

# Paralóg jelátviteli útvonalak finom szabályozásának szerkezeti alapú vizsgálata

Tézisfüzet

**Glatz Gábor**

*okleveles biológus*

***ELTE Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program***

*Iskolavezető: Dr. Erdei Anna*

*Programvezető: Dr. Nyitray László*

*Témavezető: Dr. Reményi Attila*



2015.

## Bevezetés

Az élőrendszerek állandó kapcsolatban vannak környezetükkel és a külvilágból érkező ingerekre sejtek a jelátviteli apparátusuk révén válaszolnak. Ennek a komplex rendszernek a feladata, hogy az ingert felfogja, a sejten belül átalakítsa, s végül biztosítsa a megfelelő válasz kiváltását (pl. sejtosztódás vagy differenciáció).

A sejten belül az egyik leginkább használt jelátviteli kémiai mechanizmus a foszforiláció, amely során a célmolekulára egy vagy több foszfát-csoport kerül és ennek függvényében változik biológiai szerepe, aktivitása. A foszforilációért felelős kinázok sokfélék, bár evolúciós rokonságban állnak. Azonos családba tartozó fehérje kinázok nagyon hasonló szerkezetet mutatnak, mégis sokszor eltérő funkcióval bírnak. A „hasonló szerkezet – különböző funkció” megértéséhez, a mechanizmusok feltárására a Mitogén Aktivált Protein Kinázok (MAPK), illetve az őket szabályzó egyéb fehérje kinázok, jó példát nyújtanak. A MAPK jelpályák három szintű modulból épülnek fel, ahol foszforilációs jel a legfelső szintről a legalsóig terjed. Az egyes szinteken található enzimek aktiválódása a feljebb található kináz általi foszforiláció következtében történik.

Doktori munkám során két klasszikus MAPK útvonallal: az ERK2 és ERK5 jelpályában működő fehérje kinázokkal foglalkoztam. Az ERK2 útvonal az irodalomból jól ismert, széles körűen kutatott téma, ezzel szemben az ERK5 jelpálya elemeiről (pl.: az ERK5 és az őt aktiváló MKK5 kölcsönhatásról) sokkal kevesebbet tudunk. Az ERK2 jelpálya sok szövetben előfordul, főképp sejtosztódási folyamatokat szabályoz, illetve elemei jól ismert célpontjai a tumorterápiában érintett farmakológiai kutatásoknak. Az ERK5 útvonal ezzel szemben főképp az érfalban és neurális szövetben fejeződik ki, és általában a sejt differenciációban és túlélésben játszik fontos szerepet.

A hasonló szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező fehérjék esetén sok esetben szembesülünk azzal a farmakológiai problémával, hogy az egyes enzimekre tervezett gátlószerek nem elég specifikusak, és ezért más fehérjék aktivitását befolyásolva mellékhatások alakulhatnak ki. A kinázokhoz kötődő gyógyszer-molekulák általában a kináz ATP-kötő zsebébe illeszkednek be. A MAPK hálózatokra jellemzőek az ún. dokkoló interakciók, amelyek a legalsó szinten található kinázok, illetve azok szubsztrátjai vagy a felsőbb szinten található aktivátor kinázok között jön létre. Szerkezeti alapja, hogy a MAPK kináz doménjének aktív helyétől nézve az átellenes oldalon található dokkoló árokba a partner molekula rendezetlen régiójában található dokkoló motívum (D-motívum) kötődik. Ezek a dokkoló interakciók fontos szerepet vállalnak az egyes jelpályák megfelelő működésében. Ennek következtében a különböző MAPK-ok dokkoló árának különbözőségei megfelelő szerkezeti alapot nyújtanak specifikusabb gátlószerek kifejlesztéséhez.

A változatos funkciók mögött rejlő szerkezeti különbségek feltérképezésén túl egy másik

fontos kérdés azoknak a mechanizmusoknak a megismerése is, melyek révén közös felső aktivátorokat használó jelpályák eltérő fiziológiás válaszok létrehozására képesek. Ennek a szabályozásnak egy érdekes példája lehet, hogy a közös aktivátor olyan poszt-transzlációs módosításon esik át, amelyik az egyik útvonalat érinti, azonban a másikat nem befolyásolja. Doktori dolgozatomban egy ubiquitin-függő szabályozási mechanizmus *in vitro* tanulmányozása is bemutatásra kerül, ahol az ERK5 és egy másik MAPK útvonal, a JNK jelpálya, között figyelhető meg egy magasabb szintű szabályozás.

## Célkitűzések

Doktori munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy közeli rokon, hasonló szerkezetű fehérjék miképp képesek specifikusan működtetni eltérő funkciójú jelpályákat (ERK2 és ERK5 jelpálya)? Milyen szerkezeti tulajdonságuk felelős azért, hogy a jel tovább terjedése nem keveredik össze a két út között?

Valamint munkám során azt is vizsgáltam, hogy miképp képes szabályozódni a jelterjedés iránya, ahol két különböző (fiziológias válaszáért felelős) jelpálya azonos felső aktivátoron osztozik. A c-jun N-terminal kináz (JNK) és ERK5 MAPK útvonalaknak ugyanis közös felső szintű aktivátorai a MAP kináz kináz kinázok egy csoportja, a MEKK2/3 enzimek.

## Eredmények

- 1) Feltérképeztem az MKK5-ERK5 kölcsönhatást különböző hosszúságú MKK5 konstrukciók segítségével, és azonosítottam azokat a szerkezeti elemeket, melyek hozzájárulnak az MKK5-ERK5 kölcsönhatáshoz.
- 2) Meghatároztam az MKK5 szerkezeti egységek (PB1 domén, dokkoló motívum és kináz domén) és ERK5 közötti kölcsönhatási affinitásokat.
- 3) Feltártam az MKK5 PB1 doménjét és dokkoló motívumát tartalmazó ún. PB1-D konstrukció ERK5-tel való kristályszerkezetét, s ezzel az MKK5-ERK5 bináris kölcsönhatásnak a szerkezeti alapját.
- 4) Feltártam az ERK2 és ERK5 különböző kötődési profilját ismert aktivátorokból és szubsztrátokból származó dokkoló motívumokat tartalmazó peptidekkel és fehérje konstrukciókkal.
- 5) Felállítottam egy modellt ami megmagyarázza az ERK2 és ERK5 hasonló szerkezetű MAPK-ok kötődési specificitását szerkezeti alapon.
- 6) Bemutattam, hogy az MKK5 PB1 domén adapterként szolgálhat egy harmadlagos MEKK3/MKK5/ERK5 komplexben, mert rendelkezik egymással nem átfedő felszínekkkel, amik révén egyszerre kötheti az felső szintű aktivátor és az alsó szintű szubsztrát kinázt.
- 7) Felállítottam egy sejtes és in vitro kísérleti eredményekkel koherens modellt az MEKK2/3 felső szintű kinázok ubikvitinációjának a mechanisztikai jelentőségére.
- 8) In vitro kísérletekkel bemutattam, hogy a XIAP E3 ubikvitin ligáz közvetített ubikvitináció a MEKK2/3 felső szintű MAPK modul komponensét úgy módosítja, hogy az csak az ERK5 jelátviteli modulra van hatással, de a JNK modulra nem.

## Következtetések

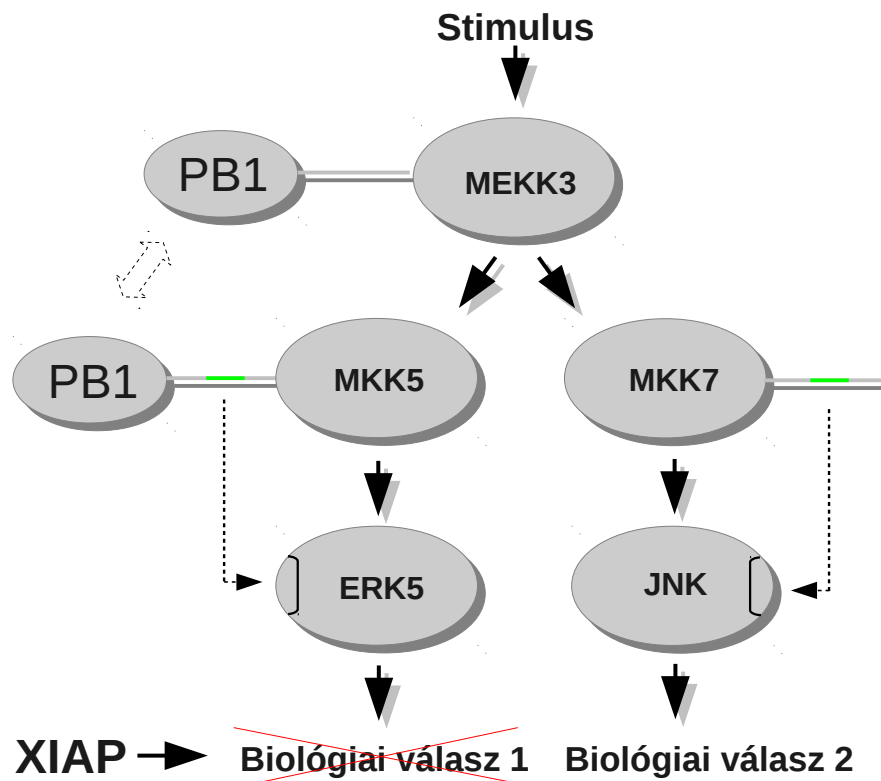
Az MKK5-ERK5 kölcsönhatás során mindhárom MKK5 szerkezeti egység részt vesz az ERK5 kináz doménjének kötésében, és ennek során a két kináz között egy nagy affinitású interakció alakul ki ( $K_d \sim 65 \text{ nM}$ ).

Az MKK5-ERK5 komplex szerkezet alapján elmondható, hogy a kináz domént nem tartalmazó MKK5 konstrukció (PB1-D) két független felszínen keresztül alakít ki kötődést ( $K_d \sim 0,5 \mu\text{M}$ ). A két felszín közül az első a klasszikus dokkoló interakció kémiai jellegzetességét mutatja, míg a második felszín az ERK5 kináz doménjének C-terminális szakasza és az MKK5 PB1-doménje között kialakuló  $\beta$ -lemez biztosítja.

A mérések során tapasztalt ERK2 és ERK5 közötti szubsztrát-specifitást jól magyarázza a két kináz doménjének dokkoló áránál látható felszíni különbségek. Az ERK5 kináz doménjének dokkoló árka kb.  $3 \text{ \AA}$ -gel keskenyebb, így jóval szelektívebb az ERK2 árkához képest. Továbbá az ERK5 kináz domén C-terminálisán található, PB1 domén kötéséért felelős szakasz is fontos szerepet játszik az eltérő fehérje-fehérje kötődési profilok és így az eltérő jelátviteli funkciók kialakításában.

A kapott MKK5-ERK5 komplex és egy az irodalomból ismert MEKK3 PB1 domén és MKK5 PB1 domén komplex egymásra vetítése, különböző interakciós esszékkel kiegészítve, jól mutatja, hogy az MKK5 PB1 domén egyfajta állványozó szereppel bír és képes a három ERK5 modul elemet (MEKK3-MKK5-ERK5) egy funkcionális komplexbe szervezni.

A különböző ubikvitinációs és foszforilációs esszék jól mutatják, hogy a MEKK3 nem-proteolitikus poliubikvitinációja a XIAP nevű E3 ubikvitin ligáz által negatívan hat az ERK5 aktivációra, ellenben a JNK útvonalat ez a szabályozás nem érinti, így biztosítva a két jelpálya között egyfajta váltó mechanizmust (**1. ábra**).



**1. Ábra)** Az ERK5 és JNK útvonal közötti átkapcsolást a XIAP E3 ligáz általi ubikvitináció-függő mechanizmus biztosítja. A közös legfelső aktivátorral rendelkező jelpálya közül az ERK5 aktiváció sérül, ha a MEKK3 kinázon kialakulnak nem-degradatív típusú poliubikvitinláncok. Ez azonban nem érinti a JNK által indukált biológiai válaszokat. Az ERK5 jelpálya működéséhez elengedhetetlen a MEKK3 és MKK5 PB1 domének heterodimerizációja, de mindkét útvonal esetén a MAP Kinázok dokkoló árkába kötődő MAP2K fehérjék (MKK5 és MKK7) dokkoló motívumai (zöld szakasz) is elengedhetetlenek. (Szaggatott vonallal jelölt nyilak specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokat jelölnek, míg egyéb nyilak a foszforiláción keresztüli jelterjedést irányítják.)

#### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

**Glatz G**, Gogl G, Alexa A, Remenyi A (2013) Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. *J Biol Chem* 288: 8596 – 8609

Takeda AN, Oberoi-Khanuja TK, **Glatz G**, Schulenburg K, Scholz RP, Carpy A, Macek B, Remenyi A, Rajalingam K. (2014) ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *EMBO J.* 33(16):1784-801.

Schulenburg K, **Glatz G**, Remenyi A, Rajalingam K (2014). Divide and rule: The role of ubiquitination in inactivation of the ERK5-MAPK cascade. *Molecular & Cellular Oncology*, 1(4), e969170.

**Konferencia részvételek:**

EMBO Meeting, Bécs, 2011. szeptember 10-13., Poszter: Cooperation between the PB1 domain and an adjacent MAP kinase binding linear motif in MKK5 enables its specific interaction to its cognate ERK5 substrate.

Signaling Workshop, Visegrád, 2014. július 21-25., Poszter: Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module.

## Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are well-conserved elements of human signal transduction. They play critical roles in many biological processes, e.g. proliferation, differentiation, stress-induced signaling and apoptosis. MAPKs are activated through phosphorylation by MAPK kinases (MKKs). MKK5 is a specific activator of ERK5, which fulfills non-redundant physiological roles compared to its ERK1/2 paralogs. MKK1/2-ERK1/2 and MKK5-ERK5 pathways are clearly evolutionarily related, and they serve as a paradigm on how functionally distinct pathways can be built using paralogous signaling enzymes.

Pull-down and fluorescence polarization (FP) based assays showed that minimally two MKK5 interacting regions are required to bind ERK5. A Phox and Bem1 (PB1) domain and a linear motif (D-motif) from MKK5 cooperate to mediate high affinity binding to ERK5. MAPK activation depends on a linear binding motif found in all MAPK kinases (MKK). I present the crystal structure of ERK5 in complex with an MKK5 construct comprised of the PB1 domain and the linear binding motif. The structure reveals that ERK5 has distinct protein-protein interaction surfaces compared to ERK2, which is the closest ERK5 paralog. The two MAPKs have characteristically different physiological functions and their distinct protein-protein interaction surface topography enables them to bind different sets of activators and substrates. Structural and biochemical characterization revealed that the MKK5 PB1 domain cooperates with the MAPK binding linear motif to achieve substrate specific binding. In addition, this domain also enables co-recruitment of the upstream activating enzyme and the down-stream substrate into one signaling competent complex. The upstream activator kinase for MKK5 is MEKK2/3, which also activates MKK7 that in turn activates c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling. ERK5 and JNK signaling is functionally distinct and I demonstrate that ERK5 pathway activity is diminished upon MEKK2/3 ubiquitination by XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein). Interestingly, JNK activation is not inhibited by ubiquitination of this shared upstream activator kinase.

Overall, my results give mechanistic insight into how signaling cascades built from similar paralogous enzymes or using common components can achieve functionally distinct, specific outcomes.