

**MAP KINÁZOK DOKKOLÓ INTERAKCIÓI:
az eukarióta jelátvitelt meghatározó lineáris motívumok
kölsönhatásának és szerkezeti specifitásának feltárása**

című doktori (PhD) értekezés tézisei

Garai Ágnes Szonja

Témavezető: Dr. Reményi Attila

tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,

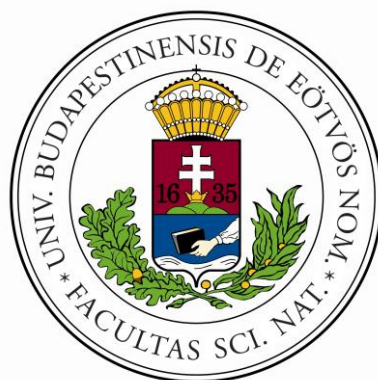
Biokémiai Tanszék

Biológia Doktori Iskola

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Iskolavezető: Prof. Dr. Erdei Anna

az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár



Programvezető: Prof. Dr. Nyitray László

az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2015

BEVEZETÉS

A sejteknek folyamatosan reagálniuk kell az őket körülvevő környezet jeleire, melyet a sejten belül létrejövő jelátvitel (szignál transzdukció) mechanizmusa tesz lehetővé.

A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) olyan Ser/Thr kinázok, melyek a sejten kívüli térből érkező ingerekre különböző receptorokon keresztül aktiválódnak. Az emlősökben tizennégy MAPK-t karakterizáltak (az *S. cerevisiae*-ban ötöt), melyeket hét csoportra lehet osztani. A konvencionális MAPK-ok csoportjába tartozik az ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kináz 1/2*), a JNK1/2/3 (c-jun N-terminális Kináz), a p38 izoformák (α , β , γ , δ) és az ERK5. Ezeknek a fehérjéknek a kináz doménjén található aktivációs hurok tartalmaz egy Thr-X-Tyr motívumot, amely a felsőbb aktivátor MAPK kinázok (MAPKK) általi foszforilációt teszi lehetővé. A legjobban tanulmányozott csoport az emlős MAPK-ok körében az ERK1/2, a p38 és a JNK családok. A konvencionális MAPK-okat egy specifikus modulokba szerveződött, foszforilációs kaszkád szabályozza, ahol a MAP2 kináz (Ser-/Thr- és Tyr kettős specificitású kináz) egy MAPK-t, míg a MAP3 kináz egy MAP2K-t foszforilál a Ser/Thr oldalláncaikon keresztül. A MAP kinázok prolin vezérelt kinázok, mivel csak úgy képesek Ser/Thr oldallánccokat foszforilálni, ha azokat közvetlenül egy prolin aminosav követi.

A MAPK-ok által vezérelt sejtes funkciók számos szubsztrát foszforilációján keresztül valósulnak meg. Ezek közé tartoznak a MAPKAPK (MAPK aktivált protein kináz) család tagjai (RSK-k, MSK-k, MNK-k, MAPKAPK-k), különböző transzkripciós faktorok (pl. MEF2A, NAFT4), állványfehérjék (pl. KSR2) vagy foszfatázok (pl. HePTP).

Az MAPK-ok szerkezete a egy főként β -redőkből felépülő, kisebb N-terminális és egy leginkább α -helikális struktúrájú, nagyobb C-terminális lebenyből áll. A két domén között helyezkedik el az ATP, illetve egy vagy két Mg^{2+} iont megkötni képes katalitikus régió. Minden MAPK C-terminális lebenyén található egy 20-35 aminosav hosszúságú, flexibilis szakasz, ez a kináz aktivációs hurok. Itt található a Thr-X-Tyr (TXY) motívum.

A MAPK szignalizációs pályákban a magas szintű szubsztrát specificitást a dokkoló interakciók teszik lehetővé. Ez a típusú kölcsönhatás a MAPK partnerekből származó, néhány aminosavból álló, lineáris szekvencia motívumok és a kináz komplementer árka között jönnek létre. A MAPK-ok esetében a legjobban karakterizált lineáris motívum a az ún. dokkoló peptid, egy 10-15 aminosav hosszúságú fehérje szakasz, melyet az aktív hellyel szemközti

oldalán elhelyezkedő MAPK dokkoló árok ismer fel. Ezek a motívumok egy vagy több, N-terminálisan elhelyezkedő bázikus oldalláncból (R/K_(1,2)), egy linker régióból (X₍₁₋₆₎) és néhány C-terminális, konzervált, hidrofób aminosavból (ΦXΦ) állnak. A kináz dokkoló árka a peptidekkel komplementer savas (CD-domén) és hidrofób karakterű régióból áll. Dokkoló peptidek szubsztrátokon felül aktivátor kinázokon (MAP2K), foszfatázokon, *downstream* kinázokon (MAPKAPK) és egyéb szabályozó molekulákon, például állványfehérjéken is előfordulhatnak. A D-motívumot elsőként az élesztő MAP2K Ste7, MAPK Kss1 és Fus3 útvonalban fedezték fel, mely analóg az emlősök p38, JNK és ERK hálózat dokkoló kölcsönhatásaival.

Átfogó és összehasonlító tanulmányok hiányában, a MAPK-ok dokkoló specificitásának szerkezeti alapkövei még mindig feltáratlanok. Munkánk során szeretnénk volna feltérképezni, hogy a dokkoló motívumok pontosan milyen mértékben járulnak hozzá a MAP kinázok fiziológias szempontból már karakterizált kapcsolatainak kialakításához. Valamint egy olyan koherens MAPK – D-motívum specificitás szerkezeti modellt mutatunk be, amely leírja a dokkoló peptidek specifikus vagy promiszkuus tulajdonságait, és a már korábban felfedezett peptidek specificitását.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkámban a MAPK-ok és kölcsönható partnereikben található lineáris kötőmotívumok közötti kapcsolatok specificitásának feltérképezését tűztem ki célul.

Az irodalomból ismeretes volt számos olyan fehérje, melyekkel a MAPK-ok dokkoló kölcsönhatásokat alakítanak ki. Azonban nem készült még eddig olyan átfogó tanulmány, mely kvantitatívan térképezné fel az egyes peptidek kötődési affinitását, és a specificitás szerkezeti hátterét feltárná. Ezért célul tűztem ki, hogy a három fő MAPK (ERK2, p38α, JNK1) és egy sor dokkoló peptid kölcsönhatását megvizsgálom. Legfőbb kérdéseim az alábbiak voltak:

- A kiválasztott peptidek hogyan csoportosíthatók MAPK kötő képességeik szerint?
- Szerkezetileg milyen eltérések fedezhetők fel a MAPK-ok dokkoló árkában?
- MAPK és dokkoló peptid komplexek szerkezete adhat-e magyarázatot az egyes peptidek szelektív és specifikus kötési tulajdonságaira?

Fenti kérdések megválaszolására az alábbiakat terveztem:

- Az irodalomból kiválasztott 15 darab MAPK kötő dokkoló motívum affinitásának kvantitatív meghatározása fluoreszcencia polarizációs mérésekkel, majd néhány transzkripciós faktor riporter alkalmazásával a biokémiai specificitás meghatározása.
- Különböző specificitás profilú peptid-MAPK komplexek kristályszerkezetének meghatározása, és az egyedi jellegzetességek megismerése mind a peptid konformáció, mind a dokkoló árok topográfia szemszögéből.
- Annak érdekében, hogy a szerkezetek alapján felállított hipotéziseinket finomhangoljuk, a peptidekbe, illetve kinázokba pontmutációkat építettünk be.
- A peptidekkel végzett kísérletek megerősítése teljes hosszúságú fehérjékkel végzett mérésekkel.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- A fehérjék előállításához alapul szolgáló DNS konstrukciókat cDNS-ből állítottuk elő általános biokémiai módszerek segítségével, melyek pontos bázissorrendjét szekvenálással ellenőriztünk.
- A rekombináns fehérjéket *E.coli* heterológ expressziós rendszerben hoztuk létre, majd a kinyert fehérjéket affinitás (Ni, GST, MBP) és ioncsere (Resource Q és S) kromatográfiával tisztítottuk meg.
- Az *in vitro* kölcsönhatás vizsgálatok során alkalmazott módszerek:
 - *Pull-down* kísérletek: GST-fúziós csali fehérjéket GST-gyantához immobilizáltuk, majd a préda fehérjével történő inkubálást követően, SDS-PAGE-en ellenőriztük az interakció létrejöttét. A HEK293T sejt lizátummal végzett méréseket Western-blot technikával detektáltuk.
 - Fluoreszcencia Polarizáció (FP): a szintetikus peptidek és a MAPK-ok kölcsönhatásainak kvantitatív meghatározására szolgált. A mérés során tetrametilrodamin- (TAMRA) és karboxifluorescein- (CF) jelölt peptideket alkalmaztunk fluoreszcens riporterként. A 384-lyukú plate-re osztott reakcióelegyeket Synergy H4 (*BioTek Instruments*) berendezéssel mértük meg fluoreszcencia lemezolvasó beállítással (FC jelölés: excitációs/emissziós hullámhossz: 515/535 nm; TAMRA jelölés: 550/590 nm).
 - Radioaktív kináz esszé: A különböző aktivátor kinázokkal – konstitutívan aktív MAP2K és foszforilált MAPK-ok – végzett kísérletek során ^{32}P - γ ATP segítségével vizsgáltuk a különböző szubsztrátok foszforiláltsági fokát. Az SDS-PAGE-re felvitt,

- majd a gélkazetta fotoérzékeny filmjét Typhoon Trio + szkennelbe (*Amersham Biosciences*) olvastuk le, a kapott képeket pedig ImageQuant program segítségével értékeltük ki.
- Felszíni plazmon rezonancia (SPR): A méréseket Biacore 3000-es műszeren végeztük CM5-ös szenzorchipen a Debreceni Egyetemen. A chip felszíne immobilizált anti-GST-t tartalmazott, ehhez kötöttük a GST-fúziós csali fehérjét. A préda fehérjét növekvő koncentrációban injektáltuk a rendszerbe, és a Response Unit változást detektáltuk. Az adatokat a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével elemeztük.
 - *Western-blot*: MAPK-ok foszforiláltsági állapotának, illetve HEK293T sejtizátumból készített *pull-down* esetében az SDS-PAGE futtatását követően alkalmaztuk. Anti-foszfo MAPK, anti-GST (*Cell Signaling*) és anti-FLAG (*Sigma*) elsődleges, valamint anti-nyúl másodlagos ellenanyagokkal (*Cell Signaling*) végeztük el a reakciókat. Az előhívás ECL oldattal (*GE Healthcare, ECL Plus*) történt. Typhoon Trio + scanner (*Amersham Biosciences*) segítségével, fluoreszcencia alapján (excitációs/emissziós hullámhossz: 480/530nm) detektáltuk a jeleket.
- *In vivo* kölcsönhatás vizsgálatok során alkalmazott módszerek:
- Bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció (BiFC): A YFP (sárga fluoreszcens protein) két fragmensét pcDNA3.1 vektorba építettük, és a vizsgálni kívánt fehérjék DNS-ét fúziósan építettük mellé, majd HEK293T sejtekben koexpresszáztattuk a fehérjét. A mérést Synergy H4 (*BioTek Instruments*) berendezéssel végeztük a fluoreszcencia lemezolvasó beállítással (excitációs/emissziós hullámhossz: 515/535 nm). A sejtek megfigyelése konfokális lézerpásztázó mikroszkóp (Olympus IX81; Olympus FluoView 500 lézerpásztázó rendszer) segítségével történt (excitációs/emissziós hullámhossz: 514/535-560 nm).
- Kristályosítás: A kristályosítások során ioncserélt, His6-cimkementes (TEV-hasított), defoszforilált MAPK-okat használtunk 10-15 mg/ml közötti koncentrációban. A kristályokat függőcsepp-módszerrel növesztettük. Az öt szerkezet megtalálható a PDB adatbázisban: JNK1-pepNFAT4 (PDB: 2XRW); p38 α -pepMKK6 (PDB: 2Y8O); ERK2-pepMNK1 (PDB: 2Y9Q), ERK2-pepRSK1 (PDB: 3TEI), ERK2-pepSzent_revD (PDB: 4FMQ).

EREDMÉNYEK – TÉZISEK

- Elsőként FP mérésekkel meghatároztuk 11 klasszikus, szintetikusán előállított D-peptid kötődési állandóját a három MAPK-zal (ERK2, p38 α , JNK1). Majd szelektivitásuk alapján 3 csoportba osztottuk őket: specifikus, szelektív és promiszkuus.
- Aktivitás kísérletekkel megállapítottuk, hogy a MEF2A, NFAT4 és NFAT1 transzkripciós faktor fragmensek foszforilálhatóságát a dokkoló peptidek határozzák meg.
- Meghatároztuk, hogy a MAPKAP kinázok C-terminális régiójából származó dokkoló peptidek specifitása megegyezik a MAPK aktivációs útvonalak mintázatával, de a peptidek kötődésének irányultsága éppen ellentétes, reverz irányultságú.
- Megoldottunk négy MAPK-dokkoló peptid komplex kristályszerkezetét, amelyeket részletesen elemezve feltárult elénk a peptidek szelektivitásának szerkezeti háttere.
- A hasonló felépítésű dokkoló árokkal rendelkező ERK2 és p38 α kinázok esetében pontmutációkat építettünk be ezen régióba. Így megállapítottuk, hogy az eltérő jelátviteli útvonalakat vezérlő MAPK-ok dokkoló árkanak felépítése finom hangolja a speciális kötődést a partnerfehérjék dokkoló motívumaival.
- Feltételeztük, hogy a MAPK-dokkoló peptid kötődésben jelentős szerepet játszanak a peptiden belül (intrapeptid) kialakuló H-hidas kapcsolatok. Ezt a hipotézisünket pontmutációs vizsgálatokkal és további kristályszerkezet (ERK2-pepSzingint_revD) megoldásával támasztottuk alá.
- A feltárt szerkezetek alapján irányított szelektivitású motívumokat hoztunk létre mesterséges szekvenciájú peptidekkel, melyekkel igazoltuk a peptidszekvencia különböző régióinak a jelentőségét. Megállapítottuk, hogy néhány aminosav cseréjével létrehozott mesterséges D és revD motívumok specifitás kötődési profilja követi a mutációkkal bevitt szerkezeti változásokat.
- A dokkoló peptideket kötődési módjuk szerint 5 csoportba soroltuk: JIP-, NFAT4-, MKK6-, HePTP-típusú klasszikus és MAPKAPK-típusú reverz D motívumok.
- Teljes hosszúságú fehérjéken végzett kölcsönhatás vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a dokkoló peptidek meghatározzák a specifikus jelátvitelt, azonban néhány esetben egyéb mechanizmusok is szerepet játszanak a specifikus interakció létrejöttében (ERK2-MKK6 és p38 α -MKK1).
- Aktivitás kísérletekkel megértettük a specifikus MAPK \rightarrow MAPKAPK jelátvitel meghatározó tényezőit.

KÖVETKEZTETÉSEK

Különböző jelátviteli fehérjékből származó lineáris motívumok MAPK-ok (ERK2, p38 α , JNK1) dokkoló árkába történő specifikus kötődését vizsgáltuk *in vitro*. Szerettünk volna összehasonlítani ezeknek a fehérje-peptid típusú kölcsönhatásoknak a biokémiai és biológiai specificitását.

Kötődési irányultságukat tekintve a peptideket két fő csoportba tudtuk sorolni: klasszikus és reverz irányultságú (revD) motívumok.

Azt találtuk, hogy míg a klasszikus D-motívumok csak JNK1-et tudják megkülönböztetni hatékonyan a p38 és ERK2 kinázoktól, addig csak a reverz irányultságú peptidek képesek különbséget tenni az utóbbi két kináz kötésében is.

A peptid szekvenciában egyaránt előfordulnak konszenzus aminosavak meghatározott pozíciókban, és variábilisabb régiók is. A konszenzus pozíciókat elfoglaló aminosavak a CD-árokban és a kisméretű hidrofób zsebbel lépnek kölcsönhatásba, és csak általános felszíni motívumokhoz kötődnek, tehát nem diszkriminatív módon járulnak hozzá a kötődésekhez. Ezzel szemben a konszenzus oldalláncok közötti szakaszok esetében azt találtuk, hogy ezek a variábilis aminosavak a meghatározó elemei a dokkoló árokba történő kötő mód és a MAPK specificitás profil kialakításának.

Vagyis az eltérő összetételű és hosszúságú dokkoló peptid köztes régiók az egyszerű fehérje-fehérje interakciók elengedhetetlen eszközei. Ezekben a variábilis régiókban lévő aminosavak intrapeptid H-hidakat hoznak létre vagy korlátozzák a főlánc flexibilitását prolin oldalláncok által. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik, hogy akár rövid (<15-20 aminosav) peptidek jelátviteli szempontból releváns mikromólos affinitással, de mégis specifikus módon kötődhessenek MAPK-okon lévő sekély fehérje-fehérje interakciós felszínhez.

Továbbá D-motívumokat tartalmazó peptidek specifikus interferenciát mutatnak a különböző MAPK útvonalak által szabályozott fiziológia funkciókkal.

Mesterségesen tervezett peptidekkel képesek vagyunk finom hangolni a fehérje-peptid kölcsönhatásokat, és ez által a MAPK jelátvitel specificitását *in vivo*, még egy olyan kötő felszín esetében is, amely általánosan fordul elő a MAPK-ok körében.

Összességében kijelenthető, hogy ezek a kisméretű peptid motívumok hatékonyan képesek megkülönböztetni az ERK2, p38 α és JNK1 dokkoló árkokat, és meghatározzák vagy nagyban hozzájárulnak az *in vivo* szignalizációs logikához a MAPK-ok és partnereik között.

Ezek az eredmények olyan inhibitor molekulák fejlesztését vezethetik elő, melyek segítségével egy hibás útvonal specifikusan gátolhatóvá vagy aktiválhatóvá válik a kinázok aktív helyétől eltérő dokkoló árkán keresztül.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLÁGLÓ PUBLIKÁCIÓK:

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

- **Garai, Á.**, Zeke, A., Gógl, G., Törő, I., Fördös, F., Blankenburg, H., Bárkai, T., Varga, J., Alexa, A., Emig, D., Albrecht, M. and Reményi, A. „Specificity of Linear Motifs That Bind to a Common Mitogen-Activated Protein Kinase Docking Groove.” *Science Signaling* (2012), 5 (245): ra74.
- **Alexa, A.**, Gógl, G., Glatz, G., **Garai, Á.**, Zeke, A., Varga, J., Dudás, E., Jeszenői, N., Bodor, A., Hetényi, Cs. and Reményi, A. „Structural assembly of the signaling competent ERK2–RSK1 heterodimeric protein kinase complex.” *Proc Natl Acad Sci U S A.*(2015), 112 (9): 2711-6.

Nemzetközi konferencia szereplések:

- **Garai, Á. Sz.**, Zeke, A., Gógl, G., Törő, I., Reményi, A. „Biochemical specificity of map kinase binding linear motifs.” *FEBS 3+ Meeting* (Horvátország, Opatija, 2012. június 13-16.)
- **Garai, Á. Sz.**, Zeke, A., Fördös, F., Gógl, G., Reményi, A. „MAP kinase – linear motif interactions restrain signaling specificity in paralogous pathways.” *EMBO meeting* (Ausztria, Bécs, 2011. szeptember 10-12.)

Hazai konferencia szereplések:

- **Garai, Á.** „MAP-kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatásainak specificitása.” *Tudományos Diákköri Konferencia* (ELTE, TTK, 2009. november 27.)
- Bárkai, T., **Garai, Á. Sz.**, Törő, I., Reményi, A. „MAP-kinázok specificitása - a dokkoló peptidek szerepe a jeltovábbításban.” *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlés* (Budapest, 2009. augusztus 23-26.)
- Bárkai, T., **Garai, Á. Sz.**, Reményi, A. „MAPK-kaszád elemeinek dokkoló kölcsönhatásai.” *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlés* (2008. augusztus 31-szeptember 03.)