábban át nem íródó DNS/RNS szakaszokból (pl. KSR2). Továbbá, lineáris motívumok létrejöhetnek más korábbi motívumokból gén fúziók vagy rekombinációs események révén (pl. AAKG2, MKP5) (Zeke et al. 2015).

Fehérje kinázok kötő partnereiket legtöbb esetben módosítják, foszforilálják, s ezért utóbbiak legtöbbször tartalmaznak kináz foszforilációs célszekvenciákat. Egy fehérje kináz szubsztráttal való kötődésének a hatása funkcionális értelemben a célhely módosításával járó mechanisztikai hatásokon keresztül vizsgálható legkézenfekvőbb módon. A fehérje kináz célhelyek, melyek maguk is legtöbbször fehérjék rendezetlen szakaszain helyezkednek el, működés szempontjából foszfo-kapcsolók, bár szubsztrátok olyan helyeken is foszforilálódhatnak, melyeknek (még) nincsen különösebb funkcionális jelentősége. Funkcionális célhelyek foszforilációja viszont megváltoztathatja 1) a fehérje kináz szubsztrát aktivitását allostérikus módon (allostérikus

kapcsoló) vagy 2) a szubsztrát kölcsönhatásait más fehérjékkel (pl. a foszfát csoport közvetlenül gátolja két fehérje kötődését; negatív FFK kapcsoló; vagy létrehoz egy foszfo-aminosav domén kötő helyet; pozitív FFK kapcsoló). Az utóbbi esetet két speciálisabb, funkcionális szempontból nagy jelentőségű esetre lehet bontani, ahol i) a fehérjék különböző kompartmentekbe való lokalizációja változik (pl. sejtmag-citoplazma transzport változás foszfo-függő NLS-ek vagy NES-ek révén) vagy ii) a fehérjék stabilitása változik sejten belül (pl. degradatív E3 ubikvitin ligáz kötőhelyek létrehozása révén; foszfo-degron). Fehérje kináz alapú jelátviteli hálózatok működésének és evolúciójának megértéséhez tehát a fizikai kötőpartnerek feltérképezésén túl, a jelátviteli logika alapját adó poszttranszlációs módosítás, mint elemi esemény hatásának a szisztematikus leírása is szükséges. Ezért a jövőben a MAPK alapú foszfo-kapcsolók szisztematikus feltérképezését tervezzük.

Összefoglalva elmondható, hogy fehérje kináz kötő lineáris motívumok létrejöhetnek véletlen mutációk révén *ex nihilo* fehérjék rendezetlen régióiban (Davey et al. 2015), vagy a fentiekben ismertetett egyéb genetikai átrendeződések révén (Zeke et al. 2015). De hogyan jönnek létre a lineáris kötőmotívumokra specializálódott dokkoló hasadékok a fehérje kinázok felszínén? Ha kiragadjuk az ismert példákat a humán kinóm CGMC szuper családjából - melyeknek tagjai nem rendelkeznek a kináz doménjük mellett ismert egyéb targetáló doménnel vagy régióval (lásd **4. Ábra**), s ezért partnereik kiválasztásában a kompakt kináz doménjükre vannak utalva - akkor láthatjuk, hogy változatos megoldások léteznek a dokkoló hasadékok elhelyezkedésére, kialakulására (**40. Ábra**).



40. Ábra Dokkoló hasadékok és peptidek a CGMC kináz családban

A dokkoló hasadékok elhelyezkedése a kináz doméneken a CMGC kinázok csoportjában változatos lehet. Mindegyik kristályszerkezet hasonló orientációban van bemutatva. Piros ovális mutatja az ATP kötő zseb helyét, a dokkoló peptid kékre van színezve, a CDK2/cyclinA szerkezetben a ciklin alegység narancssárga. ERK2-pepMNK1 (Garai et al. 2012), SRPK1-pepASF/SF2 (Ngo et al. 2008), GSK3-FRATide (Bax et al. 2001), CDK2/CyclinA-pepCDC6(RxL) (Cheng et al. 2006).

A MAPK-ok és ciklin-függő kinázok (CDK) dokkoló kölcsönhatásainak összehasonlításakor érdekes megfigyeléseket tehetünk. Mindkét kináz csoport tagjai hasonló foszforilációs célszekvenciával rendelkeznek (mivel a prolin-irányított kinázok közé tartoznak). Funkcionálisan természetesen teljesen más szerepük van. Szubsztrát kötődésük során mindketten dokkoló kölcsönhatásokat használnak: a MAPK-ok D-motívumot kötő árka a kináz doménon helyezkedik el, ahogy azt korábban bemutattuk, a CDK dokkoló árka viszont, ami az RxL típusú lineáris motívumokat köti, a ciklin alegységen helyezkedik el (Cheng et al. 2006). Érdekes, hogy a CDK-k, MAPK-okban látható hidrofób dokkoló zsebei a fehérje C-terminálisán elhelyezkedő hidrofób aminosavak által intra-molekuláris módon „töltött”. A MAPK-okban ezek a hidrofób zsebek (ϕA és ϕB) nyitottak, mert a MAPK-ok C-terminális látványosan különbözik CDK-k C-terminálisától; előbbi ugyanis kialakítja a negatív töltésű CD árkot, úgy hogy nem a hidrofób zsebek felé kanyarodik vissza, hanem a MAPK domén N-terminális felé ahol egy C-terminális hélix segítségével stabilizálja a kináz N-terminális lebenyét, valahol ott ahol a CDK-k esetében egyébként a ciklinek kötődnek (lásd **16.b Ábra**). Mivel a MAPK-k evolúciós szempontból közeli rokonai a CDK-knak, adódik a lehetőség, hogy az evolúció során egy közös ősből a két kináz család tagjai úgy válhattak el, hogy a kináz doménjük C-terminális eltérő deléciós illetve addíciós utakat járt be, s ezáltal lehetővé vált teljesen újszerű szubsztrát szelektivitású profilok kialakítása anélkül, hogy a kináz „mag” és annak célhely szekvencia preferenciája alapjaiban módosult volna.

A dokkoló hasadékok evolúciójára vonatkozólag a MAPK és Cbk1 NDR/LATS kináz dokkoló peptid kötő felszíneinek az összehasonlítása is érdekes. MAP kinázok teljesen eltérő szubsztrát célhely preferenciával rendelkeznek az AGC kinázokhoz képest: előbbieket a prolin-irányított kinázok csoportjába tartoznak, míg az utóbbiak esetében a foszforilálódó aminosavat pozitív töltésű aminosavak előzik meg. Ezek alapján a két kináz család tagjai eltérő célhely szekvencia preferenciával rendelkeznek. Az a korábban tárgyalt megfigyelés, hogy a két teljesen eltérő eredetű, mechanisztikus működés és funkcionális tekintetben élesen elkülönülő kináz csoport tagjai a kináz domén „mag” ugyanazon felszínét használják járulékos, dokkoló kölcsönhatások kialakításához valószínűsíti, hogy a MAPK-okon korábban leírt és az első NDR/LATS kináz szerkezeten újonnan feltárt dokkoló hasadék használata elterjedt lehet más, még feltáratlan fehérje kináz-partner fehérje kapcsolatokban is.

Mindezek alapján talán elmondható, hogy szerin/treonin kinázok változatos csoportjai előszeretettel használnak a szubsztrát célhely kötőzsebük mellett más fehérje-fehérje kölcsönhatásokra szakosodott kináz domén felszíneket. Legtöbbször ezek a „járulékos” felszínek adják a fehérje kináz-szubsztrát jelátviteli kapcsolatok in vivo megfigyelhető nagymértékű

specificitását.

5.3. MAPK alapú jelátviteli komplexek össze- és szétszerelése

A XIAP ubikvitin ligáz a MEKK3-hoz nem-degradatív típusú poli-ubikvitin láncokat kapcsol (Takeda et al. 2014). A XIAP az ERK5 MAPK modul aktivitását szabályozhatja így, s ennek a mioblasztok izomsejteké váló differenciálódásában lehet fontos szerepe (Klein & Cobb 2014). A konkrét molekuláris mechanizmust, ami alapján a MEKK2/3 enzimeken létrejövő ubikvitin láncok gátolják a MEKK2/3-MKK5-ERK5 modul aktivitását még nem sikerült megfejtenünk. Mindenesetre valószínű, hogy az ubikvitin láncok gátló hatásukat közvetlenül az MKK5-ERK5 komplex összeállására fejtik ki, hiszen ubikvitináció nem befolyásolta a MEKK3, illetve az MKK5 enzimek katalitikus aktivitását sem. Sőt a MEKK3-n való ubikvitináció specifikusan csak az ERK5 modult érinti, míg az MKK2/3-MKK7-JNK1 aktiváció intakt marad. A konkrét mechanizmust egy olyan modell alapján értelmezhetjük, ahol a MEKK2/3-n növekvő K63-on kapcsolt ubikvitin láncok a harmadlagos komplexen belül kompetálhatnak az ERK5-MKK5(PB1-D) interakcióval. Ilyen szempontból egyébként érdekes, hogy a Phox and Bem1p (PB1) doméneknek az ubikvitinhez hasonló ún. ubikvitin típusú szerkezete (foldja) van.

A MAPK-ok esetében az ERK5 MAPK modulra leírt XIAP által közvetített szabályzás egy jó példa arra, hogy ubikvitináló enzimek is megváltoztathatják MAPK jelpályák működését, akár a fehérjelebontó proteozómális rendszertől független mechanizmusok révén is. A MEKK2/3-MKK5-ERK5 modulon végzett munkánk eredményei tehát arra utalnak, hogy jelátviteli komplexek „szétszerelése” aktív módon történhet nem-degradatív típusú ubikvitinálás segítségével. Sőt, közös komponenseket használó komplexek esetében, a jelátviteli moduláció szelektív módon is megvalósulhat; bár kétségtelen, hogy ennek konkrét biológiai jelentőségét a MEKK2/3-MKK5-ERK5 és MEKK2/3-MKK7-JNK1 MAPK modulok esetében még nem ismerjük.

A MAPK alapú komplexek magasabb rendű szerveződésére vonatkozóan az ERK2-RSK1 MAPK-MAPKAPK komplexen végzett munkánk bemutatta, hogy lineáris motívumok miképp járulnak hozzá jelátviteli szempontból produktív negyedleges szerkezettel bíró kináz-kináz komplexek létrejöttéhez. Így felmerülhet a kérdés, hogy vajon a lineáris motívumokon keresztüli kölcsönhatásokat támadva lehet-e az ERK2-RSK1 komplex összeállását, s ezáltal a sejtnövekedést serkentő komplexen keresztüli jelátvitelt befolyásolni. Legutóbbi munkánk azt mutatja, hogy léteznek olyan természetes mechanizmusok, amik éppen ezen alapulnak. A korai gerincesekben kifejlődtek, majd később látványos expanzió mentek keresztül az S100 kalcium kötő fehérje család tagjai (Heizmann et al. 2002). A humán S100B fehérje a metasztatikus melanómák egy

diagnosztikai markere (Bresnick et al. 2015), mi pedig azt találtuk, hogy ez a fehérje kalciumtól függő módon képes az ERK2-RSK1 komplex összeállítását specifikusan gátolni (Gógl et al. 2016). Az S100B az RSK1-nek ugyanis azt a MAPK kötő motívumot tartalmazó régióját köti, ami az aktív ERK2-RSK1 komplex kialakulásához nélkülözhetetlen. Ez miatt várható, hogy a melanómákban nagy koncentrációban jelenlévő S100B fehérje az ERK2-RSK1 komplexet használó sejtes folyamatokra hatással lesz, mert könnyedén „elállíthatja” az egészséges sejtekben a proliferációs és apoptotikus folyamatok között fennálló egyensúlyt; bár igaz, hogy további tanulmányok szükségesek annak tisztázására, hogy ez milyen szerepet játszik melanómák kialakulásában.

Talán a sejtsztódásban játszott központi szerepe miatt az ERK-RSK komplex még a Kaposi szarkómát okozó Humán Herpesz Vírus 8 (HHV8 vagy másképp Kaposi sarcoma-associated herpes virus, KSHV) egyik ORF-jének is a kötőpartnere (Avey et al. 2015). A KSHV ORF45 fehérje az ERK1/2-RSK1/2 komplexekhez kötődve valahogyan eléri, hogy az ERK-RSK komplexek nagyobb aktivitást mutatnak a vírussal fertőzött sejtekben (Kuang et al. 2008). A mechanizmus erre az S100B kötődéssel éppen ellentétes hatásra, aminek valószínűleg az ERK-RSK-ORF45 harmadlagos komplex összeállása lehet a háttérében, még pontosan nem ismert. Előzetes eredményeink ezen a téren azonban arra utalnak, hogy a KSHV ORF45 fehérje olyan rendezetlen régiókat tartalmaz, amik révén a fehérje egyszerre képes kötni ERK1/2 és RSK1/2 fehérjéket (nincs bemutatva). Reményeink szerint ezen a rendszeren új, a D-motívumoktól eltérő lineáris MAPK kötő motívumot és új MAPK dokkoló felszín tárhatunk fel, illetve talán lehetőségünk nyílik majd a Cbk1 AGC kináz doménjén feltárt dokkoló felszín összehasonlítására az RSK1/2-ORF45 bináris komplexben kialakuló felszínnel. Kísérletekből ugyanis tudjuk, hogy az utóbbi kölcsönhatás a MAPKAPK N-terminális AGC doménje és az ORF45 egy lineáris kötőmotívumot tartalmazó régiója között jön létre.

Fenti példák alapján láthatjuk, hogy fehérje kináz alapú komplexek összeállításában a kináz doméneken kialakult dedikált fehérje-fehérje kölcsönható felszínek fontos szerepet játszanak. Továbbá, léteznek természetes mechanizmusok a komplexek összeállításának gátlására vagy épp annak elősegítésére. Patológias esetekben az aktív jelátviteli komplexek összeállításának és szétkapcsolásának optimális egyensúlya felborul, s kívánatos lenne a megváltozott feltételek alatt egy új egyensúly visszaállítása. Meggyőződésem, hogy ez a fehérje-fehérje komplexek összeállítását a fókuszba állító stratégia jó alternatívája lehet a fehérje kinázok aktivitását direktben gátló farmakológiai megközelítéseknek (Bogoyevitch & Fairlie 2007). A konkrét megvalósításhoz ötleteket pedig a fehérje-peptid típusú MAPK dokkoló kölcsönhatások részletes tanulmányozása során levont törvényszerűségekből is meríthetünk.

6. Saját kutatási eredmények összefoglalása

Munkánkban bemutattuk, hogy

- a klasszikus vázfehérjének tekintett élesztő Ste5 fehérje „aktív” módon vesz részt a MAPK közvetített jelátvitelben.
- rövid, 10-15 aminosavas fehérje fragmentumok is képesek MAPK-okhoz specifikus módon kötődni.
- MAPK specificitást meglepő módon a konszenzus szekvenciák közbülső, a fehérjét gyakran közvetlenül nem érintő részei határozzák meg.
- MAPK-lineáris motívumok kölcsönhatásainak szerkezeti biokémiai feltárása után lehetséges kívánt specificitási profillal rendelkező szintetikus peptideket tervezni.
- MAPK kötő lineáris motívumok meglepően nagy számban azonosíthatóak sejten belüli fehérjék szerkezet nélküli régióiban.
- változatos genetikai mechanizmusok révén létrejövő rövid MAPK kötő fehérje szakaszok lehetővé teszik egy ősi jelátviteli enzim család tagjai számára fiziológiai folyamatok specifikus, evolúciós szempontból dinamikus szabályozását.
- magasabb rendű MAPK komplexek összeszerelődése lineáris motívumok révén „passzív” módon, míg rendszerszintű mechanizmusok (pl. nem-degradatív ubikvitináció vagy egy modulátor fehérje expressziója) révén „aktív” módon befolyásolható.
- a fehérje-peptid típusú dokkolás az élesztő Cbk1 (AGC) kináz alapú jelátviteli pályákban az enzim-szubsztrát kapcsolatok robusztusságát növeli, ami arra utal, hogy dokkoló kölcsönhatások az emlős AGC kinázoknál is elterjedtek lehetnek.

Összefoglalás

Az MTA doktori cím elnyerésére benyújtott értekezésemben vizsgáltam, hogy fehérje kináz alapú jelátviteli rendszerekben az egyes enzimek hogyan alakítanak ki specifikus fehérje-fehérje komplexeket, ezeknek milyen funkcionális jelentőségük van, s vajon ezek miképp változhattak az evolúció során. Mindehhez szükséges volt az atomi felbontású fehérje szerkezeti vizsgálatok, a sejtes szintű funkcionális és a rendszer biológiai szintű integráló megközelítések egységes keretbe foglalása. Kísérleteinket először ezért konkrétan az élesztő és humán mitogén-aktivált protein kinázokra (MAPK) épülő jelátviteli folyamatok mechaniztikájának a megértésére terveztük, amik aztán később kiegészültek más szerin/treonin kináz által szabályzott folyamatok vizsgálataival is. A fókuszban a kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatásainak tanulmányozása állt. Itt bemutattuk, hogy rövid (10-15 aminosavas) lineáris kötőmotívumok specifikus módon képesek MAPK-okat kötni és ezek nagy számban fordulnak elő a humán proteóm rendezetlen fehérjeszakaszaiban. Utóbbi miatt a konzervált struktúrájú MAPK-ok fehérje-fehérje kölcsönhatásai mechanisztikai értelemben könnyen, evolúciós értelemben pedig plasztikus módon változhatnak. Ez lehetővé teszi, hogy MAPK-ok a sejtes folyamatokat széles körben és specifikus módon szabályozzák foszforiláció révén. Munkánk rávilágít arra, hogy a MAPK-okon részletesen vizsgált fehérje-fehérje kölcsönhatási mechanizmusok elterjedtek lehetnek más fehérje kináz alapú jelátviteli rendszerekben is. Fehérje kinázok magasabb rendű komplexekbe való szerveződését feltáró eredményeink összességében megteremtették az elméleti keretét annak a munkának, mely során a jövőben új reagensek, hatóanyagok segítségével majd a fehérje kináz alapú jelátviteli hálózatok működésének specifikus módosítását tervezzük.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

- [1] **Reményi, A.**, Good, M.C., Bhattacharyya, R.P., Lim, W.A. (2005) The role of docking interactions in mediating signalling input, output, and discrimination in the yeast MAP kinase network. *MOLECULAR CELL* 20, 951-962 (IF 14.971)
- [2] Bhattacharyya, R.P.*, **Reményi, A.***, Good, M.C., Bashor, C, Falick, A, Lim, W.A. (2006) Ste5 allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *SCIENCE* 311, 822-826 (IF: 30.028)
- [3] Bhattacharyya, R.P., **Reményi, A.**, Yeh, B.J., Lim, W.A. (2006) Domains, Motifs, and Scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *ANNUAL REVIEW IN BIOCHEMISTRY* 75, 655-680 (IF: 36.456)
- [4] **Reményi, A.**, Good, M.C., Lim, W.A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY* 16, 676-685 (IF: 11.215)
- [5] Good, M.C., Tang, G., Singleton, J., **Reményi, A.**, Lim, W.A. (2009) The Ste5 scaffolds directs mating signalling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *CELL* 136, 1085-1097 (IF: 30.434)
- [6] Zeke, A., Lukács, M., Lim W.A., **Reményi, A.** (2009) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *TRENDS IN CELL BIOLOGY* 19, 364-374 (IF: 12.115)
- [7] Mok J, Kim PM, Lam HY, Piccirillo S, Zhou X, Jeschke GR, Sheridan DL, Parker SA, Desai V, Jwa M, Cameroni E, Niu H, Good M, **Reményi A**, Ma JL, Sheu YJ, Sassi HE, Sopko R, Chan CS, De Virgilio C, Hollingsworth NM, Lim WA, Stern DF, Stillman B, Andrews BJ, Gerstein MB, Snyder M, Turk BE. (2010) Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *SCIENCE SIGNALING* 3: ra12 (IF: 6.354)
- [8] Alexa A, Varga J, **Reményi A** (2010) Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *FEBS JOURNAL* 272, 4376-82 (IF: 3.009)
- [9] Garai Á, Zeke A, Gógl G, Tőro I, Fördös F, Blankenburg H, Bárkai T, Varga J, Alexa A, Emig D, Albrecht M, **Reményi A** (2012) Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *SCIENCE SIGNALING* 5: ra74 (IF: 7.648)
- [10] Gogl G, Toro I, **Reményi A** (2013) Protein-peptide complex crystallization: a case study on the ERK2 mitogen-activated protein kinase. *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION D-BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY* 69, 486-489 (IF: 7.232)
- [11] Glatz G, Gogl G, Alexa A, **Reményi A** (2013) Structural Mechanism for the Specific Assembly and Activation of the Extracellular Signal Regulated Kinase 5 (ERK5) Module. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 288, 8596-8609 (IF: 4.281)
- [12] Takeda AN, Oberoi-Khanuja TK, Glatz G, Schulenburg K, Scholz RP, Carpy A, Macek B, **Reményi A**, Rajalingam K (2014) Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *EMBO JOURNAL* 33, 1784-1801 (IF: 10.434)
- [13] Gógl G, Schneider KD, Yeh BJ, Alam N, Nguyen AN, Moses AM, Hetényi C, **Reményi A***, Weiss EL* (2015) The structure of an NDR/LATS kinase – mob complex reveals a novel kinase-coactivator system and substrate docking mechanism. *PLOS BIOLOGY* 13, e1002146 (IF 9.343)
- [14] Alexa A, Gogl G, Glatz G, Garai A, Zeke A, Varga J, Dudas E, Jeszenoi N, Bodor A, Hetenyi C, **Reményi A** (2015) Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 112, 2711-2716 (IF 9.964)

- [15] Zeke A, Bastys T, Alexa A, Garai A, Meszaros B, Kirsch K, Dosztanyi Z, Kalinina OV, **Reményi A** (2015) Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY* 11, 837 (IF: 10.872)
- [16] Gógl G, Alexa A, Kiss B, Katona G, Kovács M, Bodor A, **Reményi A***, Nyitray L* (2016). Structural basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) inhibition by S100B Protein: modulation of the Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) signaling cascade in a calcium-dependent way. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 291, 11-27 (IF: 4.573)

**Megosztott első vagy szenior/levező szerzőség*

Összesített tudományometriai adatok

Közlemények	IF
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesen	208,93
Az értekezéstől független közlemények összesen	79,67
Közlemények a PhD fokozat megszerzéséig	62,24
Összesített impakt faktor	350,84
Ebből első/utolsó szerzős közlemények	200,84
Idézettség (teljes/független)	1583/1430
Hirsch-index	17

Köszönetnyilvánítás

Az USA-ban remek diákokkal dolgozhattam együtt: Roby Bhattacharyya, Caleb Bashor, Mathew Good és Grace Tang. Hálás vagyok Wendell A. Lim-nek, akkori főnökömnek, hogy egy dinamikus fiatal csapatban, remek hangulatú laborban és szakmailag stimuláló környezetben kezdhettem meg a munkát a jelátviteli folyamatok törvényszerűségeinek feltárására. Legtöbbet tőle és az ő laborjában tanultam, bár sokszor erre már csak évekkel később jöttem rá. Hazatérésemben Gráf László segített és csoportom megalakulását az ELTE Biokémiai Tanszéken a Wellcome Trust-tól elnyert pályázat tette lehetővé. Jelenlegi munkánkat az MTA TTK Enzimológiai Intézetében az MTA Lendület Program támogatja. Az utóbbi években a legfontosabb együttműködő partnereim Eric Weiss (USA), Olga Kalinina (Németország), Krishna Rajalingam (Németország), Hetényi Csaba és Nyitray László (ELTE Biokémia Tanszék) voltak. Az utóbbi nyolc évben itthon legfontosabb munkatársam Alexa Anita volt, akivel a labort együtt építettük fel. A labor „normális” működtetése pedig már jó pár éve Rakács Marianna odaadó munkájának köszönhető. Patthy Andrásnak rengeteg kémiai szintetizált peptid előállítását köszönhetjük. A laborban az évek során, különböző projekteken számos diák fordult meg. A teljesség igénye nélkül ők a következők: Gógl Gergő, Garai Ágnes, Varga János, Zeke András, Glatz Gábor, Fördös Ferenc, Rádli Martina, Kirsch Klára, Sok Péter és Póti Ádám Levente. Kisebb vagy nagyobb mértékben ugyan, de összességében mindannyiuk munkája, hozzájárulása kellett ahhoz, hogy az értekezésemben leírt eredményeink megszülessenek, s hogy MTA doktori pályázatomat megírhattam.

Ábrajegyzék

1. <i>Ábra Sejtes jelátviteli folyamatok sémája</i>	7
2. <i>Ábra Különböző jelpálya architektúrák</i>	9
3. <i>Ábra Molekuláris kapcsolók</i>	10
4. <i>Ábra A humán kinóm és foszfatóm</i>	11
5. <i>Ábra MAPK jelátviteli modulok</i>	15
6. <i>Ábra MAPK-ok illetve MAP2K-ok rokonsági viszonyai</i>	17
7. <i>Ábra Fehérje kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatás mechanizmusai</i>	17
8. <i>Ábra Élesztő és humán vázfehérjék a MAPK jelátvitelben</i>	18
9. <i>ábra Sejten belüli regulációs hálózatok modularitása és evolúciós plaszticitása</i>	21
10. <i>Ábra Jelátviteli komplexek működését vizsgáló kísérletes megközelítéseink sémája</i>	24
11. <i>Ábra Foszforiláció alapú dot-blot módszer sémája a MAPK-D-motívumok kölcsönhatásának tesztelésére</i>	30
12. <i>Ábra MAPK kötő D-motívumok proteóm szintű keresésére alkalmazott módszer sémája</i>	32
13. <i>ábra Ste5 vázfehérje összetett szerepe Fus3 aktivitásának szabályozásában</i>	37
14. <i>ábra Dokkoló kölcsönhatások szelektivitása élesztő MAPK jelpályákban</i>	39
15. <i>ábra Fus3 MAPK dokkoló kölcsönhatásainak szerkezeti analízise</i>	40
16. <i>Ábra A dokkoló árok központi szerepe MAPK jelátviteli folyamatokban</i>	41
17. <i>Ábra MAPK kötő peptidok kötődési affinitása és specificitása</i>	43
18. <i>Ábra MAPK-dokkoló peptid szerkezetek (ERK2, p38α, JNK1)</i>	45
19. <i>Ábra MAPK specificitás szerkezeti okai</i>	47
20. <i>Ábra MAPK specificitás racionális tervezése</i>	49
21. <i>Ábra Különböző MAPK dokkoló peptid főlánc konformációs osztályok az ismert fehérje-peptid szerkezetek alapján</i>	52
22. <i>Ábra Foszforiláción alapuló dot-blot esszék eredményei (ERK2, p38α és JNK1)</i>	55
23. <i>Ábra PSSM-ek szekvencia logói</i>	57
24. <i>Ábra Az ERK2 és RSK1 kölcsönhatás karakterizálása</i>	60
25. <i>Ábra Az ERK2-RSK1 komplex kristályszerkezete</i>	61
26. <i>Ábra Az ERK2-RSK1 szerkezet MD analízise</i>	62

27. <i>Ábra</i>	A jelátviteli ERK2-RSK1c komplex összeállításának sémája	63
28. <i>Ábra</i>	A MEKK3-MKK5-ERK5 MAPK modul sémája	65
29. <i>Ábra</i>	Az MKK5-ERK5 kölcsönhatás karakterizálása	66
30. <i>Ábra</i>	Az ERK5-PB1-D komplex szerkezete	67
31. <i>Ábra</i>	MEKK3(PB1)-MKK5(PB1)-ERK5 komplex szerkezeti modellje	68
32. <i>Ábra</i>	MEKK3 ubikvitináció hatása az ERK5 és JNK MAPK modulra	69
33. <i>Ábra</i>	A Cbk1-Mob2 kináz-koaktivátor komplex kristályszerkezete	71
34. <i>Ábra</i>	A Cbk1 NDR/LATS és a Fus3 MAP kináz dokkoló árka	73
35. <i>Ábra</i>	A Ste5 jelátviteli vázfehérje mint koenzim	74
36. <i>Ábra</i>	A JIP1 nem egy „biokémiai” vázfehérje	75
37. <i>Ábra</i>	A JIP1 szerepe a jelátviteli cargo szállításában	76
38. <i>Ábra</i>	D-motívumok evolúciós analízise	78
39. <i>Ábra</i>	D-motívumok létrehozását biztosító genetikai mechanizmusok	79
40. <i>Ábra</i>	Dokkoló hasadékok és peptidek a CGMC kináz családban	80

Táblázatok

Táblázat 1.	Humán MAPK-ok	13
Táblázat 2.	MAPK homológok a legfontosabb modell organizmusokból	13
Táblázat 3.	A röntgendiffrakcióval meghatározott fehérje kristályszerkezetek listája	28

Függelék

F1 Táblázat.	A vizsgált fehérjék Uniprot azonosítóinak listája	99
F2 Táblázat.	MAPK kötő D-motívum konszenzus szekvenciák és a szerkezeti kompatibilitás analízis során használt PDB fájlok, modellek listája	100

Irodalomjegyzék

- Alexa, A. et al., 2015. Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), pp.2711–6.
- Alexa, A., Varga, J. & Reményi, A., 2010. Scaffolds are “active” regulators of signaling modules. *The FEBS journal*, 277(21), pp.4376–82.
- Avey, D. et al., 2015. Phosphoproteomic Analysis of KSHV-Infected Cells Reveals Roles of ORF45-Activated RSK during Lytic Replication. *PLoS pathogens*, 11(7), p.e1004993.
- Bardwell, A.J., Frankson, E. & Bardwell, L., 2009. Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *The Journal of biological chemistry*, 284(19), pp.13165–73.
- Bax, B. et al., 2001. The structure of phosphorylated GSK-3beta complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation. *Structure (London, England : 1993)*, 9(12), pp.1143–52.
- Bhattacharyya, R.P., Reményi, A., Yeh, B.J., et al., 2006. Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annual review of biochemistry*, 75, pp.655–80.
- Bhattacharyya, R.P., Reményi, A., Good, M.C., et al., 2006. The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), pp.822–6.
- Biondi, R.M. & Nebreda, A.R., 2003. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *The Biochemical journal*, 372(Pt 1), pp.1–13.
- Bode, A.M. & Dong, Z., 2007. The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis*, 46(8), pp.591–8.
- Bogoyevitch, M.A. & Fairlie, D.P., 2007. A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug discovery today*, 12(15-16), pp.622–33.
- Brace, J., Hsu, J. & Weiss, E.L., 2011. Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis. *Molecular and cellular biology*, 31(4), pp.721–35.
- Breitkreutz, A. & Tyers, M., 2002. MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends in cell biology*, 12(6), pp.254–7.
- Brent, R. & Ptashne, M., 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43(3 Pt 2), pp.729–36.
- Bresnick, A.R., Weber, D.J. & Zimmer, D.B., 2015. S100 proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(2), pp.96–109.

- Buschbeck, M. & Ullrich, A., 2005. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), pp.2659–67.
- Caffrey, D.R., O'Neill, L.A. & Shields, D.C., 1999. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *Journal of molecular evolution*, 49(5), pp.567–82.
- Canagarajah, B.J. et al., 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, 90(5), pp.859–869.
- Cargnello, M. & Roux, P.P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(1), pp.50–83.
- Chang, C.I. et al., 2002. Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Molecular cell*, 9(6), pp.1241–9.
- Chang, L. & Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), pp.37–40.
- Cheng, K.-Y. et al., 2006. The role of the phospho-CDK2/cyclin A recruitment site in substrate recognition. *The Journal of biological chemistry*, 281(32), pp.23167–79.
- Choi, K.Y. et al., 1994. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, 78(3), pp.499–512.
- Coulombe, P. & Meloche, S., 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), pp.1376–87.
- Coyle, S.M., Flores, J. & Lim, W.A., 2013. Exploitation of latent allostery enables the evolution of new modes of MAP kinase regulation. *Cell*, 154(4), pp.875–87.
- Dajas-Bailador, F., Jones, E. V & Whitmarsh, A.J., 2008. The JIP1 scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons. *Current biology : CB*, 18(3), pp.221–6.
- Davey, N.E., Cyert, M.S. & Moses, A.M., 2015. Short linear motifs - ex nihilo evolution of protein regulation. *Cell communication and signaling : CCS*, 13(1), p.43.
- Dosztányi, Z. et al., 2005. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *Journal of molecular biology*, 347(4), pp.827–39.
- Dosztányi, Z., Mészáros, B. & Simon, I., 2009. ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(20), pp.2745–2746.
- Endicott, J.A., Noble, M.E.M. & Johnson, L.N., 2012. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annual review of biochemistry*, 81, pp.587–613.
- Fu, M. & Holzbaur, E.L.F., 2013. JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by

- coordinating kinesin and dynein motors. *The Journal of cell biology*, 202(3), pp.495–508.
- Garai, A. et al., 2012. Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Science signaling*, 5(245), p.ra74.
- Glatz, G. et al., 2013. Structural Mechanism for the Specific Assembly and Activation of the Extracellular Signal Regulated Kinase 5 (ERK5) Module. *The Journal of biological chemistry*.
- Gógl, G. et al., 2016. Structural Basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) Inhibition by S100B Protein: MODULATION OF THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE (ERK) SIGNALING CASCADE IN A CALCIUM-DEPENDENT WAY. *The Journal of biological chemistry*, 291(1), pp.11–27.
- Gógl, G. et al., 2015. The Structure of an NDR/LATS Kinase-Mob Complex Reveals a Novel Kinase-Coactivator System and Substrate Docking Mechanism. *PLoS biology*, 13(5), p.e1002146.
- Gógl, G., Törő, I. & Reményi, A., 2013. Protein-peptide complex crystallization: a case study on the ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 69(Pt 3), pp.486–9.
- Good, M. et al., 2009. The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell*, 136(6), pp.1085–97.
- Good, M.C., Zalatan, J.G. & Lim, W.A., 2011. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6030), pp.680–6.
- Grewal, S., Molina, D.M. & Bardwell, L., 2006. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. *Cellular signalling*, 18(1), pp.123–34.
- Ter Haar, E. et al., 2007. Crystal structure of the p38 alpha-MAPKAP kinase 2 heterodimer. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), pp.9733–9.
- Han, J. et al., 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5173), pp.808–11.
- Hanks, S., 2003. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology*, 4(5), p.111.
- Hanks, S.K. & Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(8), pp.576–96.
- Hayashi, M. & Lee, J.-D., 2004. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 82(12), pp.800–8.
- Heizmann, C.W., Fritz, G. & Schäfer, B.W., 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d1356–68.
- Heo, Y.-S. et al., 2004. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding

- protein JIP1 and SP600125. *The EMBO journal*, 23(11), pp.2185–95.
- Horiuchi, D. et al., 2007. Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Current biology : CB*, 17(15), pp.1313–7.
- Kaneko, T. et al., 2010. Loops govern SH2 domain specificity by controlling access to binding pockets. *Science signaling*, 3(120), p.ra34.
- Kaneko, T., Sidhu, S.S. & Li, S.S.C., 2011. Evolving specificity from variability for protein interaction domains. *Trends in biochemical sciences*, 36(4), pp.183–90.
- Kato, Y. et al., 1998. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*, 395(6703), pp.713–6.
- Klein, A.M. & Cobb, M.H., 2014. ERK5 signaling gets XIAPed: a role for ubiquitin in the disassembly of a MAPK cascade. *The EMBO journal*, 33(16), pp.1735–6.
- Kuang, E. et al., 2008. Activation of p90 ribosomal S6 kinase by ORF45 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and its role in viral lytic replication. *Journal of virology*, 82(4), pp.1838–50.
- Kyriakis, J.M. et al., 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), pp.417–21.
- Lee, J.C. et al., 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508), pp.739–46.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S. & Ahn, N.G., 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research*, 74, pp.49–139.
- Lim, W.A. & Pawson, T., 2010. Phosphotyrosine Signaling: Evolving a New Cellular Communication System. *Cell*, 142(5), pp.661–667.
- London, N. et al., 2011. Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), pp.W249–53.
- Malleshaiah, M.K. et al., 2010. The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature*, 465(7294), pp.101–5.
- Manning, G. et al., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), pp.1912–34.
- Meng, Z., Moroishi, T. & Guan, K.-L., 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development*, 30(1), pp.1–17.
- Mészáros, B., Simon, I. & Dosztányi, Z., 2009. Prediction of protein binding regions in disordered proteins. *PLoS computational biology*, 5(5), p.e1000376.
- Mok, J. et al., 2010. Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Science signaling*, 3(109), p.ra12.
- Moses, A.M. & Landry, C.R., 2010. Moving from transcriptional to phospho-evolution: generalizing regulatory evolution? *Trends in genetics : TIG*, 26(11), pp.462–7.

- Nakamura, K. et al., 2006. PB1 domain-dependent signaling complex is required for extracellular signal-regulated kinase 5 activation. *Molecular and cellular biology*, 26(6), pp.2065–79.
- Nakamura, K. & Johnson, G.L., 2003. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry*, 278(39), pp.36989–92.
- Ngo, J.C.K. et al., 2008. A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1. *Molecular cell*, 29(5), pp.563–76.
- Nguyen Ba, A.N. et al., 2012. Proteome-wide discovery of evolutionary conserved sequences in disordered regions. *Science signaling*, 5(215), p.rs1.
- Ohno, S., 1993. Patterns in genome evolution. *Current opinion in genetics & development*, 3(6), pp.911–4.
- Ono, K. & Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cellular Signalling*, 12(1), pp.1–13.
- Pagès, G. et al., 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5443), pp.1374–7.
- Papin, J.A. et al., 2005. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2), pp.99–111.
- Pawson, T. & Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), pp.445–52.
- Pawson, T. & Scott, J.D., 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends in biochemical sciences*, 30(6), pp.286–90.
- Pearson, G. et al., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22(2), pp.153–83.
- Reményi, A. et al., 2003. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes & development*, 17(16), pp.2048–59.
- Reményi, A. et al., 2001. Differential dimer activities of the transcription factor Oct-1 by DNA-induced interface swapping. *Molecular cell*, 8(3), pp.569–80.
- Reményi, A. et al., 2005. The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Molecular cell*, 20(6), pp.951–62.
- Reményi, A., Good, M.C. & Lim, W.A., 2006. Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Current opinion in structural biology*, 16(6), pp.676–85.
- Reményi, A., Schöler, H.R. & Wilmanns, M., 2004. Combinatorial control of gene expression. *Nature structural & molecular biology*, 11(9), pp.812–5.
- Roberts, O.L. et al., 2010. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular

- morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *Journal of cell science*, 123(Pt 18), pp.3189–200.
- Sánchez, I.E. et al., 2008. Genome-wide prediction of SH2 domain targets using structural information and the FoldX algorithm. *PLoS computational biology*, 4(4), p.e1000052.
- Schaeffer, H.J. & Weber, M.J., 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*, 19(4), pp.2435–44.
- Sharrocks, A.D., Yang, S.H. & Galanis, A., 2000. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends in biochemical sciences*, 25(9), pp.448–53.
- Soundararajan, M. et al., 2013. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure*, 21(6), pp.986–996.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, pp.183–215.
- Takeda, A.-N. et al., 2014. Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *The EMBO journal*.
- Tanoue, T. et al., 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*, 2(2), pp.110–6.
- Tomilin, A. et al., 2000. Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*, 103(6), pp.853–64.
- Tompa, P. et al., 2014. A million peptide motifs for the molecular biologist. *Molecular cell*, 55(2), pp.161–9.
- Tonikian, R. et al., 2008. A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biology*, 6(9), p.e239.
- Tyson, J.J., Chen, K.C. & Novak, B., 2003. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current opinion in cell biology*, 15(2), pp.221–31.
- Ubersax, J.A. & Ferrell, J.E., 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), pp.530–41.
- Wang, X., Destrumont, A. & Tournier, C., 2007. Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), pp.1349–57.
- Whisenant, T.C. et al., 2010. Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS computational biology*, 6(8).
- Whitmarsh, A.J. et al., 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), pp.1671–4.
- Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J., 1998. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in biochemical sciences*, 23(12), pp.481–5.

- Yang, J. et al., 2002. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature structural biology*, 9(12), pp.940–4.
- Zeke, A. et al., 2009. Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends in cell biology*, 19(8), pp.364–74.
- Zeke, A. et al., 2015. Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *Molecular systems biology*, 11(11), p.837.
- Zhou, T. et al., 2006. Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure (London, England : 1993)*, 14(6), pp.1011–9.

Függelék

F1 Táblázat. A vizsgált fehérjék Uniprot azonosítóinak listája

Fehérje	Uniprot név	Megjegyzés
Fus3	P16892	MAPK (<i>S. cerevisiae</i>)
Kss1	P14681	MAPK (<i>S. cerevisiae</i>)
Hog1	P32485	MAPK (<i>S. cerevisiae</i>)
Ste5	P32917	Vázfehérje (<i>S. cerevisiae</i>)
Msg5	P38590	Foszfatáz (<i>S. cerevisiae</i>)
Ste7	P07784	MAP2K (<i>S. cerevisiae</i>)
Cbk1	P53894	NDR/LATS kinase (<i>S. cerevisiae</i>)
Mob2	P43563	Kinase coactivator (<i>S. cerevisiae</i>)
MKK1	Q02750	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MKK2	P36507	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MKK4	P45985	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MKK5	Q13163	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MKK6	P52564	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MKK7	Q14733	MAP2K (<i>H. sapiens</i>)
MEF2A	Q02078	Transzkripció faktor (<i>H. sapiens</i>)
NFAT4	Q12968	Transzkripció faktor (<i>H. sapiens</i>)
JIP1	Q9UQF2	Vázfehérje (<i>H. sapiens</i>)
ERK2	P28482	MAPK (<i>H. sapiens</i>)
ERK5	Q13164	MAPK (<i>H. sapiens</i>)
p38 α	Q16539	MAPK (<i>H. sapiens</i>)
JNK1	P45983	MAPK (<i>H. sapiens</i>)
MNK1	Q9BUB5	MAPKAPK (<i>H. sapiens</i>)
RSK1	Q15418	MAPKAPK (<i>H. sapiens</i>)
RSK2	P51812	MAPKAPK (<i>H. sapiens</i>)
MK2	P49137	MAPKAPK (<i>H. sapiens</i>)
MLK3	Q16584	MAP3K (<i>H. sapiens</i>)
MEKK3	Q99759	MAP3K (<i>H. sapiens</i>)
XIAP	P98170	E3 ubikvitin ligáz (<i>H. sapiens</i>)
S100B	P04271	Ca-kötő fehérje (<i>H. sapiens</i>)
ORF45	Q77UV9	Humán herpes vírus (HHV8) korai ORF

F2 Táblázat. MAPK kötő D-motívum konszenzus szekvenciák és a szerkezeti kompatibilitás analízis során használt PDB fájlok, modellek listája

Motívum osztály vagy típus neve		Konszenzus szekvencia*	Megjegyzés #	Szerkezeti templát PDB kódja
JIP1		$\theta\text{-}\varphi_L\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}\varphi_A\text{-}X_3\text{-}\varphi_B$	$\varphi_L = P$ $\varphi_A = L^{\S}$ $X_1, X_2 = [^{\wedge}P]$	1UKH (JNK1)
NFAT4		$\theta\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}\varphi_L\text{-}X_3\text{-}\varphi_A\text{-}X_4\text{-}\varphi_B$	$\varphi_L = [LIM]^{\S}$ $\varphi_A = L^{\S}$ $X_1, X_2 = [^{\wedge}P]$	2XS0 (JNK1)
Tágabb MEF2A	MEF2A típus	$\theta\text{-}\theta\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}\varphi_L\text{-}X_3\text{-}\varphi_A\text{-}X_4\text{-}\varphi_B$	-	1LEW (p38 α)
	MKK6 típus	$\theta\text{-}X_1\text{-}\theta\text{-}X\{3\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_5\text{-}\varphi_A\text{-}X_6\text{-}\varphi_B$	-	2Y8O (p38 α)
	más típus	$\theta\{1-2\}\text{-}X\{2-4\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_5\text{-}\varphi_A\text{-}X_6\text{-}\varphi_B$	-	N/A
Tágabb DCC	DCC típus	$\theta\{1-2\}\text{-}X\{2-4\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_5\text{-}X_6\text{-}\varphi_A\text{-}X_7\text{-}\varphi_B$	$\varphi_L = [PLIV]$ $X_5 = P^{\S}$	3O71 (ERK2)
	Far1 típus	$\theta\{1-2\}\text{-}X\{2-4\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_5\text{-}X_6\text{-}\varphi_A\text{-}X_7\text{-}\varphi_B$	$\varphi_L = [PLIV]$ $X_6 = P^{\S}$	3O71 (ERK2)
Tágabb HePTP	Ste7 típus	$\varphi_U\text{-}X_1\text{-}\theta\text{-}\theta\text{-}X\{4\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_6\text{-}\varphi_A\text{-}X_7\text{-}\varphi_B$	$X_1 = [^{\wedge}P]$	2B9I (FUS3)
	HePTP típus	$\varphi_U\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}\theta\text{-}\theta\text{-}X_3\text{-}X\{4\}\text{-}\varphi_L\text{-}X_8\text{-}\varphi_A\text{-}X_9\text{-}\varphi_B$	$X_1, X_2 = [^{\wedge}P]$ $X_3 = G^{\S}$	2GPH (ERK2)

* θ : [RK], φ_U : [LIV], φ_L : [LIVMP], φ_A : [LIV], φ_B : [LIVMF]; x bármely aminosav lehet, kivéve a "Megjegyzések" oszlopban szereplőket. # Az x-ek számozása balról jobbra történt. \wedge bármilyen aminosav kivéve prolin [\wedge P]. \S Néhány pozícióban előforduló aminosavak lehetőségeit szerkezeti információk alapján tovább korlátoztuk. & A szerkezeti modell konkrét MAPK-a zárójelbe téve.