

MAP kináz pályák szelektivitása

Selectivity of MAP kinase networks

Reményi Attila

University of California, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158, USA

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, E-mail: attila.remenyi@ucsf.edu

Reményi, A.

University of California, Department of Cellular and Molecular Pharmacology, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158, USA

Eötvös Loránd University, Department of Biochemistry, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, Hungary, E-mail: attila.remenyi@ucsf.edu

Összefoglalás

A sejtbiológiai folyamatok egyik rejtélye, hogy kis szubsztrátspecifitású enzimeket használó jelátviteli hálózatok hogyan építenek fel az organizmus szintjén specifikusan működő jelpályákat. Az utóbbi évek kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy fehérjekinázok ún. dokkoló kölcsönhatásai, valamint vázfehérjék közreműködése kiemelkedően fontos szerepet játszanak e jelpályák szelektív működésében. Élesztőből származó mitogénaktivált protein kináz (MAP kináz, MAPK) enzimek dokkoló és vázfehérjepeptidekkel alkotott komplexek keresztül bemutatjuk, hogy ezek az újszerű, aktív helytől független fehérje-fehérje kölcsönhatási mechanizmusok miként hoznak létre nagy specifitású jelátviteli hálózatokat. Érdekes módon humán és élesztő eredetű MAPK-modulok szerveződése nagymértékű hasonlóságot mutat: az itt bemutatott mechanizmusok kiterjeszthetők a gyógyászati szempontból fontos humán enzimeken alapuló jelpályákra is.

Summary

It is an intriguing problem in cell biology how one can make up highly specific signaling networks by using promiscuous components. Recently, it has been discovered that protein kinases use docking interactions and scaffold proteins to build up selective routes for intracellular signal flow. We have determined the structure of several protein-peptide complexes in which a yeast mitogen-activated protein kinase (MAPK) is bound to docking peptides or to a fragment of a classical scaffold protein. These structures demonstrate how these interactions are used to achieve selectivity without the involvement of promiscuous kinase active sites. The organization of MAPK modules is conserved from yeast to human: the described novel protein-protein interactions can also be extended to human MAPKs. One day these studies might serve as the foundation for a more selective approach to modulate MAPK activity in signaling related diseases.

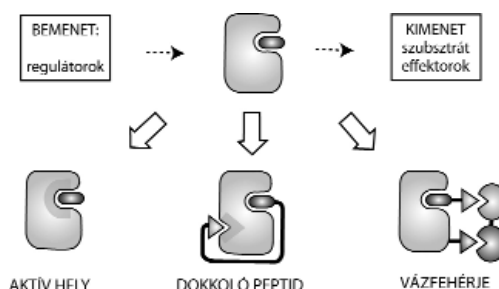
Jelátviteli folyamatokban általános jelenség, hogy a milliónyi környezeti inger sejten belüli feldolgozásában a jelátviteli fehérjéknek csupán egy meglepően kisszámú csoportja vesz részt. A fehérjék aktivitását reverzibilis foszforiláció révén szabályozó fehérjekinázok és -foszfátázok például egyszerre több jelpálya köztes enzimeit is lehetnek. Ennek a problémának a szemléltetésére remek példa a MAP kinázok (MAPK) csoportja [1]. Számuk eukarióta organizmusokban meglepően kicsi, bár a sejten belüli folyamatok szabályozásában szerepük sokrétű (pl. a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő-

fajban 5, míg az emberben <15 MAPK fordul elő). A MAP kinázok a szerin-treonin kinázok csoportjába tartoznak, foszforiláció révén aktiválódnak, míg ők maguk szubsztrátfehérjéknek változatos palettáját foszforilálják. Utóbbiak mind tartalmazzak 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 szubsztrátspecifitásukban meglehetősen „liberális” enzimek a sejten belül és halál urai: olyan alapvetően eltérő folyamatok

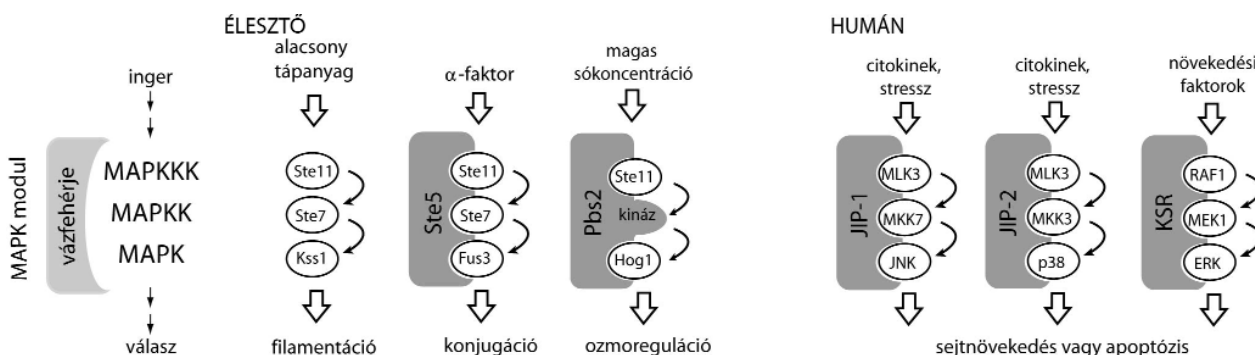
regulátorai, mint például a sejtproliferáció vagy a sejthalál [2]. A jelterjedés hűségének fontosságát szem előtt tartva az alábbi kérdés vetődik fel: hogyan lehetnek az ilyen széles szubsztrátspektrumú fehérjekinázok jelátviteli pályák kulcsenzimeit?

Napjainkban elterjedt nézet, hogy a protein kinázok szubsztrátspecifitását általában az aktív helyet határoló aminosavak befolyásolják. Ez azonban a MAP kinázok estében nyilvánvalóan más-képp van, hiszen egy, a foszforilálható aminosavat követő prolin aminosav mint konszenzusszekvencia nem elégséges követelmény a csoport egyes tagjai – például az emlős eredetű ERK, JNK vagy p38 MAP kinázok – szubsztrátspecifitásának jellemzésére. Az utóbbi évek kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy sok fehérjekináz az aktív helytől független mechanizmusokon keresztül választja ki célfehérjéit; nevezetesen ún. dokkoló vagy vázfehérjékkel történő asszociációk révén (1. ábra) [3–5]. 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

a kináz–szubsztrát párokra írtak le, ahol az enzimerreakció K_M értékének erősítése révén a szubsztrát foszforilációját teszik hatékonyabbá [6]. Ma már dokkoló kölcsönhatások egyéb MAPK-partnerekre is



1. ábra Fehérjekinázok kölcsönhatási mechanizmusai. A legegyszerűbb esetben a foszforilálható aminosav körüli régió kötődik a kináz aktív helyéhez, és ennek a régiónak a térbeli szerkezete határozza meg a szubsztrátspecifitást. Dokkoló kölcsönhatások esetében a kináznak egy, az aktív helytől különálló felszíne (az ún. dokkoló hasadék) és a szubsztrátfehérjéből származó peptidrégió (ún. dokkoló peptid) biztosítja a kináz/szubsztrátfehérje közötti kötődés szelektivitását. Több esetben azonban a szubsztrátfehérje és az azt foszforiláló kináz csak egy harmadik fehérje (ún. vázfehérje) közreműködése révén lépnek interakcióba. Ebben az esetben a kináz–szubsztrátfehérje pár specifitása a vázfehérjével alkotott kölcsönhatásokban rejlik.



2. ábra Élesztő és humán eredetű MAPK modulok. A MAP kinázok aktivitása egy háromszintű kinázaskadon keresztül szabályozott. Ezek az ún. MAPK modulok sokféle jelpálya változatos bemenet–kimenet összefüggéseinek kapcsolóállomásai. Felépítésük nagymértékű hasonlóságot mutat élesztőtől az emberig. Sok esetben MAPK-modulok kinázkomponenseit (MAPK kináz: MAPKKK; MAPK kináz: MAPKK; valamint MAPK) vázfehérjék szervezik komplexekbe (pl. Ste5). Vannak olyan modulok is, melyek vázfehérjék nélkül működnek (pl. a filamentképző pálya esetében), vagy melyekben az egyik kináz maga tölti be a vázfehérje szerepét (pl. Pbs2). Ste5-szerű, analóg funkciót betöltő humán vázfehérjék szintén elterjedtek.



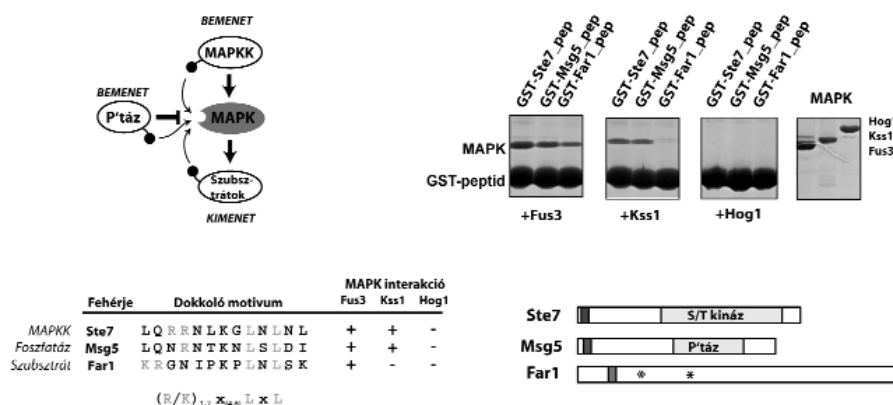
Reményi Attila 1997-ben diplomázott az Eötvös Loránd Tudományegyetemen (ELTE) biológusként, majd 2001-ben orvosbiológus mérnöki diplomát szerzett a Budapesti Műszaki Egyetemen (BME). Alapítástól kezdve évekig az ELTE Bolyai János Szakkollégium diákja. Egyetemi diplomamunkáját a Bristol Egyetemen Angliában, míg PhD-munkáját az Európai Molekuláris Biológiai Laboratóriumban végezte Heidelbergben és Hamburgban. PhD-diplomáját 2001-ben az ELTE Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolájában szerezte. 2002 óta a Kaliforniai Egyetemen San Franciscóban posztdoktori ösztöndíjasként jelátviteli pályák molekuláris logikájának felderítésén dolgozik. 2007 szeptemberétől az ELTE Biokémiai Tanszék munkatársa.

ismertek (például egy másik kinázaktivátorhoz, egy de-aktiváló foszfatázhoz vagy akár vázfehérjékhez való kötődés esetében). A vázfehérjék viszont változatos interakciós doménjeik révén képesek több kinázkomponenst egyidejűleg kötni. Munkánkban a dokkoló kölcsönhatások és a vázfehérjék pontos szerepét szeretnénk felderíteni biokémiai és szerkezeti biológiai módszerekkel. Az alábbiakban három jelpályán keresztül néhány érdekes példát kiemelve mutatjuk be ezeket a kölcsönhatásokat. A konjugációt, filamentképződést és az ozmoregulációt

S. cerevisiae (továbbiakban csak élesztő) esetében különböző MAP kinázok (Fus3, Kss1 és Hog1) szabályozzák (2. ábra). Bár ezek a pályák alapvetően különböző sejtes folyamatokat szabályoznak, a bemenet és kimenet közötti jelfeldolgozás több esetben ugyanazon a fehérjekinázon keresztül valósul meg [7,8]. Például a Ste11 MAPKKK mindhárom pálya esetében közös, míg a konjugációs és filamentképző pálya megfelelő MAP kinázának aktiválása mindkét esetben a Ste7 MAPKK által történik. Ennek a tanulmánynak a keretében a Fus3 és Kss1 MAPK pályák eltérő aktivációja mögötti molekuláris folyamatokat fogjuk ismertetni.

Dokkoló kölcsönhatások és szelektív fehérjehálózatok

Mivel a MAP kinázok központi jelátviteli enzimek, kölcsönhatásaik más fehérjepartnerekkel szükségszerűen sokrétűek. Aktivitásuk a velük kölcsönhatásba lépő egyéb kinázok és foszfatázok közreműködésével változik, míg információfeldolgozás szempontjából egyfajta kimenetként szubsztrátfehérjék (pl. transzkripciós faktoroknak, a citoszkeleton, transzport vagy éppen a sejtciklus fontos fehérjeinek) foszforilációját idézik elő (3. ábra). Legelőször azt vizsgáltuk, hogy a Fus3 MAPK hogyan kötődik a konjugációs pálya aktivitásában kulcsfontosságú szerepet játszó egyéb fehérjékkel. A Ste7 MAPKK a-típusú élesztősejtekben a Fus3 enzimet



3. ábra Dokkoló kölcsönhatások szelektivitása az élesztő MAPK jelpályáira. A MAPK interakciós partnerei általában tartalmaznak egy rövid (kb. 10-15 aminosavnyi) hosszúságú peptidszakaszt, mely a kináz dokkoló hasadékaiba 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 aszociációkat létrehozni. (A peptideket GST-fúziós fehérjékként állítottuk elő, gyantához kötöttük, és a három MAPK – Fus3, Kss1 és Hog1 – kölcsönhatásait SDS-PAGE segítségével követtük nyomon.)

aktiválja egy 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 Fus3 enzimmal. Ezek közös vonása, hogy egy (R/K)_{1,2}X_{4,6}LXL konszenzusmotívumot 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-

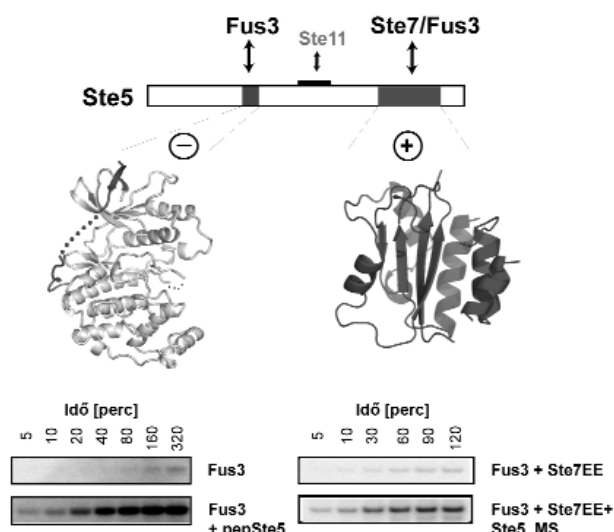
4. ábra (lásd a címlapon) A Fus3 MAPK dokkoló kölcsönhatásainak szerkezeti analízise. A Fus3 enzim interakciós partnerei egy rövid, ~10-15 aminosavat tartalmazó peptidmotívumon keresztül kötődnek a dokkoló hasadékba. Az itt kialakuló, az aktív helytől független, fehérje-fehérje kölcsönhatások fontos szerepet játszanak jelátviteli hálózatok felépítésében. A jobb oldalon a Fus3/pepSte7 komplex kristályszerkezete, míg a bal oldalon feliül a dokkoló hasadék nagyítva látható. (A feliület az elektrosztatikus potenciáljának megfelelően színezett). Ezeken az ábrákon 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 jelen lévő, a Fus3 és Kss1 MAPK közötti specifitáért felelős prolin aminosavak pirosra vannak színezve. A Fus3 aktív helyét * jelzi.

hálózat logikájának megfelelően lépnek interakcióba a három, már korábban ismertett enzim (Fus3, Kss1 és Hog1). Ste7 és Msg5 fehérjék Fus3- és Kss1-aktivitását szabályozzák, és ennek megfelelően a belőlük származó peptidok (Ste7_pep és Msg5_pep) egyaránt kötik mindkét MAPK enzimet, míg a konjugációs pályára specifikus Far1 fehérjéből származó peptid (Far1_pep) szelektív módon kötődik csak Fus3 enzimhez. A továbbiakban meghatároztuk a Fus3 MAPK kristályszerkezetét a fenti peptidokkal komplexet alkotva (4. ábra) [9].

A szerkezeti biokémiai munka a dokkoló hasadék és a dokkoló peptid komplementaritásán túl szintén fényt derített a Far1 peptid szelektivitásának hátterére. A peptidszekvencia a köztes régióban két prolin aminosavat tartalmaz, és ezek jelenléte egy poliprolin II típusú hélixet generál, ami összeférhetetlen a Kss1 dokkoló hasadékával. Ste7 és Msg5 peptid köztes régiója viszont β -kanyar konformációt alkot, amely lehetővé teszi mindkét MAPK enzimmel való interakciót.

A Ste5 vázfehérje és a jelpálya-aktivitás modulációja

Már több mint egy évtizede, hogy az első vázfehérjét (Ste5) felfedezték [10]. Ennek az érdekes fehérjecsoportnak a pontos funkciója azonban még mindig nem teljesen ismert. Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy vázfehérjék csupán passzív módon segítik a fehérjekinázok közötti információáramlást. Mivel ezek a fehérjék a MAPK modul több komponensének kötésére alkalmas domént tartalmaznak, így az egymást aktiváló fehérjekinázok lokális koncentrációját növelve segítik a jelterjedést. Nemrég azonban sikerült bizonyítani, hogy vázfehérjék ennél sokkal érdekesebb módon is képesek jelpályák aktivitását modulálni. Ennek a munkának a keretében először arra voltunk kíváncsiak, hogy a Ste5 fehérje melyik része kötődik a Fus3 MAPK enzimhez. *In vitro* fehérje-fehérje interakció detektálásán alapuló kísérletekben azt találtuk, hogy egy kb. 30 aminosav hosszúságú Ste5 peptid (pepSte5) nagy affinitással képes Fus3 enzimet kötni [11]. Érdekes módon a peptid alloszterikus módon aktiválja a Fus3 enzimet *in vitro* (5. 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 között



5. ábra A Ste5 vázfehérje összetett szerepe a Fus3 enzim aktiválásának szabályozásában. A Ste5 – a Ste11 MAPKKK-kötő régióin kívül – két jól elkülöníthető funkcióval rendelkező kináz-interakciós domént is tartalmaz: ezek a pepSte5 (jobbra) és a Ste5_MS (balra). A pepSte5 alloszterikus módon növeli a Fus3 autoaktivitását, ami azonban a jelpálya aktivitását negatívan befolyásolja *in vivo* (-) (lásd a szövegben). Ugyanakkor az 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 P32 autoradiogramokat mutat. Ezekben az *in vitro* kináztesztekben tisztított rekombináns fehérjekomponenseket kevertünk össze, majd a MAPK foszforilációját időben követtük nyomon. Az egyes fehérjék 1 μ M koncentrációban voltak jelen. A Ste7EE a MAPKK egy konstitutívan aktív formája, amely a Ste11 foszforilációjától függetlenül is aktív.)

ti dinamikus mozgásokat módosítja oly módon, hogy az a MAPK autoaktivációját 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 élesztőtörzseket 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 stimulációja után mégis lényegesen nagyobb konjugációs pályaaaktivitást mértünk. További kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a Ste5 vázfehérje által közvetített alloszterikus MAPK-aktiváció egy, a konjugációs pályán belüli negatív visszacsatolás (feedback) generálásában fontos. Ez a pályaaaktivitást negatív módon befolyásolja, s megszüntetése a mutáns törzsekben végső soron a teljes pályaaaktivitás növekedését eredményezte.

MAPKK→MAPK információátvitel: dokkoló kölcsönhatások és vázfehérjék együtt

Legutóbbi munkánk a Ste5 fehérje MAPKK→MAPK információátvitelben játszott szerepének felderítésére irányul. Ez az a terület, ahol a dokkoló és vázfehérjék által közvetített fehérje-fehérje kölcsönhatások jelentősége a pályák szelektív jelterjedésében talán a legjobban szemléltethető. Már korábban említettük, hogy a filamentképző és a konjugációs MAPK pálya ugyanazt a MAPKK enzimet (Ste7) tartalmazza. Kísérletekkel bizonyítható, hogy Ste7-aktiváció után a filamentképző MAPK (Kss1) foszforilálása csupán intakt dokkoló kölcsönhatást igényel, és vázfehérje jelenlétére nincs szükség. Ez élesen különbözik a konjugációs MAPK (Fus3) példájától: a Fus3 foszforilálásához intakt dokkoló kölcsönhatás a Ste7 enzimhez nem elégséges, de szükséges feltétel. A Ste7→Fus3 információátvitel Ste5 jelenlétét is igényli. Ez genetikai alapú *in vivo* kísérleteken kívül szintén bemutatatható tisztított, rekombináns komponensekkel *in vitro*. Nemrégiben egy *in vitro* MAPK-aktivitás detektálásán alapuló módszer segítségével megállapítottuk, hogy a Ste7→Fus3 foszforiláció közvetítéséhez szükséges Ste5 domén egy csupán ~200 aminosavat tartalmazó strukturális elem (Ste5_MS: Ste5_Mini-Scaffold) (5. ábra). Ennek a doménnek a szerkezetét szintén meghatároztuk, és további kísérletek során azt találtuk, hogy a Ste5_MS egyaránt képes Ste7 és Fus3 fehérjékhez is kötődni. A Ste7/Fus3/Ste5_MS tehát egy olyan fehérjekomplex, amelyben dokkoló és vázfehérje kölcsönhatások egymással együttműködve hoznak létre egy produktív MAPKK/MAPK enzim/szubsztrát komplexet. Jelenleg ennek az izgalmas, hárommolekulás komplexnek a biokémiai és szerkezeti analizisét végezzük.

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetet mond Gráf László professzornak külföldi tanulmányai ideje alatt nyújtott kintartó támogatásáért, dr. Nyitray Lászlónak a kézirat elkészítésében nyújtott segítségéért, valamint az ELTE Biokémiai Tanszék minden munkatársának. Az itt bemutatott munka a Kalifornia Egyetemen, San Franciscóban, dr. Wendell A. Lim laboratóriumában készült. Posztdoktori munkám során sok diákkal dolgoztam együtt; közülük külön is szeretnék megemlíteni néhányat: Roby Bhattacharyya, Caleb Bashor, Matthew Good és Grace Tang.

Irodalomjegyzék

- [1] Schaeffer, H. J., Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.*, **19** (4): 2435–2444.
- [2] Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410** (6824): 37–40.
- [3] Biondi, R. M., Nebreda, A. R. (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.*, **372** (Pt 1): 1–13.
- [4] Bhattacharyya, R. P., Remenyi, 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. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**: 655–680.
- [5] Remenyi, A., Good, M. C., Lim, W. A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16** (6): 676–685.
- [6] Sharrocks, A. D., Yang, S. H., Galanis, A. (200) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **25** (9): 448–453.
- [7] Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.*, **23** (12): 481–485.
- [8] Breitkreutz, A., Tyers, M. (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends Cell Biol.*, **12** (6): 254–257.
- [9] Remenyi, A., Good, M. C., Bhattacharyya, R. P., Lim, W. A. (2005) The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol. Cell*, **20** (6): 951–962.
- [10] Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M., Elion, E. A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, **78** (3): 499–512.
- [11] Bhattacharyya, R. P., Remenyi, A., Good, M. C., Bashor, C. J., Falick, A. M., Lim, W. A. (2006) The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science*, **311** (5762): 822–826.



The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), one of the largest organizations in European life sciences, seeks to promote, encourage and support biochemistry, molecular cell biology and molecular biophysics throughout Europe in a variety of different ways. In this mission, FEBS announces a **Call for Applications** for

FEBS National Lectures

FEBS National Lectures are being established to commemorate the 40th anniversary of FEBS. These FEBS National Lectures are intended as Plenary Lectures that significantly enhance the quality of a scientific meeting, symposium or annual national scientific meeting of a Constituent Society.

Deadline for applications: October 1, 2007

Read more about the lectures in the Guidelines at <http://www.febs.org/index.php>.

If you have any queries, please contact the FEBS Congress Counsellor, Prof. Adam Szewczyk (E-mail: adam@nencki.gov.pl)