

ÚTBAN A MAPKAP-KINÁZ AKTIVÁCIÓ MEGÉRTÉSE FELÉ¹

Gógl Gergő¹, Reményi Attila², Nyitray László¹

¹ELTE Biokémia Tanszék

²MTA TTK Enzimológiai Intézet

Összefoglaló

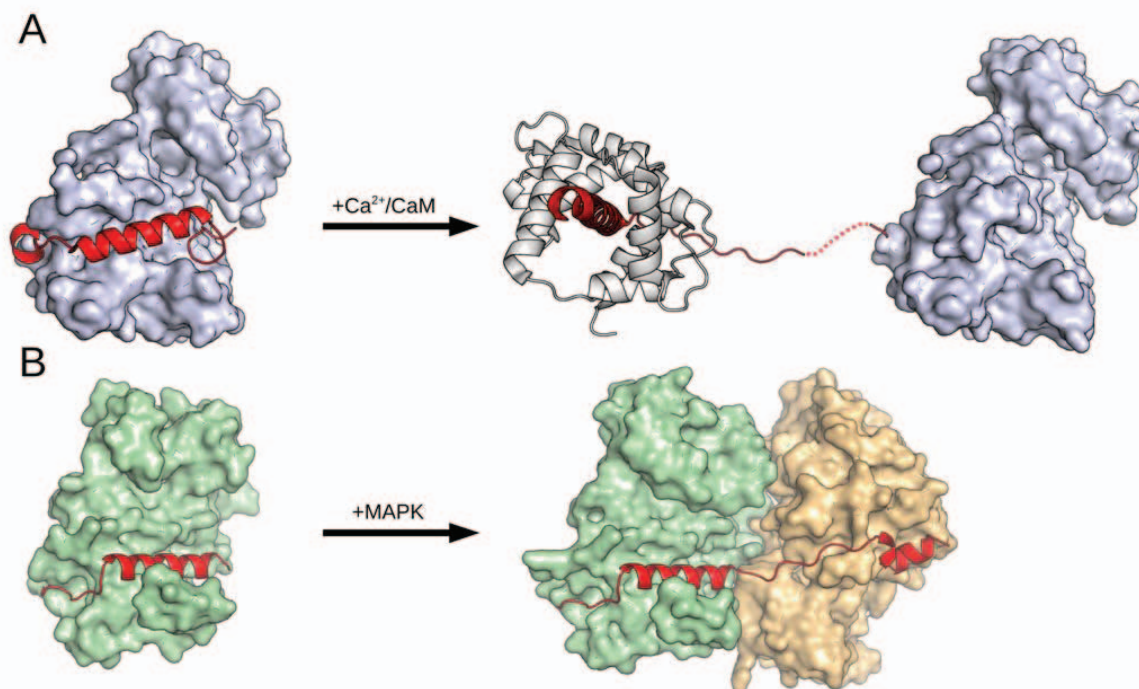
A mitogén-aktivált protein kinázokat (MAPK) aktiváló protein kinázok (MAPKAPK) jelátviteli útvonalak fontos effektorai és egyben a sejtnövekedés, illetve gyulladásos folyamatok szabályzói. A MAPKAPK-ok tagjai a szerkezet és funkció terén jól karakterizált kalcium/kalmodulin-aktivált kinázok (CaMK) családjának, de működésük – főképpen aktiválódásuk – molekuláris mechanizmusai mégis jórészt feltáratlanok. Ennek oka, hogy a szerkezeti hasonlóságok ellenére a MAPKAPK-ok eltérő módon szabályzódnak a többi CaMK-hoz képest. A cikk első felében bemutatjuk, hogy az egyedi autoinhibált MAPKAPK állapot szükséges feltétele az aktivátor MAP-kináz kötődésének, amely ezáltal roppant specifikus jelátviteli modulként tud működni. Ezután szerkezetileg és funkcionálisan jellemezzük a kalciumion-kötő S100 fehérjék MAPKAP-kinázokhoz történő kötődését, amely ugyan nagymértékben hasonlít a kalmodulin-CaMK kölcsönhatásra, ám mégis ellentétes funkcionális hatással rendelkezik; a kináz aktivációja helyett annak gátlása következik be. Az eredményeink alapján felállítottunk egy újszerű MAPKAPK aktivációs modellt.

Bevezetés

A reverzibilis poszttranszlációs módosítások az egyik legfontosabb elemei a sejten belüli jelátviteli folyamatoknak. Ezek közül is kiemelkedik a fehérjefoszforyláció, amelynek közvetítő enzimeit a protein kinázok és foszfatázok. Az általános kináz aktiváció első lépése az aktív hely előtt található aktivációs hurok foszforylációja egy másik kináz által. Ennek hatására az addig dinamikus, mozgékony aktivációs hurok rendeződik, így később képes lesz megkötni a foszforylálható motívumokat (vagy az aktivációs hurok rendezetlensége a foszforyláció révén nő, s így hozzáférhető válik az aktív hely). A protein kinázokat 5-6 nagyobb csoportba lehet sorolni, amelyeken belül található tagok hasonló szabályozó mechanizmusokkal rendelkeznek. A kalcium/kalmodulin-aktivált kinázok (CaMK) egy ilyen csoportja az eukarióta protein kinázok családjának. Közös jellemzőjük a komplex aktivációs mechanizmusuk, ami az egyedi C-terminálisuknak köszönhető: extenziójuk egy

¹ Gógl Gergő a FEBS3+ portoroži konferenciáján elnyerte a legjobb poszternek járó díjat az S100 fehérjék komplexeit vizsgáló munkájáért (a szerkesztőbizottság megjegyzése).

helikális elemet alkotva visszakötődik az aktivációs hurok közelébe, blokkolva mind a foszforilálható szubsztrát, mind az ATP kötődését (1. ábra) [1].



1. ábra. A CaMK típusú kinázok aktiválódása és az RSK1-ERK2 katalitikus komplex kialakulása. (A) Az inaktív kalcium/kalmodulin-függő kinázoknak (CaMK) a C-terminálisa (pirossal színezve) visszakötődik az aktív hely közelébe. Kalciumion szignál hatására a CaM képes hozzákötődni az inhibitor régiót követő szakaszhoz, aminek következtében a kináz felszabadul a gátlás alól. (B) A MAPKAPK-ok, így az RSK1 is (zölddel színezve) hasonló gátlást mutatnak az inaktív szerkezetük alapján. A MAPK-kötő dokkoló motívum ugyancsak az inhibitor régiót követő rendezetlen régióban található, ám a MAPK-kötött (ERK2 narancs színnel színezve) heterodimer szerkezet alapján látható, hogy a MAPK kötés nem szabadítja fel a gátlás alól a MAPKAP-kinázokat.

Az intracelluláris kalciumion szint megemelkedése hatására a kalmodulin (CaM) kötődik az inhibitor hélixet követő szerkezet nélküli régióhoz, s mechanikailag lefejt a gátló hélixet a katalitikus doménről (1. ábra) [1, 2]. A MAPK-aktivált protein kinázok (MAPKAPK) a CaMK család tagjai, azonban az aktivációjuk nem igényel CaM kötést [3]. Az előbb leírt inaktív CaMK struktúrához képest az inaktív MAPKAPK szerkezetek annyiban térnek el, hogy az inhibitor hélix nemcsak blokkolja az aktivációs hurkot, hanem annak kanonikus helyére kötődve kilöki azt az aktív helyről [4, 5]. (A katalitikusan aktív állapot eléréséhez az aktivációs huroknak vissza kell kerülnie a kanonikus pozíciójába.) A család aktivátor kinázai a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK), amelyek az inhibitor hélixet követő rendezetlen régióhoz kötődnek egy lineáris motívumon keresztül [6, 7]. A foszfo-MAPK kötődése után képes foszforilálni a MAPKAPK aktivációs hurok szubsztrát pozícióit [8]. Jelenleg a megannyi inaktív szerkezet mellett egyetlen aktív MAPKAPK szerkezetet sem ismert.

MAPKAPK aktiválódás a MAPK kötődés hatására

A MAP-kinázok a róluk elnevezett jelátviteli útvonalakban található kináz kaszkád alján helyezkednek el és legfőbb tulajdonságuk, hogy specifikus dokkoló motívumokon keresztül kötődnek aktivátoraikhoz és szubsztrátjaikhoz is. A dokkoló motívum és a szubsztrát motívum térben el van választva, ami jelen esetben azért lényeges, mert a foszforilációs reakción túl a MAPK kötődése további szerkezeti átrendeződéseket is okozhat, hasonlóan, mint a CaM kötődése a CaMK-okhoz.

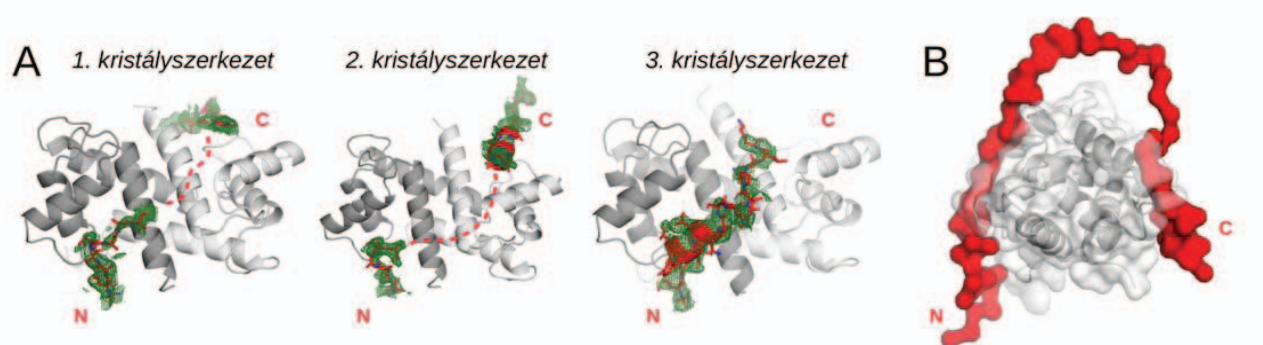
A MAPKAPK aktivációjára alapvetően kétféle szélsőséges modellt lehet elképzelni: a MAPK kötés önmagában felfejtheti az aktív hely közeléből az inhibitor hélixet, vagy a MAPKAPK aktivációs hurok csak foszforilált állapotában képes hatékonyan elfoglalni a kanonikus pozícióját [4]. Az előbbi eset kísértetiesen hasonlít a CaMK aktiválódására, utóbbi pedig azt feltételezi, hogy ezen kinázoknál az inhibitor hélix és az aktivációs hurok az aktív helyen kétféle szerkezetet vehet fel, s ezek egyensúlya inaktív állapotban az inhibitor hélix, míg aktív állapotban a foszforilált aktivációs hurok irányába tolódik el. Amennyiben az utóbbi modell felel meg jobban a valóságnak, akkor ennek mechanisztikus megértése fontos lehet a jövőben, például konformáció érzékeny inhibitorok tervezésében.

Hogy fényt derítsünk a MAPK kötés hatására, Reményi Attila munkacsoportjában kristályosítottuk az ERK2-RSK1 MAPK-MAPKAPK komplexet (1. ábra) [9]. A meghatározott szerkezetben az inhibitor hélix még mindig kötött állapotban maradt és az ERK2 kötő lineáris motívum egy feszített köztes szakaszon keresztül kapcsolódott hozzá. Meglepetésünkre, noha a szerkezet meghatározáshoz inaktív ERK2-t használtunk, egy másodlagos interakciós felszínt találtunk az RSK1 szubsztrát motívumot tartalmazó aktivációs hurokja és az ERK2 aktív helye között, ami igazolja, hogy egy katalitikusan kompetens állapotban kristályosodott ki a komplex. A szerkezetben így tisztán látszik, hogy a MAPK kötődése önmagában nem képes felnyitni a MAPKAPK aktív helyét, sőt az inhibitor hélix gátolt állapota szükséges feltétel ahhoz, hogy a MAPK foszforilálni tudja a MAPKAPK aktivációs hurkot. Ez alapján kizárható a korábban feltételezett MAPK kötődés általi aktivációs modell [4].

MAPKAPK aktiválódás CaMK/CaM-szerű S100 kötés hatására

Kutatásaink e szakaszában írták le először, hogy melanóma sejtekben túltermelt S100B gátolta az RSK1 ERK2 általi foszforilációját, feltételezhetően gátolva a sejtosztódásért felelős ERK útvonal egyes tumor szupresszor funkcióit [10].

Az S100B a CaM eredetű S100 fehérjecsalád tagja, ám a CaM-nal ellentétben ezek a fehérjék homodimer szerkezetűek és a korai gerincesekben jelentek meg először [11]. Fiziológias funkciójuk kevésbé feltárt, de patológias szerepüket intenzíven kutatják, amit jól mutat az a tény, hogy az S100B-t már jó ideje prognosztikus melanóma markerként használják, bár a hatásmechanizmusa egyelőre ismeretlen [12]. A CaM-hoz hasonlóan kalciumion szignál hatására konformációs átrendeződés történik bennük, aminek hatására hozzáférhetővé válik (dimer természetüknél fogva) két szimmetrikus kötőzsebük [13].

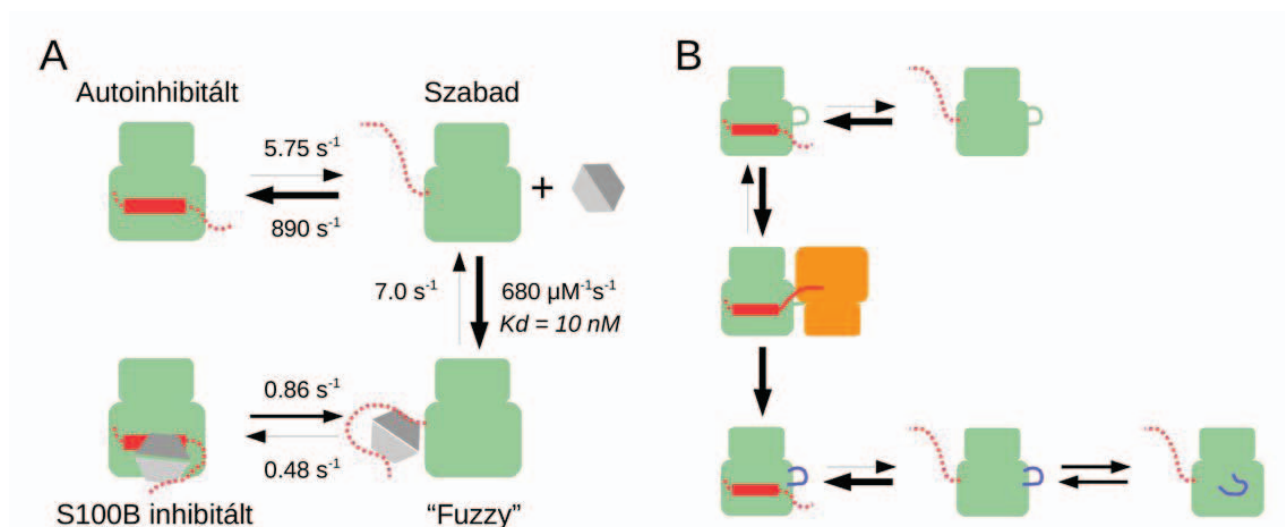


2. ábra. Az RSK1-S100B komplex szerkezeti leírása. (A) 3 megoldott független kristályszerkezetben háromféle konformációban találtuk az S100B (szürke) kötött RSK1 C-terminális peptidet (piros). A feltüntetett differencia elektronsűrűség a peptid beépítése előtti állapotot mutatja. (B) Ugyanennek a komplexnek oldatbeli kisszögű röntgenszórásból rekonstruált szerkezete.

Kezdeti hipotézisünk az volt, hogy az S100B a CaM-hoz hasonló módon képes kötődni, majd aktiválni az előzőleg foszforilált RSK1-et. Ez a modell a kísérletes megfigyelésekkel is összhangban volt: mivel az ERK2-vel versengve ugyanazon lineáris motívumhoz kötődik az RSK1 C-terminális régiójában, így S100B túltermelődéskor RSK1 inhibíciót várunk [10]. A minimális kötőmotívum azonosítása során az ERK2-vel való kompetíciót kísérletesen is bizonyítottuk: az S100B közvetlenül a C-terminális régióhoz kötődik, ami magában foglalja a MAPK-kötő lineáris motívumon kívül az inhibitor hélixet is. A komplexről több határszerkezetben sikerült kristályszerkezetet meghatározni, illetve NMR és kisszögű röntgenszórás segítségével az oldatbeli szerkezetébe is bepillantást nyertünk (2. ábra) [14]. Az eredményeink azt mutatják, hogy az S100B egy „fuzzy” (bolyhos) komplexet képez, ahol a szimmetrikus S100 kötőzsebek két ponton fogják meg az RSK1 kötőrégióját: az inhibitor hélix elejénél és a MAPK dokkoló motívum végénél (2. ábra) [14, 15].

Megfigyeléseinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy nagy a szerkezeti hasonlóság a MAPKAPK-S100 és a CaMK-CaM komplexek között, hiszen mindkét

esetben a kalíciumion-kötő fehérje képes kibillenteni az aktív helyről az inhibitor régiót, aminek hatására a kináz aktív helye szabaddá válik. Ebből az következne, hogy az S100 kötés aktiválni fogja a MAPKAP-kinázt, ám kísérleteink ennek ellenére egyértelműen azt mutatják, hogy az S100B nemcsak az ERK2 általi aktivációt, de a foszforilált RSK1 saját kináz aktivitását is képes gátolni [14]. Kinetikai mérések alapján végül sikerült felállítanunk egy szerkezeti-mechanisztikus modellt, amely leírja az S100B kötődését az RSK1-hez: az RSK1 szabadon kétféle konformációs állapotban lehet, amelyek az inhibitor régió szerkezetében különböznek. A két állapot közti egyensúly lényegesen el van tolódva a gátolt állapot irányába, az S100B ellenben csak a szabad, rendezetlen szerkezetű C-terminális régióval képes kötődni, kialakítva így az általunk jellemzett „fuzzy” komplexet. Ez egy izomerizációs lépés során alakul át az inhibíciós komplexszé, amely felelős azért, hogy az S100B az RSK1 aktivitását is gátolja (3. ábra). Az RSK1-S100B komplex kialakulása tehát egy konformációs szelekciós lépéssel kezdődik (ahol az S100B preferáltan a „szabad” RSK1-hez kötődik, az „autoinhibítálthoz” nem), amit egy indukált illeszkedés izomerizációs lépés követ (a „fuzzy” komplexből kialakul az „S100B inhibált” funkcionális komplex (3. ábra) [14].



3. ábra. RSK1-S100B komplexképződés és az RSK aktiváció kinetikai modellje.

(A) Az S100B konformációs szelekcióval képes kötődni az RSK1 szabad C-terminálisához (piros színnel jelezve). Ez a komplex egy izomerizációs lépésen keresztül egy további gátolt állapotot eredményez, aminek a kialakulása így indukált illeszkedésnek tekinthető. A kinetikai konstansok stopped-flow kísérletekkel lettek meghatározva. (B) Az eddigi megfigyeléseink alapján felállítható MAPKAPK aktivációs modell egy több lépésből álló képet sejtet. A MAPK az inaktív állapotú MAPKAPK-hoz kötődve képes foszforilálni az aktivációs hurkot. A még mindig inhibált konformációban lévő, de foszforilált MAPKAPK két izomerizációs lépésen keresztül éri el a végleges, már aktívnak tekinthető állapotát. A panelen a foszforilált aktivációs hurkot kék színnel tüntettük fel.

Áttekintés

Sem az ERK2, sem az S100B kötés jellemzése nem oldotta meg a MAPKAP-kinázok aktivációs mechanizmusának a rejtélyét, de mindkettő rámutatott egy fontos pontra: az inaktív állapot esszenciális a MAPK általi aktivációs lépésben és az inhibitor hélix képes magától elválni az aktív helytől. Az RSK1 két konformációs állapotát a kinetikai méréseken felül még SAXS mérések is igazolták. Az inhibitor régióinak ebből a spontán letekeredéséből az is következhet, hogy a felszabadult aktív helyhez az aktivációs hurok vissza tud kötődni, amit a MAPK katalizálta foszforiláció stabilizálni tud. Remélhetően a jövőben sikerül közvetlenül is megismerni egy aktív MAPKAPK atomi felbontású szerkezetet, de a jelenlegi, közvetett információink alapján az alábbi konszekutív aktivációs modell tűnik valószínűnek (3. ábra): az inaktív MAPKAPK-t a MAPK szelektíven képes foszforilálni az aktivációs hurkon található szubsztrát motívumon, amely ezután konformációs szelekcióval a MAPKAPK populáció egy kis hányadához, a szabad aktív hellyel rendelkezőhöz képes visszakötődni egy stabil aktív állapotot eredményezve.

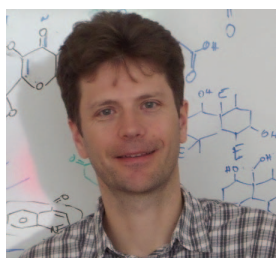
Irodalomjegyzék

- [1] Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F., and Knapp, S. (2010) Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol*, **8**: e1000426.
- [2] Gaertner, T. R., Kolodziej, S. J., Wang, D., Kobayashi, R., Koomen, J. M., Stoops, J. K., and Waxham, M. N. (2004) Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, **279**: 12484–12494.
- [3] Underwood, K., Parris, K., Federico, E., Mosyak, L., Czerwinski, R., Shane, T., Taylor, M., Svenson, K., Liu, Y., and Hsiao, C. (2003) Catalytically Active MAP KAP Kinase 2 Structures in Complex with Staurosporine and ADP Reveal Differences with the Autoinhibited Enzyme. *Structure*, **11**: 627–636.
- [4] Malakhova, M., Tereshko, V., Lee, S.-Y., Yao, K., Cho, Y.-Y., Bode, A., and Dong, Z. (2008) Structural basis for activation of the autoinhibitory C-terminal kinase domain of p90 RSK2. *Nat Struct Mol Biol*, **15**: 112–3.
- [5] Li, D., Fu, T.-M., Nan, J., Liu, C., Li, L.-F., and Su, X.-D. (2012) Structural basis for the autoinhibition of the C-terminal kinase domain of human RSK1. *Acta Crystallogr Sec D Biol Crystallogr*, **68**: 680–685.
- [6] Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **75**: 50–83.
- [7] Garai, Á., Zeke, A., Gógl, G., Törő, I., Ferenc, F., Blankenburg, H., Bárkai, T., Varga, J., Alexa, A., Emig, D., Albrecht, M., and Reményi, A. (2012) Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Sci Signal*, **5**: ra74.

- [8] Romeo, Y., Zhang, X., and Roux, P. P. (2011) Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.*, **441**: 553–569.
- [9] Alexa, A., Gógl, G., Glatz, G., Garai, Á., Zeke, A., Varga, J., Dudás, E., Jeszenői, N., Bodor, A., Hetényi, C., and Reményi, A. (2015) Structural assembly of the signaling competent ERK2–RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proc Natl Acad Sci*, **112**: 2711–6.
- [10] Hartman, K. G., Vitolo, M. I., Pierce, A. D., Fox, J. M., Shapiro, P., Martin, S. S., Wilder, P. T., and Weber, D. J. (2014) Complex formation between s100b protein and the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) in malignant melanoma is calcium-dependent and inhibits extracellular signalregulated kinase (ERK)-mediated phosphorylation of RSK. *J Biol Chem*, **289**: 12886–12895.
- [11] Donato, R. (2001) S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**: 637–668.
- [12] Gogas, H., Eggermont, A. M. M., Hauschild, A., Hersey, P., Mohr, P., Schadendorf, D., Spatz, a., and Dummer, R. (2009) Biomarkers in melanoma. *Ann Oncol*, **20**: 8–13.
- [13] Kiss, B., Duelli, A., Radnai, L., Kekesi, K. A., Katona, G., and Nyitray, L. (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Nat Acad Sci*, **109**: 6048–6053.
- [14] Gógl, G., Alexa, A., Kiss, B., Katona, G., Kovács, M., Bodor, A., Reményi, A., and Nyitray, L. (2015) 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. *J Biol Chem*, pii: jbc.M115.684928. [Epub ahead of print].
- [15] Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sc.*, **33**: 2–8.



Gógl Gergő kutatásait 2006-ban, még gimnáziumi évei alatt kezdte meg Friedrich Péter laboratóriumában az MTA Enzimológiai Intézetében, ahonnan az egyetemi felvételét követően az ELTE Biokémia Tanszékén Reményi Attila újonnan alapított munkacsoportjához csatlakozott. Itt ismerkedett meg a protein kinázokkal, amelyek működésének szerkezeti alapjai azóta is foglalkoztatják. 2015-ben diplomázott az ELTE vegyész szakán, utána az ELTE Biokémia Tanszékén Nyitray László kutatócsoportjában, kettős témavezetéssel kezdte meg a doktori munkáját.



Reményi Attila biológus az Európai Molekuláris Biológiai Laboratórium-ban kezdte kutatásait és tízéves külföldi tartózkodás (Anglia, Németország, USA) után 2007-ben alapított kutatócsoportot az ELTE-n. 2013-ban az MTA Lendület programjának keretében hozta létre a Fehérje Kölcsönhatás Kutatócsoportot az MTA TTK Enzimológiai Intézetében. Kutatásai a sejtes rendszerek „értelmes” működését biztosító fehérje-fehérje kölcsönhatások révén felépülő jelátviteli komplexek működésének megértésére irányulnak.



Nyitrai László az ELTE TTK biológus szakán végzett 1981-ben. Azóta a Biokémia Tanszék munkatársa, 2007-től tanszékvezetőként, 2012-től egyetemi tanárként. 1985-ben, majd 1989-91-ben az Egyesült Államokban (Boston Biomedical Research Institute, majd Brandeis Egyetem) dolgozott. 1997-2004 között Széchenyi professzori ösztöndíjas volt. 2010-től az MTA doktora, 2013-ban Mestertanár Aranyérmet kapott. Fő érdeklődési területe a motorfehérjék és kalcium-kötő fehérjék molekuláris és szerkezeti biológiája, fehérje-fehérje kölcsönhatások sokoldalú vizsgálata.