REMÉNYI ATTILA

FEHÉRJEKINÁZOK

ÚJ TUDOMÁNYOS ZSEBKÖNYVTÁR

ÉLETTUDOMÁNYOK

REMÉNYI ATTILA

FEHÉRJEKINÁZOK

FUNKCIÓ ÉS SZERKEZET

TYPOTEX

A könyv megjelenését
az Eötvös Loránd Kutatási Hálózat Titkársága támogatta.

ELKH | Eötvös Loránd Kutatási Hálózat

© Reményi Attila, Typotex, Budapest, 2022
Engedély nélkül semmilyen formában nem másolható!

Lektorálta
Sarkadi Balázs
Természettudományi Kutatóközpont

ISBN 978 963 493 198 0
ISSN 2939-6131

Kedves Olvasó!
Köszönjük, hogy kínálatunkból választott olvasnivalót!
Újabb kiadványainkról, akcióinkról a *www.typotex.hu*
és a *facebook.com/typotexkiado* oldalakon értesülhet.

Typotex Kiadó
Alapította Votisky Zsuzsa, 1989
A kiadó az 1795-ben alapított Magyar Könyvkiadók
és Könyvterjesztők Egyesülésének tagja.
Felelős kiadó: Németh Kinga
Felelős szerkesztő: Kovács Zoltán
Tördelés: Janković Milán
Borítóterv és tipográfia: Somogyi Péter
Készült a Multiszolg Bt. nyomdájában
Felelős vezető: Kajtor Bálint

TARTALOM

ELŐSZÓ 7

1. BEVEZETÉS 11

2. A FEHÉRJEFOSZFORILÁCIÓ JELENTŐSÉGE ÉS EVOLÚCIÓJA 23

3. A FEHÉRJEKINÁZOK ÉS -FOSZFATÁZOK SZEREPE A SEJTES JELÁTVITELI FOLYAMATOKBAN 39

4. A FEHÉRJEKINÁZOK SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE 51

5. A HUMÁN KINÓM 63

6. SZERIN-/TREONIN- ÉS TIROZINKINÁZOK 71

7. PSZEUDOKINÁZOK 83

8. A FEHÉRJEKINÁZOK KÖLCSÖNHATÁSAI MÁS FEHÉRJÉKKEL ÉS EGYMÁSSAL 91

9. FEHÉRJEKINÁZ ALAPÚ JELÁTVITELI KASZKÁDOK 105

10. A FEHÉRJEKINÁZOK PATOLÓGIÁS MŰKÖDÉSE 119

11. HATÓANYAG-TERVEZÉS 131

12. SZERKEZETALAPÚ RENDSZERBIOLÓGIA 147

IRODALOM 157

ELŐSZÓ

A tudományban fontosak a jól megfogalmazott kérdések. A jó kérdéseknél pedig talán csak az ezekre adott jó válaszok érnek többet. A fehérjekinázok szerepe a sejtszintű jelátvitelben az utóbbi három évtized intenzíven kutatott területe, amely látványosan fejlődött az első kináz térszerkezetének a meghatározása után; hasonlóan ahhoz, ahogyan sok-sok évvel ezelőtt az anatómia mint az emberi szervezet struktúrájának tudománya nagy lökést adott a későbbi humánélettani kutatásoknak. A sejtes jelátvitel olyan biológiai folyamat, amely során sejtjeink a külvilágból érkező ingerekre azok összességének megfelelő, sejten belüli fiziológiai válaszokat adnak. Ezek alapján nem meglepő, hogy az orvosbiológia számára is fontos területről van szó, ahol ma már az atomi struktúra ismeretében történhet a gyógyszerhatóanyag-fejlesztés. A könyv célja, hogy betekintést nyújtson vegyészek, biológusok és orvosok számára a sejtes jelátviteli folyamatokat meghatározó fehérjekinázok világába, valamint bemutassa a biokémiai szerkezet és a biológiai funkció összefüggéseit.

A kinóm (azaz a kinázokat kódoló gének összessége egy organizmusom belül) az emberben több mint 500 gént tartalmaz. Ezek legnagyobb része olyan enzimet kódol, amely a fehérjék működését foszforiláció révén módosítja. Ez a fajta poszttranszlációs módosítás az emberi fehérjék több mint egyharmadát érinti – bár ez a szám a foszfoproteomikai technikák érzékenységének fejlődésével folyamatosan növekszik. Egyes tanulmányok ma már 50-80% ilyen fehérjéről írnak – így ez a folyamat a sejtes élet szinte minden aspektusát (például növekedés, osztódás, halál, differenciáció, mozgás) befolyásolja. A fehérjekinázok molekuláris kapcsolóként működnek, ahol ők maguk is gyakran fehérjefoszforiláció révén szabályozhatóak. A foszfotranszfer-reakciót végrehajtó kinázdomén meglepően egységes szerkezeti felépítést mutat, de a kinázok hét nagy csoportjához tartozó fehérjék (CMGC, CAMK, AGC, CK1, STE, TKL, TK) teljes felépítése és szabályozása eltérő. A körülbelül fél évszázada tartó funkcionális kutatások, amelyeket már 1992-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmaztak, az utóbbi három évtizedben kiegészültek a fehérjekinázok 3D szerkezetének feltárásával, ami lehetővé tette a szerkezetalapú racionális gyógyszerhatóanyag-fejlesztést olyan betegségek ellen, mint a rák vagy a krónikus gyulladások.

A könyv 12 fejezetében tárgyaltak az egyes fejezetek alcímében feltett konkrét kérdéshez kapcsolódnak, és a jelenségek mögötti szerkezeti okokra vagy az ezekből eredő funkcionális lehetőségekre és korlátokra fókuszálnak. Számomra a funkciónak, amit biokémikusként vizsgálok, mindig van egy szerkezeti aspektusa, és az olvasót is arra biztatom, hogy vizsgáljuk meg az alábbi kérdéseket a szerkezet-funkció összefüggések szemszögéből:

Hogyan segített a szerkezeti biokémia a fehérjekináz alapú jelátvitel megértésében?

Miért a foszforiláció lett a legelterjedtebb fehérjemódosítás a sejtes jelátvitelben?

Miért nincs minden kináznak egy semlegesítő foszfatáza?

Hogyan működnek a fehérjekinázok mint molekuláris kapcsolók?

Hány fehérjekinázа van az embernek?

Milyen konkrét jelpályákban működnek a szerin-/treonin-, illetve a tirozinkinázok?

Mire jók a katalitikus aktivitás nélküli álkinázok?

Milyen kölcsönhatások biztosítják a fehérjekinázok specificitását?

Miért foszforilálják egymást a kinázok?

Hol vannak a fehérjekinázok gyenge pontjai?

Hogyan tervezhetünk fehérjekinázok működését befolyásoló vegyületeket?

Hogyan segíti a szerkezeti biokémia a fehérjefoszforiláció rendszerszintű leírását?

A sejtes jelátvitel szakirodalma hatalmas és tematikailag is változatos. A kinázoknak meghatározó szerepük van abban, ahogyan a sejtek a külvilág milliónyi ingerére reagálnak, de természetesen ezt más fehérjékkel (például receptorok, más köztes enzimek, transzkripciós faktorok) együttműködve teszik. A biokémiai jelenségen túlmutató biológiai funkciók ezekkel a fehérjékkel együtt tárgyalva válnak nyilvánvalóvá, a kinázok szerepe pedig ebben a nagyobb kontextusban nyer

értelmet. Munkám során sokszor meglepődtem azon – és abban bízom, hogy az olvasót is érik majd ehhez hasonló élmények –, hogy látszólag komplex jelenségek mögött milyen egyszerű biokémiai törvényszerűségek rejlenek.

Végül itt szeretném megköszönni Reményi Franciskának az ábrák elkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Budaörs, 2022. március

Reményi Attila

1. BEVEZETÉS

HOGYAN SEGÍTETT A SZERKEZETI BIOKÉMIA A FEHÉRJEKINÁZ ALAPÚ JELÁTVITEL MEGÉRTÉSÉBEN?

Az első bizonyíték arról, hogy a foszfátcsoport beépülhet fehérjékbe, 1906-ból származik, húsz évvel később pedig az is kiderült, hogy ez egyfajta enzimatikus folyamat eredménye. Az első, ATP-t igénylő konkrét fehérjemódosítás biokémiai felfedezése egy szerin aminosav foszforilációjának igazolásával történt a glikogén foszforiláz enzimben, több mint 60 éve (Pawson & Scott 2005). Ezt követte az első fehérjetirozin aminosav módosításának a bizonyítása 1979-ben (Eckhart et al. 1979). Az első háromdimenziós képet egy fehérjefoszforilációs esemény által kiváltott szerkezeti változásról a glikogén foszforiláz példáján keresztül ismerhettük meg 1989-ben (Barford & Johnson 1989), amit aztán két évvel később követett az első fehérjekináz, a proteinkináz A (PKA) háromdimenziós szerkezetének meghatározása (Knighton et al. 1991).

Ettől az időszaktól kezdődően meglehetősen sűrűn követték egymást a fehérjekinázokhoz kapcsolódó tudományos felfedezések (lásd Pawson & Scott 2005). Egyrészt egyre többet tudtunk meg a fehérjekinázok különböző organizmusokban betöltött szerepéről (2. fejezet), felfedezték a fe-

hérjefoszfatázokat (3. fejezet), megismertük a közös, ugyanakkor az egyes csoportokat megkülönböztető szerkezeti biokémiai és funkcionális jellegzetességeket (4. fejezet), majd az emberi genom DNS-szekvenciájának meghatározásával lehetővé vált a teljes humán kinóm megismerése (5. fejezetet). Ezzel párhuzamosan a fehérjefoszforilációt mint széles körben használt, poszttranszlációs fehérjeműködést módosító mechanizmust is vizsgálták. A fehérjekinázok szerkezet-funkció vizsgálata tehát összekapcsolódott az általuk okozott, más fehérjékre és sokszor egymásra is gyakorolt szerkezeti változások megismerésével (6. fejezet).

Az első kérdés, amit tisztázni kellett, hogy a fehérjekinázok általi foszforiláció pontosan hogyan változtatja meg a fehérjék működését. A legkézenfekvőbb hipotézis talán az lehetne, hogy a nagy lokális negatív töltéssel rendelkező foszfátcsoport aminosav-oldalláncokhoz csatlakozva, közvetlen módon változtatja meg a fehérjék működését. Ez az allosztérikus mechanizmus – amely egyébként leginkább a kinázok egymásra gyakorolt hatása esetén bizonyult igaznak – viszont azt feltételezi, hogy a kinázok által módosított aminosavak szerkezetileg rendezett doménekben helyezkednek el. Nos, idővel kiderült, hogy a legtöbb fehérje foszforilációs helye úgynevezett rendezetlen régiókban van (Iakoucheva et al. 2004). Hogyan változtatja meg egy akár több száz aminosavas régió funkcióját egy foszfátcsoport? Bár sok példát találunk arra, hogy a fehérjék a kritikus szakaszaikon nemcsak egyszeres, hanem többszörös foszforiláción mennek keresztül közeli pozíciókban, és így az adott régió elektrosztatikus tulajdonságai nagymértékben változhatnak, a rendezetlen szakasz akár egy adott aminosavának módosítása is sokszor elégnek bizo-

nyult. Ennek oka, hogy léteznek foszfo-aminosav felismerésére szakosodott, úgynevezett moduláris domének (például 14-3-3 vagy Src homológia 2, SH2, domén) (Yaffe & Elia 2001, Pawson 2004).

A múlt század végére világossá vált, hogy az evolúciós szempontból gyorsan változó jelátviteli szabályozó fehérjékben elterjedt a funkcionális modularitás, azaz a fehérje-fehérje kölcsönhatások specificitásáért, illetve az enzimatikus aktivitásért felelős struktúrák elkülönülnek egy polipeptidláncon belül (Bhattacharyya et al. 2006a). Ez lehetővé tette, hogy bizonyos kinázok elveszítsék eredeti katalitikus aktivitásukat, és a fehérje-fehérje kölcsönhatások szervezésére szakosodjanak (7. fejezet). A kinázdoméneken felfedeztünk dedikált fehérjekötő felszíneket, illetve értelmezhetővé vált a többdoménes felépítés jelentősége, mert kiderült, hogy ezek elősegítik a katalitikus kinázdomén szelektív kötését más fehérjékhez (8. fejezet). Egyedi kinázok biokémiai és szerkezeti analízisén túlmutató, jelpályaszintű vizsgálatok feltárták, hogy a fehérjekinázok sokszor kaszkádokba szerveződnek, ami lehetővé teszi, hogy egy adott kináz más jelátviteli kaszkádok aktivitásától függő módon közvetítsen jeleket, illetve hogy komplex, nem lineáris típusú válaszok kialakításában vegyen részt (9. fejezet).

A fehérjekinázok szerkezeti biokémiai vizsgálata, ami 1991-ben indult, majd a 2000-es évek elejétől teljesedett ki és a mai napig tart, feltárta számos, jelátviteli hibán alapuló betegség (például rák vagy krónikus gyulladás) konkrét molekuláris hátterét (10. fejezet), és megteremtette a racionális, szerkezetalapú hatóanyag-tervezés alapjait (11. fejezet). Hasonlóan ahhoz, ahogy az utóbbi három évtizedben a fe-

hérjekinázok 3D struktúrájának a meghatározása segítette az egyes kinázok működésének a megértését, a következő években, amikor a hangsúly egyre inkább a kinázok más fehérjékkel alkotott komplexeire helyeződik át, a jelátviteli folyamatok magasabb rendű működésére vonatkozóan várunk majd újabb eredményeket (12. fejezet).

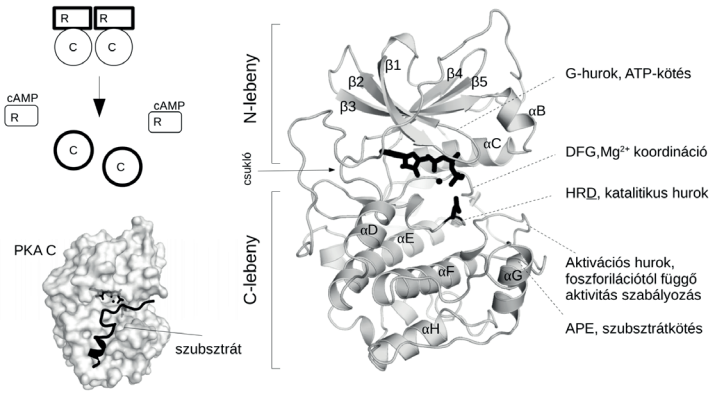
A fehérjeszerkezetet vizsgáló módszerekről nem lesz szó, de ezek néhány mondatban az alábbiakban összegezhetők. A fehérjekristályok röntgendiffrakcióján alapuló módszer a legelterjedtebb technika a fehérjekinázok atomi felbontású szerkezeteinek a meghatározására. A nukleáris mágneses rezonancia (NMR) technika is alkalmazható kisebb méretű fehérjékre, és segítségével a szerkezetek dinamikai változásairól is tudunk adatokat gyűjteni. A kis szögű röntgenszórás (angol rövidítéssel SAXS) használható többdoménes kinázok nagyobb léptékű szerkezetanalízisére, bár csak kisebb felbontáson. A krio-elektronmikroszkópia (angol rövidítéssel cryo-EM) pedig napjainkban egyre elterjedtebb használatot nyer a szerkezeti vizsgálatokban, s a módszerrel megfelelően merev szerkezetű fehérjék és nagyobb méretű komplexeik esetében az atomi felbontás is elérhető.

A következőkben három különböző fehérjekináz szerkezetének a részletesebb bemutatására kerül sor, ami szemlélteti ennek a jelátviteli enzimcsoportnak a működését. A proteinkináz A (PKA) a sejten belüli ciklikus adenozinmonofoszfát (cAMP) másodlagos hírvivő molekula érzékelésére szakosodott enzim. A PKA holoenzimként működik: két-két regulátor (R) és katalitikus (C) alegységből áll. A C alegység, ami a holoenzim fehérjekináz részének felel meg, önmagában aktív, de az R alegységhez kötődve inaktív álla-

potban van. Ennek oka, hogy az R alegység tartalmaz egy inhibitorszakaszt (IS), ami az enzim szubsztrátkötőzsebéhez kötve pszeudoszubsztrátként működik, és blokkolja a C alegység szubsztrátjainak a kötését. Sejten belüli cAMP-szintnövekedés hatására az R alegység megköti a kismolekula hírvivőt, amit a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) aktiválódása után az adenilát-cikláz nevű enzim hoz létre, s ami miatt az R alegység szerkezete úgy változik meg, hogy elengedi a C alegységet. Ennek hatására a fehérjekináz szubsztrátkötőzsebe felszabadul, és megtörténik a bekötött új szubsztrátoknak az enzim aktív centruma általi módosítása. A PKA C alegységének szerkezete 1991-ben vált először ismertté, előtte nem volt információink arról, hogy a fehérjekinázok szekvenciájában korábban felismert hasonlóságok pontosan milyen szerkezeti okokra vezethetők vissza (Hanks et al. 1988). Ez az első háromdimenziós szerkezet egy csapásra megmagyarázta az ismert kinázok szekvenciahasonlósága mögött rejlő okokat, mert bemutatta a glicingazdag G-hurok szerepét az ATP-kötésben, a DFG-szekvencia szerepét a katalízishez szükséges Mg^{2+} ion kötésében, az APE-szekvencia jelentőségét a szubsztrát kötésében szerepet játszó P+1 hurkon, illetve tisztázta a katalitikus hurkon lévő HRD-motívum és az aktivációs hurkon elhelyezkedő foszforilációs hely jelentőségét az enzim aktivitásában. A fehérjekináz-domének nagymértékű hasonlósága miatt a PKA röntgendiffrakciós szerkezetét a mai napig egyfajta referenciaszerkezetnek tekintjük: itt derült fény először arra, hogy a kinázok egy főleg α-hélixekből álló kompakt C-terminális és β-lemezekből álló N-terminális lebenyből állnak, amelyeket a flexibilis csuklórégió köt össze. Az

ATP kofaktor a két lebeny közötti mély hasadékba köt, míg a szubsztrátkötőzseb egy meglehetősen sekély felszín, ahol a katalízisért felelős oldalláncok az ATP γ-foszfát-csoportjának a közelében helyezkednek el (*1. ábra).* Ez a kétlebenyes struktúra lehetővé teszi, hogy a foszfotranszfer-reakció szabályozott módon valósuljon meg, de az enzim katalitikus rátája mégis nagy legyen az aktivált állapotban. Már a statikus röntgenszerkezet alapján is könnyen elképzelhetővé vált, hogy egy ilyen felépítésű enzim szabályozásának milyen strukturális lehetőségei vannak. Azt már korábbi funkcionális vizsgálatokból tudni lehetett, hogy a legtöbb fehérjekináznak két funkcionális állapota van (inaktív és aktív), és a kinázok is sokszor foszforiláció révén aktiválódnak: a fehérjekinázok egyfajta molekuláris kapcsolóként működnek a jelátviteli pályákban. A szerkezeti biokémiai vizsgálat pedig feltárta azt az atomi struktúrát, amellyel ez mechanisztikailag lehetséges. Az ezt követő években egyre gyorsuló ütemben követték egymást az újabb és újabb fehérjekináz-szerkezetek, amelyek bemutatták a kétlebenyes struktúra konkrét változatait, és feltárták az enzimaktivitás szabályozásának különböző módozatait.

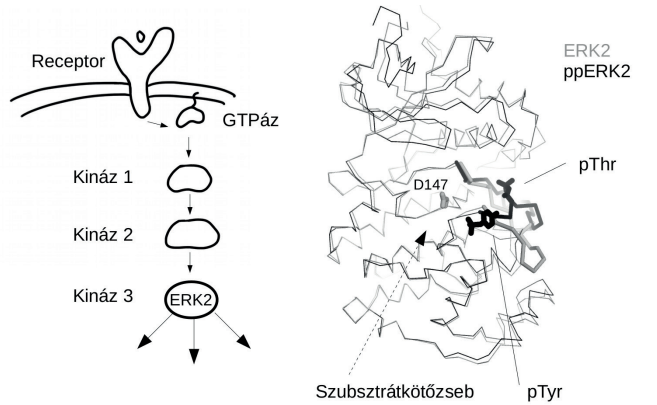
Funkcionális vizsgálatokból tudtuk, hogy a sejtek növekedési jelpályáinak egyik központi enzime az ERK2 nevű kináz (angolul: extracellular signal regulated kinase 2). Extracelluláris hormonok sejtfelszíni receptorokhoz kötődve – amelyek egyébként maguk is lehetnek kinázaktivitással bíró enzimek – bekapcsolják az úgynevezett mitogénaktivált proteinkináz (MAPK) jelpályákat. Az ERK2 egy többlépcsős kinázkaszkád utolsó tagjaként foszforiláció révén aktiválódik, a felsőbb szintű kináz mindig ugyanazt az ERK2 aktivációs hurkon elhelyezkedő két aminosavat foszforilálja. A defosz-



1. ábra. A PKA holoenzim (2R+2C) és a C katalitikus alegység szerkezete és szabályozása

A bal oldali alsó szerkezeti ábra a PKA katalitikus alegység (C) felszínét, illetve egy pszeudoszubsztrátként működő peptidet (fekete) mutatja (PDB ID: 1ATP). A jobb oldali ábrán a kináz másodlagos szerkezeti elemei (α-hélixek és β-lemezek) látszanak, az aktív hely aszpartát aminosava (D166), illetve a MgATP kofaktor feketével van kiemelve.

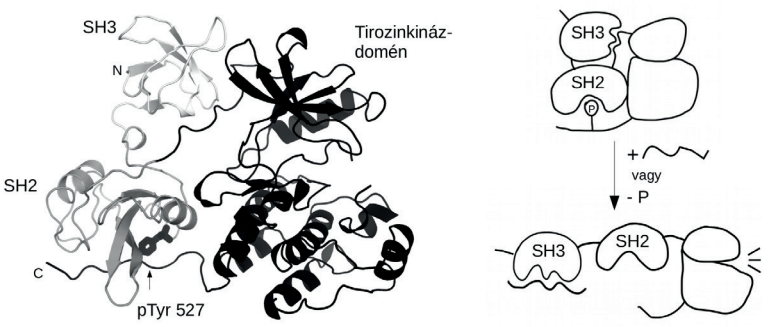
forilált ERK2, azaz az inaktív enzim szerkezete 1994-ben vált ismertté, ezt 1997-ben követte az aktivált állapotú enzim szerkezetének a meghatározása (Zhang et al. 1994, Canagarajah et al. 1997). A két szerkezet összehasonlításából rögtön látszott, hogy az aktivációs hurok foszforilációja miért aktiválhatja az enzimet: a foszforiláció okozta lokális szerkezeti változás révén a szubsztrátkötőzseb olyan szerkezetet vesz fel, amely könnyebben kötheti a szubsztrátot (*2. ábra).* Ezek a szerkezeti biokémiai vizsgálatok bemutattak egy a PKA-tól részleteiben alapvetően különböző szabályozási



2. ábra. A kompakt felépítésű ERK2 szerkezete és szabályozása
A bal oldali ábra az ERK2-aktivációt előidéző jelátviteli kaszkád sémáját mutatja, ahol egy felsőbb szintű kináz az ERK2 aktivációs hurkát foszforilálja két helyen. A jobb oldali ábra a nem foszforilált inaktív és a duplán foszforilált aktív ERK2 szerkezetét mutatja egymásra illesztve (PDB ID: 1ERK és 2ERK). Az aktivációs hurkok vastagabban, míg az aktív kináz két foszforilált aminosava (pThr – foszfo-treonin és pTyr – foszfo-tirozin) feketével vannak kiemelve. (D147: a katalitikus HRD-hurok aszpartát aminosava).

mechanizmust, bár a kétlebenyes struktúra és az összes korábbiakban ismertetett szerkezeti elem hasonló a két kinázban. A különbségek valószínűleg az eltérő szabályozási logikából (például cAMP-érzékelés, illetve egy felsőbb szintű kináz általi foszforiláció), míg a hasonlóságok az alapvetően hasonló kémiai aktivitásból adódnak.

Az első tirozin kinázdomén-szerkezet az inzulinreceptorból származott 1994-ben, ami a szerin/treonin-kinázokéhoz (például PKA vagy ERK2) hasonló kétlebenyes struktúrát mutatott, a szubsztrátkötőhely körüli szerkezeti különbségek pedig megmagyarázták az enzim preferenciáját a nagyobb méretű tirozin oldallánc felé (Hubbard et al. 1994). 1997-ben meghatározták a c-SRC tirozin kinázszerkezét (Xu et al. 1997). A c-SRC funkcionális szempontból a sejtnövekedésben fontos: az aktivációt elősegítő mutációi gyakran vezetnek rákos folyamatokhoz (onkogén). Érdekes egyébként, hogy magát az enzimet, illetve annak a virális (v) formáját már több mint száz éve ismerjük. A v-SRC a Rous sarcoma virus (RSV) egy központi enzime, ami feltehetőleg a humán genomból megszerzett c-SRC-nek egy olyan verzióját képviseli, ami folyamatosan bekapcsolt állapotban van. Az intakt c-SRC egy többdoménes szerkezetű tirozin kináz, ahol a két extra SRC homológia-doménnek (SH2 és SH3) nagyon fontos szerepe van a tirozin kinázdomén inaktív állapotban tartásában és a ligandumfüggő aktivitás szabályozásában *(3. ábra).* Az SH2 domén a kináz C-terminálisában elhelyezkedő foszfotirozin aminosavat köti, és ez a kötődés az SH3 domén közvetítésével a tirozin kinázdomént inaktív állapotban tartja, míg a v-SRC-ben ez az aminosav fenilalaninra mutálódott. A C-terminális foszfo-aminosav defoszforilációja aktiválhatja az enzimet, de az enzim más SH2 és SH3 domént kötő ligandumok hatására is aktiválható. A SRC kináz tehát jó példája egy többdoménes felépítésű fehérjekinázoknak, amely a moduláris szerkezeti felépítéséből adódóan változatos módon szabályozható.



3. ábra. A többdoménes SRC kináz szerkezete
A bal oldali ábra az SRC kináz inaktív állapotának a szerkezetét mutatja (PDB ID: 1FMK). A tirozin kinázdomén aktivitása ebben a kompakt konformációban gátolt, de az SH3 doménhez kötődő ligandum jelenlétében vagy pTyr 527 defoszforiláció hatására a többdoménes szerkezet fellazul, és a kinázdomén aktív helyén olyan allosztérikus változások történnek, amelyek az enzim aktív állapotának kialakulását segítik elő.

A fenti példák egyrészt azt mutatják, hogy milyen szerkezeti hasonlóságok vannak a funkcionális szempontból eltérő kinázok között, de ugyanakkor rávilágítanak a szerkezetből adódó különböző lehetőségekre is: a PKA esete egy olyan példát mutat be, ahol a kinázdomén szabályozása egy regulátor alegységhez való kötődés révén valósul meg, az ERK esete a tisztán aktivációs hurkon keresztüli közvetlen, míg az SRC kináz a többdoménes szerkezetben rejlő közvetett enzimaktivitás-modulációra ad példát.

Talán a fenti három konkrét példán is látszik, hogy az 1990-es években indult biokémiai szerkezeti munka jelen-

tőségét nehéz lenne túlbecsülni. A röntgendiffrakciós eljárással meghatározott statikus, azaz egy adott konformációs állapotot bemutató szerkezetek már önmagukban is nagymértékben segítettek a működés megértésében. A különböző funkcionális állapotokban fehérjekristályosítás révén „befagyasztott" szerkezetek feltárása pedig további konkrét ismeretekkel gazdagította a kutatókat, amit kiegészítettek az atomi felbontású mozgásokra vonatkozó molekuladinamikai szimulációk. Előzetesen talán már a három ismertetett fehérjekináz esetéből is látható, hogy ezek az enzimek egyfajta molekuláris kapcsolóként működnek: kétlebenyes szerkezetük, illetve a szekvencia szintjén is felismerhető és strukturális szempontból is univerzális szerkezeti elemeik azt a célt szolgálják, hogy kis változások (például aktivációs hurokfoszforiláció vagy más fehérjékhez való kötődés) révén kerülhessenek funkcionális szempontból alapvetően eltérő szerkezeti állapotokba (aktív vagy inaktív). Az ebben a bevezető részben bemutatott három fehérjekináz természetesen csak ízelítőt adhat abból a változatosságból, amit az első kináz szerkezetének feltárásától eltelt több mint három évtized kutatásai hoztak. A Protein Data Bank (röviden: PDB; wwpdb.org vagy rcsb.org) nagyszerűen karbantartott adatbázisa a nyilvánosan elérhető fehérje-térszerkezeteknek. A könyv ábráihoz is innen vettem a szerkezeteket, amelyeket a PDB ID-jük alapján, ami egy számokból és angol betűkből álló négybetűs kód, mindenki saját maga is felfedezhet egy PDB-fájlok grafikus megjelenítésére alkalmas szoftverrel (például az interneten keresztül: rcsb.org/3d-view vagy szabadon hozzáférhető, saját számítógépre telepíthető szoftverrel: például Pymol: pymol.org). A könyv egyes fejezetei fokozatosan

ismertetik majd a fehérjekinázok szerkezetének sokszínűségét és az ebből adódó egyedi funkcionalitást, de még mielőtt ebbe belevágunk, vizsgáljuk meg azt a kérdést, hogy miért a fehérjefoszforiláció vált a jelátviteli folyamatok egyik központi kémiai mechanizmusává.

2. A FEHÉRJEFOSZFORILÁCIÓ JELENTŐSÉGE ÉS EVOLÚCIÓJA

MIÉRT A FOSZFORILÁCIÓ LETT A LEGELTERJEDTEBB FEHÉRJEMÓDOSÍTÁS A SEJTES JELÁTVITELBEN?

Többféle fehérje-poszttranszlációs módosítás létezik: foszforiláció, ubikvitináció, acetiláció, metiláció, glikolizáció, lipidmódosítások és proteolízis. Ezek a kémiai módosítások szabályozhatják a fehérjék aktivitását, befolyásolhatják kölcsönhatásaikat, és ezáltal változtathatják a fehérjék sejten belüli elhelyezkedését, s így a lokális koncentrációt. Lehetnek reverzibilisek (kétirányúak) vagy irreverzibilisek (egyirányúak), és csoportosíthatók az aminosavat módosító csoport kémiai természete alapján: fehérjeaddukt (például ubikvitin vagy SUMO-csoport), kis kémiai csoport (például acetil, metil, foszforil) vagy sokkal komplexebb molekula (például glikozil, izoprenil) hozzáadása, illetve proteolitikus hasítás.

A fehérjefoszforiláció valószínűleg a leggyakrabban használt fehérjeműködést szabályozó poszttranszlációs módosító mechanizmus az élővilágban. A fehérjékben a hisztidin, az aszparaginsav, de leginkább a hidroxilcsoportot tartalmazó oldalláncú aminosavak – azaz a szerin, treonin és a tirozin – fehérjekinázok általi módosítása fontos. A sokféle kémiai módosítás közül miért a foszforiláció terjedt el a legszélesebb

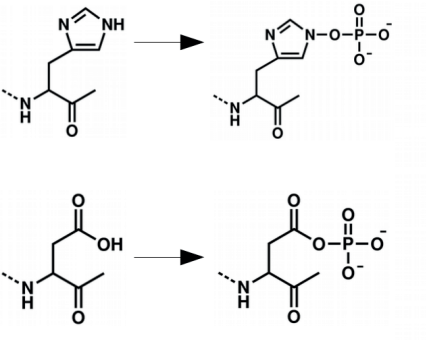
körben? A fehérjék módosítását eredményező kémiai reakció során az ATP γ-foszforilcsoportja átkerül egy fehérje-aminosavra, s mivel az ATP a sejtekben a kémiai energia széles körben használt fizetőeszköze, ezért folyamatosan újratermelődik és rendelkezésre áll az egészséges sejtekben. Másrészt a foszforilcsoport a fehérjéken egy nagy fajlagos töltéssel bíró csoport, mivel két negatív töltése is van, ami nagy hatással lehet a környező aminosavak konformációjára a másodrendű kötések befolyásolása révén.

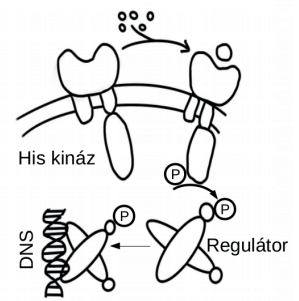
A szerin, treonin, illetve tirozin aminosavak oldalláncában lévő alkil-/arilcsoportokhoz kapcsolódó hidroxilcsoport foszforilációja észtert eredményez, ami vizes közegben, semleges pH-n stabil. Kémiailag még hat aminosav foszforilációja lehetséges: cisztein (foszfortiolát), aszpartát és glutamát (kevert anhidrid), valamint hisztidin, arginin és lizin (foszforamidát). Ezek azonban kémiailag mind bomlékonyak fiziológiás körülmények között, és az élővilágban ritkábban kerülnek alkalmazásra. A hisztidin- és aszpartátfoszforiláció azonban elterjedt az úgynevezett kétkomponensű jelátviteli rendszerekben, melyek képesek gyors választ adni sejten kívülről érkező jelek hatására: a hisztidin foszforamidát felezési ideje rövid, és a foszfo-aszpartát kevert anhidridkötése is spontán hidrolizál vizes közegben. Ez az egyszerű jelátviteli rendszer legalább két fehérjéből áll: a sejtmembránban elhelyezkedő hisztidin kinázból, ami extracelluláris ligandumkötés hatására saját magát foszforilálja, és egy citoplazmatikus regulátor fehérjéből, melyet a ligandum kötésére aktiválódó hisztidin kináz receptor egy aszparaginsavon módosít. Utóbbi működhet transzkripciós fatorként, vagy lehet más, sejtfiziológiai szempontból fontos hatása is. A két-

komponensű jelátviteli rendszerek evolúciós szempontból ősiek, a mai baktériumokban elterjedtek, de gyakoriak primitív egysejtű eukariótákban (például élesztőgomba) és növényekben is (Zschiedrich et al. 2016). A rendszer egyszerűsége abból fakad, hogy a módosított fehérje, ami jelátviteli szempontból valamilyen kitüntetett szereppel bír, spontán alakul vissza az eredeti állapotába. A rendszer általi válaszok időbeli karakterisztikáját alapesetben a kémiai elbomlás sebessége határozza meg: His-P esetében a féléletidő néhány perc, míg a Asp-P esetében néhány másodperctől akár egy óra között is változhat. A baktériumok kemotaktikus válasza is egy kétkomponensű rendszer segítségével történik, ennek során a flagellumaik mozgását szabályozzák különböző attraktánsok és repellensek hatására (Baker et al. 2006). Itt az evolúció során a rendszer jelentős mértékben módosult az alapesethez képest: a kemotaktikus receptor egy adapter fehérjén keresztül kapcsolódik egy citoplazmatikus hisztidin kinázhoz (CheA), és kifejlődik egy Asp-P specifikus foszfatáz (CheZ), ami felgyorsítja a regulátor fehérje (CheY) defoszforilációját a spontán bomláshoz képest. Az utóbbi miatt a CheA-tól érkező jelek hatékonyabban közvetíthetik a foszforiláción alapuló jeleket: a CheZ segítségével a CheY regulátor nagyobb időbeli felbontásban továbbítja a jeleket a flagelláris motorfehérje felé, mert az előbbi az alapesethez képest gyorsabban juthat vissza az aktivált állapotából az alapállapotba (*4/A ábra).*

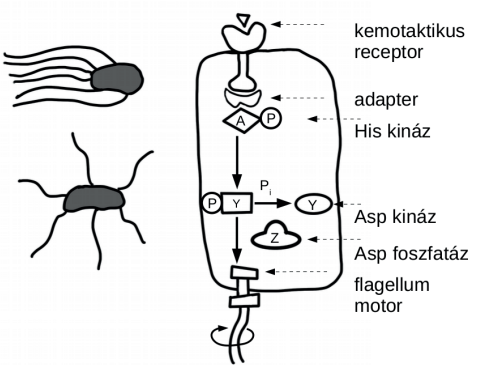
A fehérjefoszforiláció detektálása szerin/treonin, illetve tirozin aminosavakon technikailag sokkal könnyebb, mint a vizes közegben spontán elbomló foszfo-aszparaginsav vagy foszfo-hisztidin esetében. Az utóbbi típusú módosítások emlősökben ritkák, és az a néhány példa, amit ismerünk, ma

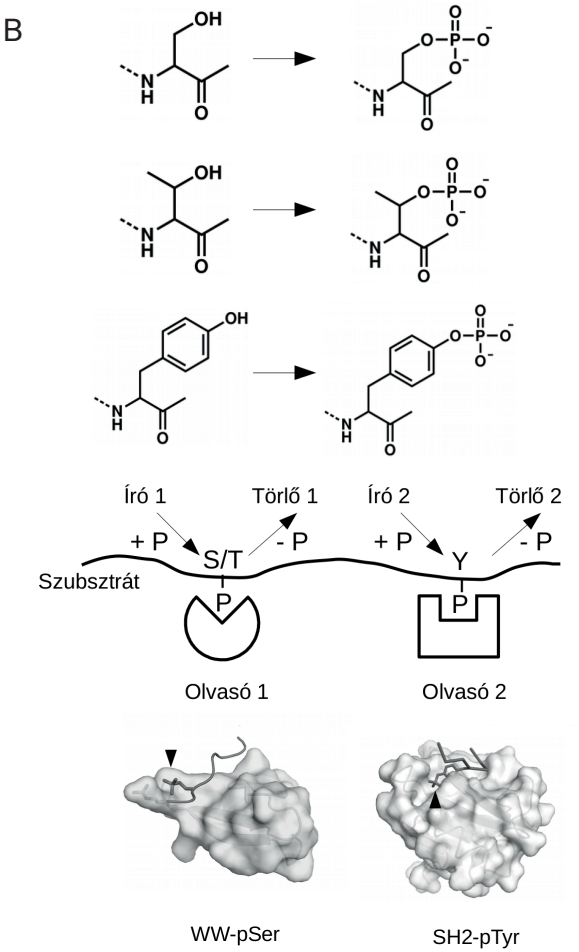
A





Génexpresszió





4. ábra. Különböző aminosavak foszforilációján alapuló jelátviteli rendszerek

A) A kétkomponensű rendszer sémája. Alapesetben a receptor ligandumkötésre a hisztidin kinázdoménjében autoaktiválódik. Ennek hatására megtörténhet a regulátor fehérje foszforilációja egy aszparaginsavon, ami aztán DNS-kötéshez és megváltozott génexpresszióhoz vezet. A bakteriális kemotaxist szabályozó rendszer ennek a kétkomponensű rendszernek egy bonyolultabb változata. Itt azonban nem a génexpresszió módosul, hanem a baktérium helyzetváltoztatásáért felelős flagellumok mozgása változik meg. Repellens jelenlétében az irányítatlan flagellummozgások úgy rendeződnek, hogy az organizmus a repellenstől távolodjon. B) A foszfo-szerin/treonin és -tirozin aminosavak fiziológiás körülmények között stabilak, ezért a kinázokon túl *(írók)* az ellenük ható foszfatázok (*törlők),* sőt a foszfo-aminosavak kötésére szakosodott domének is széles körben elterjedtek (*olvasó*: például WW domén foszfo-szerin, illetve az SH2 domén foszfo-tirozin-kötés esetében). A szerkezeti ábrák egy-egy WW és SH2 domén foszfo-peptid kötőárkát mutatják (PDB ID: 2N1O és 1TZE).

még egzotikusnak tűnik, bár az analitikai eljárások célzott fejlesztésével ez a kép a jövőben változhat (Adam & Hunter 2018). Kétségtelen azonban, hogy egyelőre a legtöbb információnk szerin/treonin, illetve tirozin aminosavakon történő foszforilációs módosításokra vonatkozóan van, és ezért a továbbiakban csak ezeket a módosításokat és hatásaikat fogom tárgyalni.

Mivel a foszfo-szerin/treonin, illetve -tirozin aminosavak stabilak, ezért az így bekapcsolt fehérjék alapállapotba hozása csak a fehérjekinázok általi foszforiláció ellené-

ben dolgozó foszfatáz enzimek segítségével történhet. Az utóbbi enzimcsoport miatt a fehérjék módosítása mégis reverzibilis lehet, és valószínűleg ez is nagymértékben hozzájárult a foszforiláció széles körű elterjedésében. Sőt, az evolúció során kialakultak olyan foszfo-aminosav-felismerésre szakosodott domének, melyek révén a foszforilált fehérjékhez való kötődés foszforilációtól függő módon történik. Információfeldolgozási analógia alapján a foszforilációs jelet létrehozó enzimeket, kinázokat tekinthetjük az „íróknak", a foszforilált fehérjékhez kötődő specifikus foszfo-aminosav-kötő doméneket az „olvasóknak", míg a fehérjék defoszforilációjáért felelős enzimeket, foszfatázokat a „törlőknek". Az író-törlő bináris rendszeren túl, ami lényegében egy irreverzibilis kémiai módosítást tesz visszafordíthatóvá enzimatikus úton, a foszforilációs jel kiolvasásáért felelős domének megjelenése – például WW, 14-3-3, FHA domének foszfo-szerin/treonin-felismerésre vagy SH2, PTB domének foszfo-szerin-/treonin-felismerésre – nagymértékben elősegíthette ennek a foszforiláción alapuló, immár háromkomponensű író-olvasó-törlő rendszernek a sikerét (Yaffe & Elia 2001, Pawson 2004) (*4/B ábra).* A tirozinfoszforiláció fehérjékben egy későbbi evolúciós újítás eredménye, és igazán elterjedt csak a többsejtű organizmusokban lett. Más oldalról, a fehérjék tirozinfoszforilációja valószínűleg elősegítette a többsejtűséghez köthető megnövekedett jelátviteli igény kielégítését, és az ősibb szerin/treonin aminosav foszforilációjára szakosodott rendszer mellett később alakult ki (Lim & Pawson 2010, Hunter 2014).

A foszfo-aminosavat felismerő domének nemcsak a foszforilált fehérjékhez való kötődés lehetősége és azok specifikus

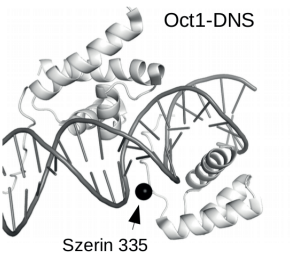
felismerése miatt fontosak, hanem azért is, mert fehérjéken belüli nagy konformációs átalakulásokat segíthetnek elő, így aktív szerepet vállalnak a fehérjekinázok által szabályozott egyéb végrehajtó (effektor) fehérjék aktivitásának a szabályozásában. Ráadásul magát a kináz aktivitását is befolyásolhatják, ahogy az SRC kináz esetében ezt már korábban láttuk. Ezt moduláris allosztériának nevezzük, mert egy önálló funkcióval bíró és szerkezeti szempontból autonóm regulátor egység, valamint moduláris, többdoménes fehérjearchitektúra szükséges hozzá. Ma már tudjuk, hogy ez a mechanizmus számos jelátviteli enzim esetében idéz elő nagy léptékű szerkezeti változásokat (Bhattacharyya et al. 2006a). Mielőtt azonban rátérnék a moduláris allosztéria jelentőségének konkrét példákon keresztül való ismertetésére, bemutatom azokat a lokális szerkezeti változásokat, melyeket a fehérjék adott helyen való foszforilálása okozhat.

Bár a fehérjefoszforiláció sokszor szerkezetileg stabil doménekben lévő aminosav pozíciókban történik, és a hatás a klasszikus allosztéria révén érthető meg, a legtöbb foszforilációs esemény mégis olyan fehérjerégiókra jellemző, melyeknek nincs jól definiálható stabil szerkezete. Ilyenek például a flexibilis hurkok vagy az alapvetően szerkezet nélküli, úgynevezett rendezetlen régiók (Iakoucheva et al. 2004). A rendezetlen régiók tartalmazzák a foszfoaminosavat felismerő kötőhelyeket, illetve gyakran vannak kitéve egyszerre többhelyes foszforilációs eseményeknek, és így az egyes foszforilációs események már önmagukban, de főleg kiegészülve más ilyen régiókra jellemző, egyéb típusú poszttranszlációs módosításokkal (például acetiláció, mono- vagy poli-ubikvitináció) együttesen dolgoznak azon, hogy

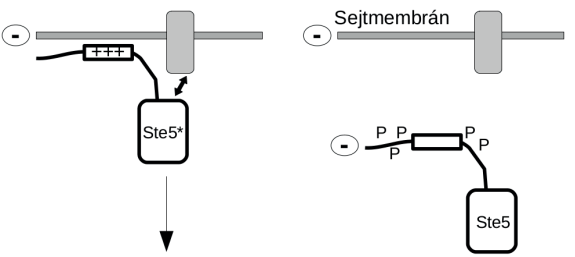
a szükséges funkcióváltoztatások hierarchikus vagy kombinatorikus módon tudjanak megvalósulni (Minguez et al. 2015).

A továbbiakban vizsgáljuk meg néhány példán keresztül, hogy a fehérjefoszforiláció milyen lokális és globális szerkezeti változásokat okozhat. A foszforilcsoport nagy fajlagos negatív töltése miatt a negatív töltésű polimerekhez/felszínekhez való kötődés foszforiláció révén közvetlenül befolyásolható. Az Oct1 nevű transzkripciós faktor a sejtosztódásban fontos hiszton 2B (H2B) gén átírását szabályozza. A kutatók már több mint 30 évvel ezelőtt megfigyelték, hogy az Oct1 DNS-kötő domén egy adott aminosavának a foszforilációja (Ser335) csökkenti az Oct1 DNS-kötését, és így a H2B mRNS átírását a DNS-ről (Minguez et al. 2015). Az Oct1-DNS komplex kristályszerkezetének meghatározása után kiderült, hogy a szerin 335 a DNS kis árkában helyezkedik el, és egy foszforilcsoport jelenléte ezen a szerin aminosavon kedvezőtlen a kötődés szempontjából a foszfo-aminosav és a negatív töltésű DNS-foszfátlánc közötti taszítás miatt (*5/A ábra).* Később aztán kiderült, hogy ez a töltések közötti taszításon alapuló közvetlen mechanizmus nem annyira elterjedt a génexpresszió szabályozásában, hanem inkább más allosztérikus, illetve a foszfo-aminosavat felismerő domének használatán alapuló közvetettebb mechanizmusok állnak a transzkripciós faktorok DNS-kötésének és transzkripciós aktivitásuk szabályozásának a hátterében. A C2H2 típusú cinkujjakat tartalmazó transzkripciós faktorok családja tartalmazza a legtöbb szekvenciaspecifikus DNS-kötő fehérjét. A cinkujjak közötti rövid köztes régió tartalmaz egy evolúciósan konzervált szekvenciát (TGEKP). Ha ez foszforilálódik az első treonin aminosaván, akkor az itt megjelenő negatív töltés bemerevíti a cinkujjban

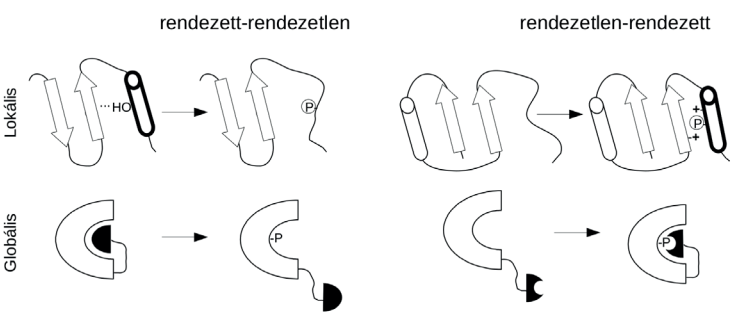
A

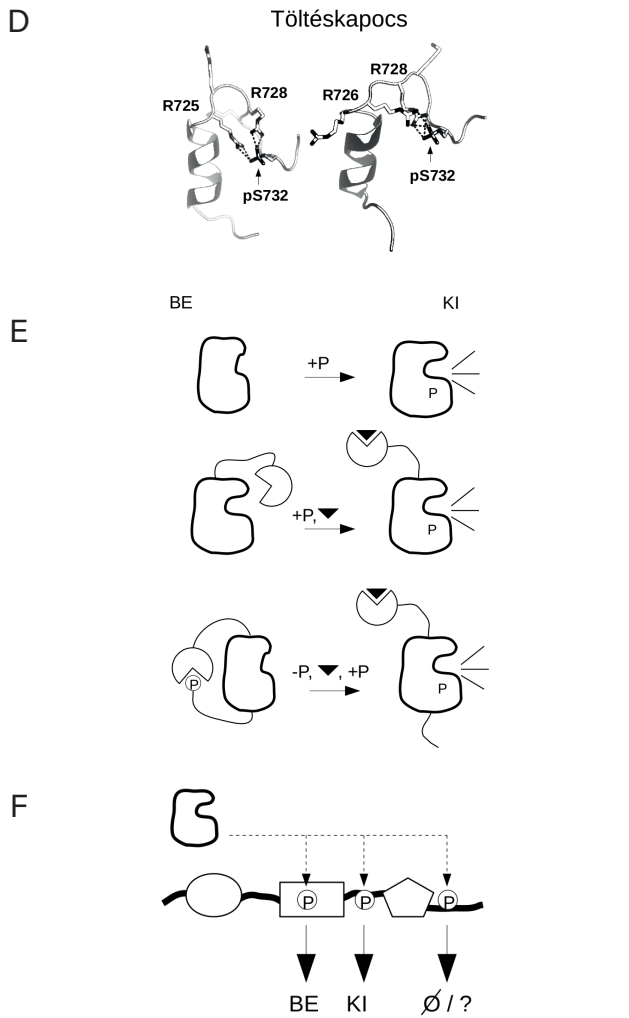

Oct1-DNS
Szerin 335

B


Sejtmembrán
Ste5*
P P P P P
Ste5

C


rendezett-rendezetlen
rendezetlen-rendezett
Lokális
Globális
HO
P



5. ábra. Fehérjefoszforiláció által okozott lokális és globális szerkezeti változások

A) Az Oct1-DNS kristályszerkezete (PDB ID:1GTO). A szerin 335 hidroxil oldallánca fekete gömbbel van jelölve a DNS kis árkában. B) A Ste5 állványfehérje sejtmembránkötődésének szabályozása az elektrosztatikus kapcsoló elve alapján. C) Fehérjefoszforiláció által indukált lokális és globális szerkezeti változások sémája. D) Tranziens, molekuláris dinamikai szimulációkkal feltárt töltéskapcsok kialakulása az RSK1 C-terminálisának rendezetlen régiójában. A közeli arginin/lizin aminosavak kötődnek a foszforilált szerin 732-höz H-kötésekkel (szaggatott vonalak). E) Foszforiláció által szabályozható egyszerű, a klasszikus allosztéria elvén működő kapcsoló (felül) és a moduláris allosztéria elve alapján működő komplexebb kapcsolók sémája. Középen: a sztérikus gátlást egy ligandkötő domén okozza, ami ligandum kötésére megszűnik, és a katalitikus domén a klasszikus allosztéria révén kapcsol be foszforiláció után. Alul: az enzim katalitikus doménje egy intramolekuláris foszfo-aminosav és kötődoménje közötti kölcsönhatás miatt gátolt, ami defoszforiláció és ligandumkötés után megszűnik. F) A foszforilációs események funkcionális hatása egy fehérjére lehet aktiváló (BE), gátló (KI), semleges (∅), vagy egyelőre ismeretlen (?).

lévő α-hélixeket (az úgynevezett elektrosztatikus hélixsapka kialakulása miatt). Mivel a hélixek közötti szerkezetileg laza kapcsoltság szükséges a hatékony DNS-kötéshez, a merevebb szerkezetű foszforilált cinkujjfehérje DNS-kötése gátolt lesz. Ez a mechanizmus hozzájárul a mitózisba lépő sejtek transzkripciós folyamatainak leállításához, mert bizonyos sejtciklus-specifikus módon működő kinázok szabályozhatják így ezt a folyamatot (Dovat et al. 2002).

A sejtmembrán a negatív töltésű foszfolipidek miatt alapvetően negatív töltésű felszín, amihez a citoplazmatikus oldal felől a perifériális membránfehérjék a foszfolipidkötésre szakosodott globuláris doménjeik mellett (például PH, C1 vagy a C2 domének) pozitívan töltött fehérjerégiók segítségével kötődhetnek. Az utóbbiak foszforilálása egyfajta elektrosztatikus kapcsolóként működhet, ami kinázok általi módosítás esetén csökkenti a sejtmembrán és a membránfehérje közötti asszociációt. Például a sütőélesztő-gomba Ste5 fehérjéje egy olyan jelátvitelt szabályozó úgynevezett állványfehérje, aminek az N-terminális rendezetlen régiója tartalmaz egy arginin/lizinben gazdag szakaszt, és a sejtciklusszabályozásban részt vevő ciklinfüggő kinázok (CDK) általi foszforilációja csökkenti a Ste5 sejtmembránhoz való kötődését (Strickfaden et al. 2007). Ez a mechanizmus nem igényel kifinomult allosztérikus szerkezeti változásokat a Ste5 fehérjében, hanem egy rendezetlen fehérjeszakasz globális töltéseloszlásának a megváltoztatása révén éri el a hatását (Serber & Ferrell 2007) (*5/B ábra).* Funkcionális logikája a módosításnak abban rejlik, hogy egy adott sejtreceptor aktivációja után a Ste5 által közvetített alsóbb szintű jelátviteli folyamatokat leállítja, mert ezek nem lennének összeférhetők azokkal a folyamatokkal, melyek a sejtciklus egy bizonyos fázisában történnek, azaz amikor egy bizonyos CDK aktív. Az ismert példák ellenére azonban valószínű, hogy a legtöbb, funkcionális szempontból releváns fehérje foszforilációs eseménye valamiféle fehérjekonformációs változást okoz, melyekről részletesebben az alábbiakban lesz szó.

A fehérjefoszforiláció könnyen okozhat lokális szerkezeti változásokat, mert az elektrosztatikus hatásokon túl a fosz-

fátcsoport a pozitív töltésű aminocsoporttal a lizin aminosavban, illetve az argininben lévő guanidinocsoporttal erős hidrogénkötéseket (H-kötés) alakíthat ki. A foszorilcsoport további H-kötéseket alakíthat ki a fehérje főlánc amid hidrogénjeivel vagy poláris aminosav oldalláncokkal is, s közvetve így még a hidrofób kölcsönhatásokra is hatással lehet. Ugyanakkor lokális hatást a foszforilcsoport úgy is elérhet, hogy elősegíti a rendezetlenségből a szerkezeti rendezettség kialakulását vagy ennek fordítottját, illetve globális hatása úgy lehet a szerkezetre, hogy a polipeptid láncon belüli foszfo-aminosav domének kötődését segíti elő (*5/C ábra).* Továbbá annak ellenére, hogy a rendezetlen fehérjeszakaszoknak nincs egy szerkezetileg jól definiált konformációja, a foszforiláció hatására megváltozhat konformációs dinamikájuk, aminek hatására pedig a környező aminosavak természetétől függő módon alakulhatnak ki α-hélixek vagy β-lemezek. A szekvenciában a foszfo-aminosavhoz képest megfelelő helyen lévő lizin vagy arginin aminosavak elősegítik úgynevezett töltéskapcsok kialakulását, amelyek még ha csupán átmenetileg is, de csökkenthetik a régió flexibilitását. Ez azután közvetett módon a fehérjén belüli vagy más fehérjékkel alkotott H-kötések kialakulását befolyásolja (*5/D ábra).* Az utóbbiak elősegíthetik vagy épp gátolhatják a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, például az RSK1 kináz C-terminális régiójának az autofoszforilációja az ERK2-RSK1 komplex szétválását segíti elő (Gógl et al. 2017). Továbbá a klasszikus allosztérikus szabályozáson túl, ahol a foszforiláció egy enzim katalitikus doménjén történik, és ez közvetlenül aktivál, a többdoménes jelátviteli enzimek aktivitása fehérjefoszforiláció révén moduláris allosztéria segít-

ségével is szabályozható. Ilyen esetben a foszforiláció klasszikus allosztérián keresztüli hatása a moduláris természetű sztérikus vagy konformációs alapú gátlás megszűnése után tud csak érvényre jutni. Az utóbbi lehetővé teszi komplex módon működő, egyszerre több bemenetre is reagálni képes molekuláris kapcsoló architektúrák kialakulását (*5/E ábra).* A foszforiláció hatása a funkcióra változatos lehet attól függően, hogy milyen fehérjében történik, illetve hogy annak melyik régiójában: aktiválhat vagy gátolhat akár enzimatikus aktivitás akár fehérje-fehérje kölcsönhatások tekintetében, illetve lehet, hogy nem okoz változást, azaz funkcionálisan semleges, vagy a hatását még nem ismertük fel (*5/F ábra).*

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a foszforiláció mint poszttranszlációs fehérjemódosítási forma azért válhatott elterjedtté, mert a foszforilcsoport az ATP-ben rendelkezésre áll a sejtekben, és a csoport egyedi kémiai tulajdonságai (például nagy fajlagos töltés és többszörös H-kötések kialakításának lehetősége) révén alkalmas fehérjék lokális szerkezetének közvetlen megváltoztatására. Ugyanezen egyedi kémiai tulajdonságainak köszönhetően kialakultak olyan moduláris domének, melyek specifikus módon képesek felismerni a foszfo-aminosavakat. Utóbbiak lehetővé tették a könnyen indukálható fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását, melyek nagy jelátviteli jelentőséggel bírnak. Továbbá a foszfo-aminosavakat felismerő moduláris domének segítségével könnyen indukálhatók globális változások a fehérjék szerkezetében, és a moduláris allosztéria révén lehetővé vált komplex molekuláris kapcsolók létrehozása. Az egyre bonyolultabb organizmusok evolúciója során a

foszforilációs információ írására, törlésére és olvasására szakosodott rendszerek segítségével egyre bonyolultabbá váltak a foszforilációt használó jelátviteli mechanizmusok. A következő fejezetben azt vizsgáljuk meg, hogy a fehérjekinázok és -foszfatázok hogyan működnek együtt a jelátviteli folyamatok fehérjefoszforiláción alapuló szabályozásában.

3. A FEHÉRJEKINÁZOK ÉS -FOSZFATÁZOK SZEREPE A SEJTES JELÁTVITELI FOLYAMATOKBAN

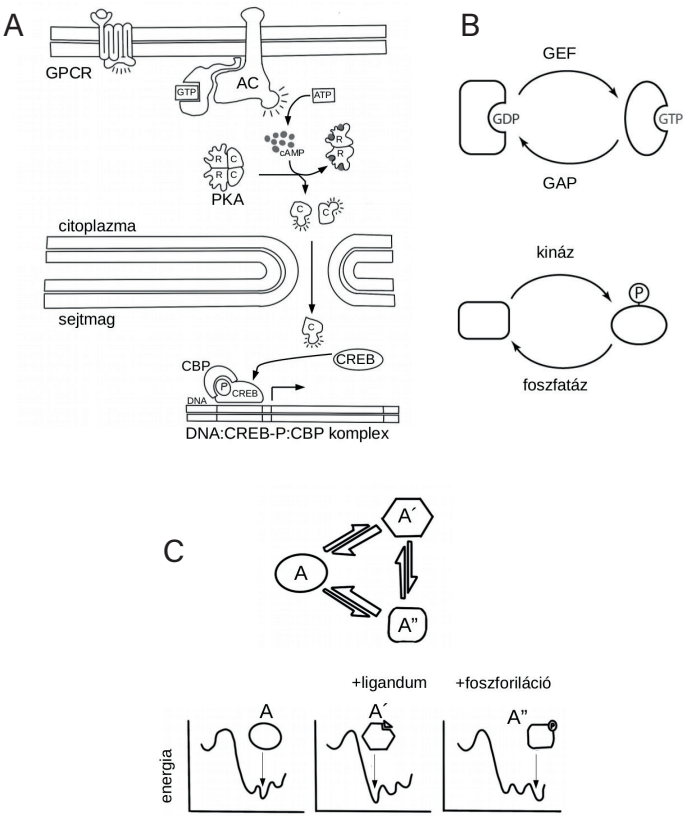
MIÉRT NINCS MINDEN KINÁZNAK EGY SEMLEGESÍTŐ FOSZFATÁZA?

A sejtekben a kinázok működésének ellenében hatnak a fehérje-foszfatázok. Mielőtt azonban a kináz-foszfatáz alapú duális szabályozási rendszert a foszfatázok oldaláról is bemutatom, röviden kitérek a génexpresszió kinázfüggő szabályozásának egy konkrét esetére. Ez alkalmas funkcionális keret lesz arra nézve, amin belül a jelátvitel szempontjából fontos, úgynevezett elemi biokémiai eseményeket pontosan definiálhatjuk, és felismerhetjük a reverzibilis (azaz a visszafordítható) biokémiai jelenségek meghatározó szerepét a sejtszintű jelátvitelben.

Egy hormon által kiváltott génexpressziós válasz többféle módon valósulhat meg a sejtmembránhoz közeli események, a citoplazmában zajló jelterjedés és végül a sejtmagban kiváltott transzkripciós válasz természete szerint. A jelpályákban azonban közös, hogy a sejten belül a fehérje-fehérje kölcsönhatások (FFK), a fehérje-másodlagos hírvivő molekula kölcsönhatások és a kovalens módosítások tekinthetők olyan elemi eseményeknek, melyeknek megváltozása révén az információ biokémiai módon kódolható enzimaktivitás és lokalizációs változások formájában. Ennek szemléltetéséhez

vegyük az adrenalinhormon hatására kiváltott CREB transzkripciós faktoron keresztüli gének átírásának szabályozását a GPCR-AC-cAMP-PKA-CREB jelpályában (GPCR: G-protein coupled receptor, magyarul G-fehérjekapcsolt receptor; AC: adenilát-cikláz; CREB: cAMP responsive element binding factor). Adrenalinkötés hatására a GPCR szerkezete megváltozik a citoplazmatikus felén, aminek hatására a membránasszociált G-fehérje a kötött GDP-jét GTP-re cseréli – a hormonkötött GPCR tehát elősegíti a G-fehérje bekapcsolását, azaz GEF-ként viselkedik (GEF: Guanine nucleotide exchange factor). Utóbbi hatására megváltozik a G-fehérje szerkezete, megköti az adenilát-ciklázt, ami a hírvivő szerepet betöltő cAMP-t állítja elő. A cAMP-PKA regulátor alegység kötődése után a PKA katalitikus alegysége bejut a sejtmagba, ahol foszforiláció révén a CREB transzkripciós aktivitását növeli meg *(6/A ábra).* A fenti folyamatban a jelek időben gyorsan juthatnak el a sejtmembrántól a sejtmagon belülre, a folyamat pedig lényegében a jelátviteli fehérjék (például receptor, köztes enzimek, fehérjekinázok, végrehajtó fehérje) szerkezeti változásainak hierarchikus módon vezényelt sorozata.

A későbbiekben a fehérjekinázok szerkezeti változásait majd részletesen tárgyalom, itt most csak a GTP-ázokat szabályozó GEF-ek és GAP-ok (GAP: GTPase activating protein) illetve a fehérjefoszforiláción alapuló szabályozás reverzibilis természetét biztosító kináz-foszfatáz rendszerek közötti érdekes párhuzamot emelem ki: a két különböző rendszer működésének közös pontja a kétirányú szabályozás *(6/B ábra).* A jelátviteli fehérjék szerkezeti tulajdonságai ugyanis lehetővé teszik, hogy molekuláris kapcsolókként működjenek, ahol a jelátviteli szempontból információt hordozó elemi



6. ábra. Reverzibilis molekuláris kapcsolók

A) A GPCR-AC-cAMP-PKA-CREB jelpályában adrenalin hatására bekövetkező információhordozó elemi események. B) GDP-GTP cserén, illetve a fehérjefoszforiláción alapuló reverzibilis biokémiai változások sémája. C) Ligandumkötés és a foszforiláció hatása a jelátviteli fehérjék szerkezeti ensemblejára az energiadiagramon.

események az egyes szerkezeti állapotok közötti átmenetek valószínűségének változtatása révén érik el a hatásukat *(6/C ábra).* A szerkezeti érzékenyítés révén a ligandumkötésből vagy a foszforilcsoport jelenlétéből eredő lokális szerkezeti változások a jelátviteli fehérjék úgynevezett ensemble, azaz sokaságszintű, dinamikus viselkedésében okoznak érdemi változásokat. Az ilyen jelátviteli molekuláris kapcsolókra tehát jellemző, hogy egy lokális szerkezeti változás az egész fehérje funkciójában tud érdemi változást indukálni (például köt egy másik fehérjét, vagy az enzim aktívvá válik).

A foszforilált Ser/Thr, illetve Tyr aminosavak fiziológiás körülmények között kémiailag stabilak. A fehérjekinázok által „beírt" információt tehát csak enzimatikus úton lehet megszüntetni, s ezt a feladatot a fehérjefoszfatázok végzik. A fehérjekinázoktól eltérően, ahol a katalitikus domén struktúrája az összes kinázban hasonló, s amiről részletesen majd a következő fejezetben lesz szó, a foszfatázok változatos szerkezetűek (Chen et al. 2017). A humán foszfatázokat 10 különböző, független szerkezeti osztályba sorolják, ami arra utal, hogy a foszfatázaktivitás evolúciós szempontból több független módon jött létre. Az ismert humán foszfatázoknak több mint a fele a CC1 osztályba tartozik, melyek tartalmazzák a tirozinfoszfatázokat és a kettős specificitású foszfatázokat, ahol az utóbbiak a foszfo-Ser/Thr és -Tyr aminosavak defoszforilációjára egyaránt képesek, illetve a PTEN család lipidfoszfatázait. A PPM (metal-dependent protein phosphatases) és a PPPL családok tagjai (például a PP1, PP2A, PP2B/calcineurin foszfatázok katalitikus doménjei) pSer/pThr-specifikusak és szerepük a jelátvitelben széles körű, míg a többiek fiziológiai szerepe korlátozottabb.

A fehérjefoszfatázokon túl léteznek jelátviteli szempontból fontos lipidfoszfatázok (például PTEN), amik a lipidkinázok segítségével (például PI3K: phosphoinositide 3-kinase) előállított másodlagos hírvivő funkcióval bíró, foszforilált lipidmolekulákat hidrolizálják. A humán foszfatóm legnagyobb része azonban fehérjefoszfatázokból áll: 189 fehérjefoszfatázt ismerünk a humán genomban, ami lényegesen kevesebb, mint a humán kinómot alkotó gének száma (538 gén) (*7/A ábra).* A kináz/foszfatáz gének aránya emberben tehát 2,85, és ez az arány 1,7 és 3,4 között van kilenc vizsgált modellorganizmusban az élesztőgombától kezdve az emlősökig. A foszfatázok tehát lényegesen kevesebb enzimmel töltik be a kinázokkal ellentétes fiziológiai szerepüket. Hogyan lehetséges ez? A válaszhoz először tekintsük át röviden az emlős kinázok csoportjait és jellemzőit, mert ezután érdekesebb lesz a foszfatázok működésének a tárgyalása is.

Az emlős kinázok első nagy csoportja az AGC nevű csoport (például PKA, B, C). A következő nagy csoport a CaMK, amelyen belül a Ca/kalmodulinfüggő kinázok családja alkotja a csoport legnagyobb hányadát. A harmadik csoport (CMGC) igen változatos. Ide sorolhatók a ciklinfüggő kinázok (CDK), a mitogénaktivált proteinkinázok (MAPK), valamint a glikogén szintáz kinázok (GSK3) családja is. Ezt a családot sokszor egyszerűen csak prolinirányított kinázoknak nevezik, mert a foszforilálandó szerin/treonin aminosavat egy prolin aminosav követi. További két nagy csoport az STE (például MAPKkat aktiváló MAPK kinázok) és a kazeinkináz 1 (CK1) szerin-/treonin-kinázcsoport.

A tirozinkinázok (TK) alkotják a következő nagy diverzitású csoportot, amit a közeli rokonságban álló tirozinszerű

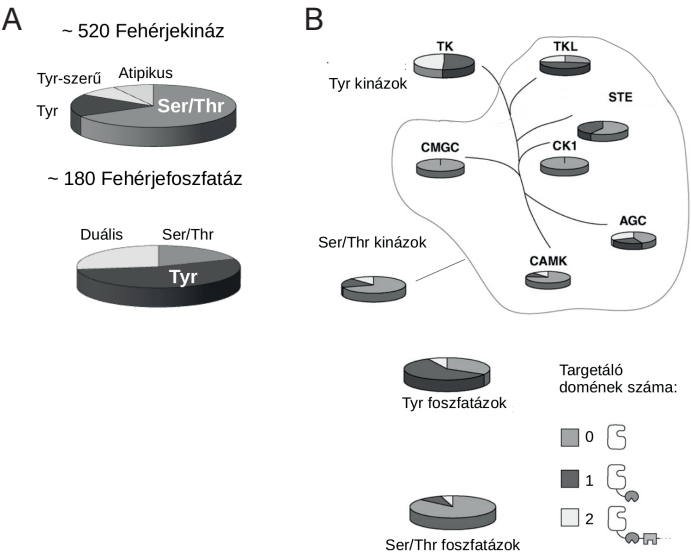
kinázok (TKL) szintén nagy csoportja követ, bár utóbbiak alapvetően Ser/Thr-kinázok. Mivel a kinázok esetében fontos tényező a szabályozhatóság, ezért jelentős hányaduk a katalitikus doménjük mellett olyan doménekkel is rendelkezik, melyeknek az aktivitásuk szabályozásában van fontos szerepük. 83 különböző ilyen doméntípust azonosítottak, melyek 258 kinázban fordulnak elő. Ezek a domének egyrészt a sejten belüli lokalizáció szabályozásával, másrészt más jelátviteli elemekhez való kötődés révén segítik a kinázok megfelelő működését. Ezek a szabályozásban fontos elemek lehetnek más fehérjék (például sejtvázfehérjék, receptorok), RNS-ek, lipidmolekulák, GTP, kalcium/kalmodulin és foszforilált tirozin oldalláncok kötését biztosító elemek (Manning et al. 2002a). Érdekes, hogy általánosságban megfigyelhető, hogy a tirozinfoszforilációban részt vevő enzimek gyakrabban tartalmaznak úgynevezett moduláris targetáló elemeket (például transzmembránrégiót vagy valamilyen fehérje-fehérje kölcsönhatásra szakosodott domént, például SH2, SH3, PDZ) (*7B ábra).*

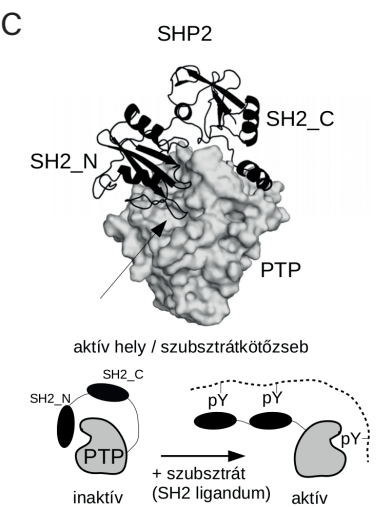
Mivel a humán fehérjefoszfatázoknak jóval kevesebb mint a fele Ser/Thr-foszfatáz, de a lényegesen több humán kináz kb. kétharmada Ser/Thr-kináz, adódik, hogy a Ser/Thr-alapú poszttranszlációs szabályozás fiziológiai enzim-szubsztrát kapcsolatai nagyon komplexek lehetnek. Sajnos egy adott foszfatázhoz köthető szubsztráthelyek száma (www.depod.org; Damle & Köhn 2019) körülbelül egy nagyságrenddel kisebb az ismert kinázfoszforilációs helyek számához képest [www.phosphosite.org; Hornbeck et al. 2015]). Továbbá az ismert foszfatáz szubsztráthelyek számának körülbelül kétharmadának ismert a kinázа, ellenben az ismert

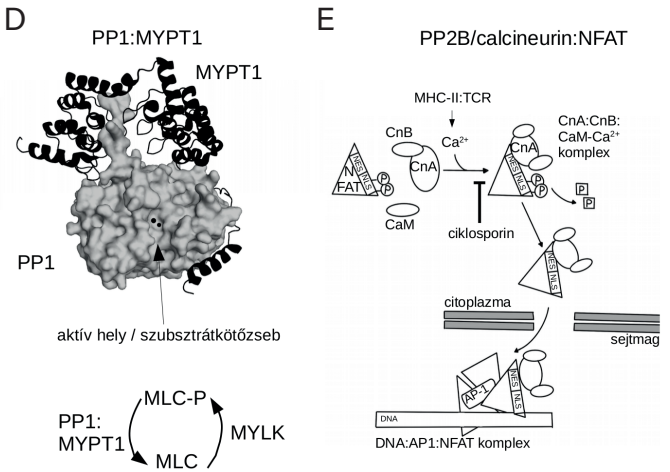
kináz-foszforilációs helyeknek jelenleg csak egy kis részének (~7%) ismert a foszfatáza (Chen et al. 2017).

A kinázok és foszfatázok számában mutatkozó lényeges különbség azonban nem jelenti azt, hogy a foszfatázok kevésbé lennének specifikusak. A kinázokhoz hasonlóan a foszfatázok is számos specificitást növelő mechanizmust használnak. A tirozinfoszfatázokban, melyek lehetnek receptor vagy nem receptor fehérjék, a tirozinkinázokhoz hasonló módon elterjedt a foszfo-aminosavat kötő domének használata, melyek erősítik a foszfatáz-szubsztrát kapcsolatokat, és ezáltal közvetve elősegítik a közelben lévő target foszfotirozin defoszforilációját. A tirozinfoszfatázok esetében tehát az aktív hely körüli szubsztrátkötőhely specificitását növelik a moduláris felépítésből adódó egyéb kiegészítő elemek (például az SH2 domének az SHP2 foszfatázban) *(7/C ábra)* (Hof et al. 1998). A PPPL Ser/Thr-foszfatázokra pedig jellemző (például PP1 vagy PP2B/calcineurin), hogy specificitásukat más regulációs fehérjékkel együttműködve, holoenzimként érik el: a katalitikus alegység promiszkus aktivitása csak az aktivitásukat, szubsztrátkötésüket és/vagy sejten belüli lokalizációjukat meghatározó alegységekkel kiegészülve kap biológiai értelmet. A kinázokhoz hasonlóan vannak specifikus és széles szubsztrátspektrumú foszfatázok is.

A pSer/pThr defoszforilációra képes foszfatáz domének száma kevesebb mint 40, míg az ellentétes aktivitással bíró Ser/Thr-kinázok száma ~420. Továbbá az ismert fehérjefoszforilációs események nagy része (~98%) Ser/Thr-foszforiláció. A PP1 és PP2B/calcineurin példáján keresztül jól szemléltethető, hogy ezek az organizmusokban csak korlátozott számban található Ser/Thr-foszfatázok egydoménes


A
~ 520 Fehérjekináz
Tyr-szerű
Atipikus
Tyr
Ser/Thr
~ 180 Fehérjefoszfatáz
Duális
Ser/Thr
Tyr
B
TK
TKL
Tyr kinázok
STE
CMGC
CK1
AGC
Ser/Thr kinázok
CAMK
Tyr foszfatázok
Targetáló
domének száma:
0
1
2
Ser/Thr foszfatázok


C
SHP2
SH2_C
SH2_N
PTP
aktív hely / szubsztrátkötőzseb
SH2_C
SH2_N
PTP
inaktív
pY
pY
pY
+ szubsztrát
(SH2 ligandum)
aktív



7. ábra. A Ser/Thr és Tyr aminosavat módosító humán enzimek változatossága

A) Ser/Thr-kinázok/foszfatázok és Tyr-kinázok/foszfatázok a humán genomban. B) A humán kinóm és foszfatóm egyes csoportjainak felépítése a katalitikus doménen felüli egyéb targetáló domének tekintetében. A kinóm nagy csoportjainak sematikus evolúciós viszonya a kinázdomének szekvenciája alapján van feltüntetve, illetve az ábra bemutatja, hogy melyik kináz- vagy foszfatázcsoportban jellemző a katalitikus doménen felüli targetáló domének megléte vagy annak hiánya. C) Tirozinfoszfatázok: többdoménes fehérjék a foszforilált szubsztrátok specifikus felismerésére szakosodott doménekkel. Az SHP2 nem receptor tirozinkináz két SH2 domént tartalmaz a katalitikus doménjén felül. Az SH2 domének moduláris allosztéria segítségével szabályozzák a foszfatáz domén aktivitását, illetve elősegítik a szubsztrátokhoz való kötődést (PDB ID: 2SHP).

D) Ser/Thr-foszfatázok esetében a katalitikus és regulációs alegységek egymással komplexet alkotva holoenzimként működnek: a PP1 katalitikus és a MYPT1 regulátor/targetáló alegység komplexének szerkezete (PDB ID: 1S70). A miozin könnyű láncát (MLC) a miozin könnyű lánc kináz foszforilálja (MYLK) és a PP1:MYPT1 komplex defoszforilálja. E) PP2B/calcineurin katalitikus alegység (CnA), a Ca^{2+} ion szintjét érzékelő CnB és kalmodulin (CaM) alegységek komplexének szerepe az autoimmun T-sejt MHC-receptorok által beindított, az NFAT transzkripciós faktor által szabályozott interleukin-2 (IL-2) expresszióban. (NES: nuclear export signal; NLS: nuclear localization signal.)

kompakt szerkezetük ellenére hogyan működhetnek specifikusan. A foszfatáz domén önmagában katalitikus szempontból hatékony enzim, de a szubsztrátkötés affinitása alacsony, s a szubsztrátok defoszforilációját más regulátor/targetáló fehérjékhez való kötődés révén éri el. A PP1 fontos szerepet játszik az izomműködésben a miozin motorfehérje könnyű láncában lévő Ser19 defoszforilációja miatt, ami az izom elernyedését okozza. Az enzim K_M-je a miozinra magas, azaz a kötés a PP1 és miozin között gyenge. A 300 aminosav hosszú PP1 katalitikus alegység azonban kötődik az 1000 aminosav hosszú miozin targetáló alegységhez (MYPT1), ami a PP1 aktivitását a miozin fehérje felé irányítja, mert a PP1 a sejtekben a MYPT1 révén a miozin közelébe kerül (*7/D ábra*) (Terrak et al. 2004). A PP1-gyel rokon PP2B/calcineurin Ser/Thr-foszfatáz szintén más fehérjékhez kötődve szabályoz jelátviteli folyamatokat. Fontos szerepe van a T-sejtek által szabályozott autoimmunitásban, ahol az NFAT (nuclear factor

of activated T-cells) transzkripciós faktor defoszforilációján keresztül citokinek (például IL-2) expresszióját szabályozza. A foszfatáz katalitikus alegysége (CnA) egy regulációs alegységgel alkot komplexet (CnB). A szervezet számára idegen antigéneket prezentáló fő hisztompatibilitási komplex (angol rövidítéssel MHC) és a T-sejt-receptorok között létrejövő sejtfelszíni kötés hatására a sejten belüli Ca^{2+} másodlagos hírvivő molekula szintje megnő. A CnA:CnB komplex aktivitását pedig a Ca^{2+}-kalmodulin komplex kialakulása és végül kötődése serkenti. Ennek hatására megtörténik az NFAT nukleáris lokalizációjáért felelős szakasz (NLS) defoszforilációja, miután a transzkripciós faktor a citoplazmából bekerül a sejtmagba, majd itt az IL-2 gén promoterén génátírást serkentő komplexet hoz létre más transzkripciós faktorokkal együtt. A szervtranszplantáción átesett páciensekben az idegen szövet kilökődésének a valószínűsége nagymértékben csökken a ciklosporin A immunszupresszáns gyógyszer hatására: a molekula a CnA:CnB:NFAT enzim-szubsztrát komplex összeállását gátolja, mert a hatóanyag abba a CnA:CnB által közösen alkotott szubsztrátkötőzsebbe kötődik, ami az NFAT foszforilált NLS szakaszának a defoszforilációjához lenne szükséges (*7/E ábra).*

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a foszfatázok által katalizált defoszforilációs és a kinázok által katalizált foszforilációs események között nincs egyenes megfeleltetés. Az egy kináz, egy foszfatáz, egy szubsztrát típusú lineáris kapcsolatok nem jellemzőek. Egy konkrét fehérje adott helyen történő módosítása ritkán történik egy adott kináz-foszfatáz pár hatására, s ennél sokkal inkább jellemzőbb, hogy egy adott hely módo-

sításában több kináz is részt vesz, amit aztán egy vagy több foszfatáz „töröl el", illetve egy adott kináz hatására létrejövő foszoriláció eltörlésére több foszfatáz is képes. Mindez egy olyan biológiai logika mentén történik, ami még a legtöbb esetben ismeretlen. Az ilyen nem lineáris, hanem kombinatorikus megfeleltetés, amit a komponensek közötti funkcionális kapcsolatokban megnyilvánuló változatosság jellemez, egyrészt a jelátviteli rendszerek evolúciója szempontjából ad egy plasztikus, kisebb változtatások/mutációk révén könnyebben evolválható megoldást, de előnyös lehet változatos jelátviteli bemenet-kimenet kapcsolatok létrehozására is, ami azután az egyre komplexebb organizmusok kialakulását segíthette elő.

4. A FEHÉRJEKINÁZOK SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE

HOGYAN MŰKÖDNEK A FEHÉRJEKINÁZOK MINT MOLEKULÁRIS KAPCSOLÓK?

A fehérjekinázok katalitikus doménje szerkezeti szempontból hasonló: a kétlebenyes, 250 aminosavat tartalmazó központi struktúra univerzális. A fehérjekinázok csoportonként változatos felépítésűek lehetnek: kompakt egydoménes szerkezetűek (például CMGC) vagy változatos doméneket és/vagy hosszú rendezetlen szakaszokat tartalmazó, többdoménes fehérjék (például AGC vagy a Tyr-kinázok). Korábban utaltam arra, hogy a fehérjekinázok molekuláris kapcsolókként működnek, azaz van aktív és inaktív állapotuk. Aktív állapotban a kináz képes ATP-t, Mg^{2+}-t, és fehérje szubsztrátot kötni, és az aktív hely körüli aminosavak olyan sztereokémiai pozíciót vesznek fel, amely lehetővé teszi az ATP γ-foszfátcsoportjának hidrolízisét és a leváló foszforilcsoport transzferét a szubsztrát target aminosavának oldalláncára. Ezek teljesüléséhez a térben jól definiált forma szükséges, és a kinázok univerzális kétlebenyes szerkezetét tekinthetjük egy olyan keretnek, amin keresztül ezek a funkciók megvalósulhatnak. Az nem zárható ki, hogy ezeket a funkciókat egy alapvetően teljesen más szerkezettel is meg lehetne valósítani, de úgy

tűnik, hogy ez a foszforilációra képes enzimek korai evolúciója során összeállt struktúra hamar rögzült, és minden fehérjefoszforilációs esemény, ismereteink szerint, ma ezen a közös szerkezeti megoldáson alapul. Ez alapján azonban nem is az az érdekes, hogy milyen az egyes kinázok aktív állapota, mert a közös felépítés és katalitikus mechanizmus miatt ez minden kinázban hasonló, hanem hogy mi a kinázok inaktív állapotának a szerkezete, s hogy ebből hogyan jön létre az aktív állapot. Az utóbbi miatt lesz igazán érdekes a kinázok inaktív szerkezeteinek a meghatározása, mert így képet kaphatunk arról, hogy az inaktív→aktív szerkezeti átalakulások hogyan történnek. Ezt az információt azután ki lehet használni specifikusabb módon működő hatóanyagok tervezésében, mert például nemcsak az aktív enzim működését lehet ATP-kompetitív inhibitorokkal gátolni, hanem az inaktív szerkezet stabilizálása révén is tarthatjuk a kapcsolót kikapcsolt állapotban.

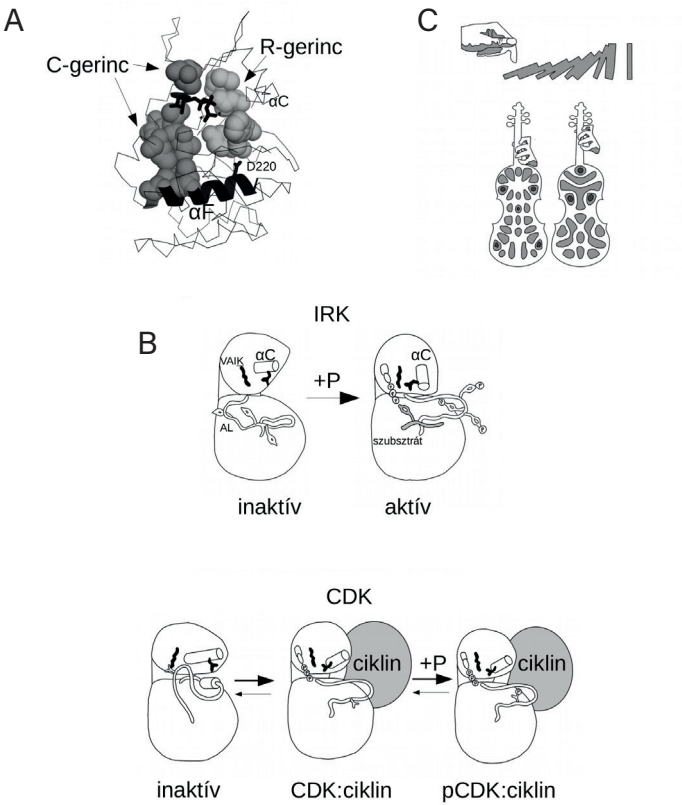
Ebben a fejezetben először azt mutatom be, hogy a kinázokban megtalálható közös szerkezeti elemek milyen szerepet játszanak az aktív állapotban, utána rátérek arra, hogy milyen közös szerkezeti megoldások vannak az inaktív→aktív átmenet szabályozására, illetve ezek hogyan egészülnek ki kinázcsoport-specifikus mechanizmusokkal. 2022-ben közel 300 humán kináznak van kísérleti alapon meghatározott szerkezete, amiket a PDB-ből (www.pdb.org) ismerhetünk. Az itt megtalálható kinázszerkezetek száma már háromezer felett jár és folyamatosan bővül. Egy adott kináz szerkezete több állapotban is ismert: apo, ATP-kötött inaktív, aktív, szubsztrát vagy inhibitor kötött. Mivel a legtöbb esetben ezek fehérje-kristályszerkezetek, melyeket röntgen diffrakciós el-

járással határoztak meg, ezért a kináz szerkezeti sokaságának csak egy-egy stacionárius, mesterségesen befagyasztott állapotát rögzítik és tárják fel. NMR-alapú dinamikai vizsgálatokkal, illetve a kristályszerkezetek által definiált végállapotból indított molekuladinamikai szimulációk segítségével azonban képet kaphatunk a kinázok dinamikai viselkedéséről is, és mint ezt látni fogjuk, az utóbbi nélkül a kinázok működésének leírása nem lehet teljes.

Az ATP-kötőárok az N- és C-terminális lebenyek között és az ezeket összekötő csukló mellett helyezkedik el. Mg^{2+} ionok az ATP-koordinálásban vesznek részt, és az enzim aktív helye és az ATP-foszfátcsoportjai között teremtenek kapcsolatot. Az ATP-kötéshez hozzájárul a konzervált és szerkezetileg flexibilis, glicingazdag G-hurok, ami az N-lebeny β1 és β2 lemezei között helyezkedik el, és aktív állapotban az ATP γ-foszfát-csoportját irányítja, míg a β3 lemezből és az αC hélixből származó lizin, illetve glutaminsav oldalláncok az ATP β- és γ-foszfát-csoportját sóhidakon keresztül orientálják. A C-lebenyből a DFG-motívum aszparaginsav oldalláncának van fontos szerepe a MgATP koordinálásában. Inaktív kinázokban a DFG szakasz az úgynevezett DFG-out konformációs állapotban van, ahol a nagy helyigényű fenilcsoport az aszparaginsav oldallánc pozíciójával cserél helyet, és ezáltal blokkolja az ATP-kötést. A DFG után következik az aktivációs hurok (angol rövidítéssel: AL; activation loop), ami az egyik legfontosabb szabályozó elem a kinázokban. A legtöbb kináz esetében az AL foszforilációja aktiválja az enzimet, aminek az az oka, hogy az enzim katalitikus HRD-hurkából az arginin aminosav kötődik az AL foszfoaminosavának foszforilcsoportjához. Ez egy olyan lokális

konformációváltozást eredményez, ami az aktív hely körüli aminosavak sztereokémiáját katalitikusan kompetens állapotba hozza, és lehetővé teszi a szubsztrát kötését az aktív hely melletti szubsztrátkötőzsebben.

A kinázok inaktív-aktív átmenetének szerkezeti alapja egy olyan konzervált mechanizmuson alapszik, melynek lényege, hogy a kétlebenyes, ATP-kötött állapotban a katalitikus domén belsejében lévő aminosavak két egymástól jól elkülöníthető, hidrofób oldalláncokból álló csoportja összeáll két párhuzamoson futó, az N- és C-lebenyre egyaránt kiterjedő doménen belüli gerincek mentén (Taylor et al. 2012) (*8/A ábra).* A katalízisben fontos C-gerincet (C: catalysis) a C-lebeny F-hélixének aminosavai, a bekötött nukleotid kofaktor adeningyűrűje, illetve a G-hurok aminosavai alkotják. Az ATP-kötés tehát szükséges a C-gerinc kialakulásához, mert a két lebeny belső hidrofób oldalláncai közötti kommunikáció csak így jön létre, de az ATP-kötés a G-hurok stabilizációja révén a két lebeny közötti kompaktabb elrendezéshez is hozzájárul. A C-gerinc összeállása azonban nem elégséges a katalízishez, ehhez a kináz belsejében a C-gerinccel párhuzamosan futó R-gerinc (R: regulatory) összeállása is szükséges. Ez utóbbi szintén mindkét lebenyből tartalmaz szekvenciálisan egymástól távol álló, de térben egymáshoz közel elhelyezkedő hidrofób aminosavakat: a C-lebenyből a DFG és HRD régiókból, míg az N-lebenyből az αC-ből és a β4-ből. Az R-gerinc teljes összeállása azonban csak az AL foszforilációját követő lokális konformációváltozás után történik meg, mert ez előmozdítja az N-lebenyből az αC és a C-lebenyen lévő foszfo-AL közeledését. Az utóbbi hatására az αC hidrofób aminosava a DFG régió hidrofób aminosavához közelít, ami



8. ábra. A kinázdomén szerkezeti felépítése

A) A C- és R-gerinc, illetve az αF helyzete a katalitikusan kompetens állapotban. A PKA kinázdoménjében az A70, V57, az ATP adeninegyűrűje, L173, I174, L172, M128, L227, M231 aminosavak alkotják a C-gerincet, míg az L106, L95, F185, Y164 az R-gerincet; az aminosavak atomjai felnagyított gömbökkel vannak ábrázolva. A C-lebeny közepén lévő αF hélixszel a C-gerinc közvetlenül, míg az R-gerinc a konzervált D220 ami-

nosavon keresztül közvetve „kommunikál". Egy-egy folytonos hidrofób C- és R-gerinc szükséges a katalitikusan kompetens állapot létrehozásához, mert így a domén N- és C-lebenyén egymástól térben távol elhelyezkedő aminosavak koordinált módon vehetik fel a szubsztrátkötéshez és a foszfotranszferhez szükséges helyzetüket. B) Az inzulin receptor kináz (IRK) és a ciklindependens kináz (CDK) aktivitásának szabályozása. Az aktív állapotra jellemző szerkezeti átalakulásokat az AL (aktivációs hurok) foszforilációja, a β3 VAIK-motívum és az αC közötti lizin-glutamát sóhíd kialakulása, a fehérje szubsztrát, illetve a ciklin kötődése segítik elő, ami végül az R-gerinc kialakulásához vezet (a ciklinek lényegében a CDK-k allosztérikus aktiváló alegységei). C) Az allosztérikus kinázaktiváció „dominó", illetve a dinamikai aspektusokat jobban magyarázó „hegedű" modellje. Az utóbbi analógia alapján a hangszer vibrációs állapotait a fogólapon a húrok eltérő lefogasával globálisan lehet változtatni, míg az előbbi analógia az ujjlökésre elindított lokális, egymást követő változtatások jelentőségét hangsúlyozza, ahogy ez egy dominósor eldöntése során történik.

végül a katalitikus hurkot (HRD) az aktivitásra nézve optimálisabb konformációba állítja. Az R- és C-gerincek tehát a két lebenyen lévő aminosavak közötti kommunikációnak teremtik meg a lehetőségét, és másodlagos kötőerők által összetartott reteszekként működnek a két lebeny között, ez pedig úgy tűnik, szükséges az aktív hely és a szubsztrátkötőzseb megfelelő térbeli struktúrájának a kialakításához. Utóbbi egy szintén fontos regulációs mechanizmus, hiszen szubsztrátkötés nélkül nem történhet meg a foszfotranszfer-reakció. Az AL után következő úgynevezett P+1 hurok is fontos szerkezeti

eleme a C-lebenynek, mert ez pozicionálja a szubsztrát target aminosava utáni aminosav oldalláncot a kötőzsebben. A P+1 hurok után következő univerzális APE-motívum pedig a teljes aktivációs hurok F-hélixhez való kihorgonyzásában játszik szerepet.

A humán fehérjekinázok két nagy csoportra oszthatóak: az eukarióta kinázok (ePK) nagyobb csoportjára és a körülbelül tízszer kisebb atipikus kinázok (aPK) csoportjára. Az ePK tagjai egymással szoros szekvenciális hasonlóságot mutatnak, és a bennük megfigyelhető 12 különböző szekvenciamotívum 12 szerkezeti aldoménnek felel meg. Az ePK-csoport tovább osztható hét nagyobb csoportra. Az aPK-szekvencia hasonlósága az ePK-val csekély, de ennek ellenére globális szerkezetük hasonló, viszont nem tartalmazzák az összes ePK-ra jellemző, evolúciósan konzervált szerkezeti elemet (például G-hurok, APE-motívum), és a HRD katalitikus hurok szekvenciája fordított, DRH, ahol inkább a hisztidin és nem az aszparaginsav tölti be a katalitikus bázis szerepét. Továbbá a két kinázcsoportban némileg eltérő a hidrofób C- és R-gerincek szerkezete (Kanev et al. 2019).

Az R-gerinc az inaktív állapotban nem áll össze, és a kináz aktivációját okozó hatások a katalitikus domén szerkezetét úgy változtatják meg, hogy a folytonos R-gerinc az ATP által kiegészített C-gerinc mellett is kialakulhat. Inaktív kinázokban az R-gerinc spontán összeszerelését gátló mechanizmusok különbözőek lehetnek. Az R-gerinc összeállása az inaktív állapotban a ciklinfüggő kinázok (CDK) családjában az αC kifordulása miatt, míg az inzulin receptor kinázban (IRK) az aktivációs hurok helyzete miatt nem történhet meg. A CDK esetében az αC helyzete a ciklin alegység kötésének

hatására megváltozik, és ez a régió lokálisan átalakul, illetve az IRK esetében az AL foszforilációja rendezi át az R-gerinc kialakulásához szükséges aminosavak helyzetét *(8/B ábra).* Összeségében tehát az R-gerinc miatt lehetnek a kinázok molekuláris kapcsolók: a belső hidrofób szerkezeti elem kialakulása a kinázt katalitikusan kompetens állapotba helyezi, míg enélkül a kináz inaktív marad.

A fentiek alapján láthatjuk, hogy az N- és C-lebenyeken átnyúló hidrofób gerincek kialakulásának meghatározó szerepe van abban, hogy a kináz aktív állapotba kerül-e vagy inaktív állapotban marad. A gerincek összeállását a kinázdomén külső részén történő események befolyásolják (például kölcsönható partner kötődése vagy az AL foszforilációs állapota). A működés szabályozásához tehát fontos megismernünk, hogy a kinázdomén felületén történő hatások hogyan terjednek a belső hidrofób gerincek felé.

Erre a struktúrán keresztül történő, atomok között zajló információterjedésre két különböző modell létezik. A „dominó"-mechanizmus alapján az aminosavak térbeli helyzetének változása az allosztérikus helytől az aktív hely felé szekvenciálisan, egy adott trajektória mentén halad. A térbeli változások trajektóriáját molekuladinamikai szimulációk segítségével ismerhetjük meg: ez a megközelítés alkalmas arra, hogy egy adott szerkezeti állapotból (például kristályszerkezet) kiindulva feltérképezzük a hőmozgásból eredeztethető szerkezeti sokaságot. A „hegedű"-modell pedig a struktúrán belüli dinamikai mozgások révén kialakuló szerkezeti sokaságokkal, illetve az azok közötti váltások lehetőségével magyarázza az allosztérikus hatásokat (Kornev & Taylor 2015). A hegedű által kiadott hang frekvenciája könnyen változtatható a ze-

nész ujjainak mozgatásával a hangszer fogólapján. Az analógia alapján a kináz külső allosztérikus helyéhez való kötődés megváltoztatja a domén hőmozgásából eredő módozatait – hasonlóan ahhoz, ahogy a zenész a hangszer belsejében kialakuló hanghullámok vibrációs állapotait az ujjával kívülről alakítja. Fontos különbség a dominó- és a hegedűmodell között, hogy míg az előbbi lokális szerkezeti változások terjedése révén próbálja magyarázni az aktív állapot kialakulását, addig az utóbbi a globális, azaz a teljes domén szintjén egyszerre történő dinamikai változások (rezgések) fontosságát és ezek megváltozását helyezi előtérbe *(8/C ábra).* A hegedűmodell alapján az allosztérikus hatások tehát a fehérjén belüli rezgési állapotok globális átrendezése révén érnek el funkcionális változást, és előidézhetnek, de nem feltétlenül indukálnak a kristályszerkezetekben detektálható szerkezeti változásokat (Ahuja et al. 2019). A ~250 aminosavból felépülő, kétlebenyes kinázdomén olyan evolúciósan konzervált struktúra, amin belül a doménszintű rezgési állapotok könnyen változhatnak. A kinázok spontán dinamikus szerkezeti állapotait NMR segítségével lehet kísérletesen vizsgálni. Ilyen mérésekkel azt találták, hogy a kinázdomén különböző helyein lévő aminosavak az inaktív állapotú, nem foszforilált ERK kinázban eltérő időskálán, azaz koordinálatlanul mozogtak, míg az aktív állapotú, foszforilált enzimben ezek a mozgások szinkronba kerültek. Ez azért volt fontos megfigyelés, mert az aktív és inaktív kristályszerkezetek csupán az AL lokális szerkezetében térnek el, ami nem magyarázza az enzim két alapvetően különböző funkcionális állapotát (Kornev & Taylor 2015).

A hidrofób C- és R-gerincek kináz aktiváció regulációban betöltött fontos szerepére csak úgy derülhetett fény, hogy a

2010-es évekre nagy számban váltak elérhetővé kinázok aktív és inaktív állapotait reprezentáló szerkezetek. Az 2000-es évek elején is rendelkezésre állt már megfelelő számú szerkezet, amelyek alapján az univerzális αC és az aktivációs hurok, illetve a kinázcsalád-specifikus, úgynevezett pszeudoszubsztrát régiók fontos szerepét már leírták (Huse & Kuriyan 2002). Utóbbiak az evolúció során járulékos módon megszerzett egyéb régiók, melyek révén a közös kétlebenyes, R- és C-gerincek összeállásán alapuló regulációs mechanizmus még tovább finomodhatott. Az ugyanis, hogy a katalízisre képes (kompetens) enzim tudja-e kötni a fehérje szubsztrátját vagy sem, természetesen alapvető a kináz jelátviteli szerepének szempontjából. A többdoménes kinázok esetében a katalitikus doménre leírt regulációs mechanizmus még kiegészülhetett sztérikus vagy konformációs alapú gátlással moduláris allosztéria révén. Mechanisztikailag az utóbbiak lényege, hogy a kinázdoménen ható univerzális inaktív→aktív átmenetet befolyásoló tényezők a teljes szekvenciájú fehérjében kiegészülnek egyéb, aktivitást gátló intramolekuláris mechanizmusokkal. A PKB aktivitását például gátolja a pleckstrin homológia (PH) doménje, ami sztérikusan blokkolja a szubsztrátok kötését mindaddig, amíg az enzim a sejtmembránhoz nem köt: az enzim tehát inaktív marad a PH domén általi sztérikus gátlás miatt annak ellenére, hogy az AL-foszforiláció és egy másik allosztérikus hely (HM-motívum) foszforilációja a kinázdoménjében már lehetővé tette az R-gerinc létrejöttét. A teljes szekvenciájú SRC tirozinkinázban pedig az R-gerinc az AL-foszforiláció után azért nem tud összeállni, mert az SH2 és SH3 domének a kinázdomén dinamikai mozgásainak közvetett befolyásolása révén ezt mindaddig

hátráltatják, amíg az SH2 és SH3 domének más fehérjékhez (például szubsztrátokhoz) nem kötnek az SRC-ben lévő belső SH2 és SH3 ligandumrégiók helyett (Huse & Kuriyan 2002).

A kinázok evolúciója során a ~250 aminosav hosszú, kétlebenyes struktúra kiegészült változatos N- és C-terminális flexibilis régiókkal. Ezek a szerkezet nélküli, járulékos szakaszok azután egyrészt elvezethettek többdoménes kinázokhoz (például SRC vagy PKB), de legtöbbször az új régiók a központi kinázdomén fontos kiegészítőivé is váltak, és lényegében megteremtették a mai ePK-csoport változatos kinázcsaládjait. Ezek a járulékos régiók további allosztérikus szabályozási lehetőségeknek teremtették meg a szerkezeti alapját. A PKA C-terminális régiója például a központi kinázdoménhez idomulva hoz létre egy új allosztérikus régiót. Az AGC kinázokra jellemző C-terminális, úgynevezett hidrofób motívum (HM) foszforilációtól függő módon szabályozza a központi kinázdomént az N-lebenyhez idomulva, és az AL-foszforilációval együtt szükséges a kináz aktív állapotához. Az Ndr/Lats kinázok N-terminális szakasza pedig a C-terminális HM-szabályzó szerepét egy újabb allosztérikus regulációs szereppel egészíti ki, mert az AGC kinázdomén aktivitását egy fehérje kofaktor (MOB) jelenlététől teszi függővé (Gógl et al. 2019a, 2015).

Összességében tehát elmondható, hogy minden aktív kináz szerkezete hasonló, de az aktív állapot lefojtására nagyon változatos – kinázcsoportonként eltérő – megoldások születtek. Ezeket a különbségeket, mint majd később látni fogjuk, a jelátviteli betegségekhez köthető fokozott kinázaktivitás specifikus gátlásában lehet kihasználni.

5. A HUMÁN KINÓM

HÁNY FEHÉRJEKINÁZA VAN AZ EMBERNEK?

Az egy organizmusból származó fehérjekinázok összességét kinómnak nevezzük. A kinázdomén központi részének vannak univerzális, konzervált elemei, melyek már a fehérje elsődleges szerkezetében, azaz a szekvenciában is felismerhetők. Sőt, az egyes kinázcsaládokon belül feltárt szerkezeti különbségek szintén azonosíthatóak a genomszekvencia szintjén is. Ez lehetővé teszi a kinázok azonosítását és csoportosítását a rendelkezésre álló genomszekvencia adataiból, így nem szükséges konkrét biokémiai vagy szerkezeti ismerettel rendelkeznünk minden újonnan azonosított géntermékre vonatkozólag. A 2000-es évek elejére már számos modellorganizmus teljes genomszekvencia-adata állt rendelkezésre, és ezek lehetővé tették a különböző organizmusokban előforduló fehérjekinázok egymással való összevetését. Az ilyen összehasonlító kinómanalízisek nagy léptékű, globális képet adnak a fehérjefoszforiláción alapuló biológiai szabályozás evolúciójáról (Manning et al. 2002b). Az élesztő, a fonálféreg, a légy és az emberi kinómok összehasonlítása során a ma rendelkezésre álló szekvenciaadatok alapján a kinázokat evolúciós szem-

pontból közeli rokonságot mutató, ortológ csoportokba lehet rendezni. Ezután megvizsgálható, hogy az ortológ csoportokba sorolt kinázok milyen jelátviteli pályákban működnek, és ott pontosan milyen funkcionális szerepet töltenek be. Egy adott organizmusban meglévő, különböző ortológ csoportokhoz tartozó kinázok összehasonlítása pedig képet ad arról, hogy a fehérjefoszforiláción alapuló biológiai szabályozás hogyan változhatott az evolúció során. Ebből dinamikus kép rajzolódik ki: az analízisből kiderül, hogy vannak minden organizmusban meglévő csoportok, de vannak olyan csoportok is, amelyek csak bizonyos organizmusban léteznek vagy jellemzőek, illetve nyomon követhető a közös csoportokon belüli kinázok számának a változása is.

A szekvenciaadatok bioinformatikai módszerekkel való analízisén túl érdekes eredményeket szolgáltattak a kinómszintű kísérletes megközelítések is. Egy adott organizmuson belül a fehérjék hány százaléka foszforilálódik? Egy adott kináz átlagosan hány szubsztrátot foszforilál? Milyen mértékű a kinómot alkotó kinázok specifitása? Ilyen típusú kérdésekre egy tanulmányban az élesztőgombában keresték a választ (Ptacek et al. 2005). Az organizmus szinte teljes proteómját lefedő 4400 génterméket fehérjechipekre nyomtatták, és ezeket egyenként 87 aktív állapotú élesztőkinázzal inkubálták radioaktív ATP jelenlétében. Az élesztőgomba összesen ~130 fehérjekinázt kódol, így a kísérletben a teljes kinóm körülbelül kétharmadára vonatkozólag kaptak információt. A kísérletekben 4200 foszforilációt detektáltak, 1325 fehérje foszforilálódott a 4400 nyomtatott szubsztrátból. Egy adott kináz által foszforilált szubsztrátok száma 1 és 256 között változott, s az átlagos szubsztrátszám 47 volt. Az utóbbi

adat arra utal, hogy sok kináz promiszkuus módon foszforilál, de ugyanakkor a szubsztrátok 73%-a kevesebb mint 3 kináz által volt módosítva. A proteómchippel való vizsgálat érdekes eredményeket adott arra vonatkozólag is, hogy egymással közeli rokonságban álló kinázok milyen szubsztrátspecificitási profillal rendelkeznek. Az élesztőgombában az emlős cAMP-függő PKA-nak három homológja van: Tpk1, Tpk2 és Tpk3. Ezek 256, 29, illetve 79 szubsztrátot módosítottak, és ezek közül csak 8 volt mindhárom kináz szubsztrátja, 39 pedig legalább kettőé. A Tpk-k által felismert szubsztrátoknak tehát közel 90%-a csak egy Tpk által volt foszforilálva, ami arra utal, hogy ebben a kinázcsaládban az egyes tagok elég magas szubsztrátspecificitási profillal rendelkeznek. Egy másik érdekes eredmény a sejtciklus szabályozásában fontos ciklinfüggő kinázokra vonatkozott. A Pho85 élesztőkináz az emlős ciklinfüggő kinázok (CDK) rokona. A Pho85 katalitikus doménje egyedül csak 12 szubsztrátot módosított, míg különböző ciklinek jelenlétében ez a szám látványosan nőtt: 4 különböző ciklinnel ez 60 és 255 közé esett, és a különböző ciklin-Pho85 komplexek szubsztrátjai között az átfedés nagyon változó volt. Ezek a proteómszintű foszforilációs adatok bemutatják, hogy a rokon kinázok jelentősége egy adott kinómon belül abban is rejlik, hogy ezek biokémiai hajlandósága adott szubsztrátok módosítására eltérő lehet, s így a szervezet szintjén változatosabb szubsztrátspecificitási profilokat tudnak kialakítani, ami természetesen nagyobb biológiai regulációs potenciált eredményez.

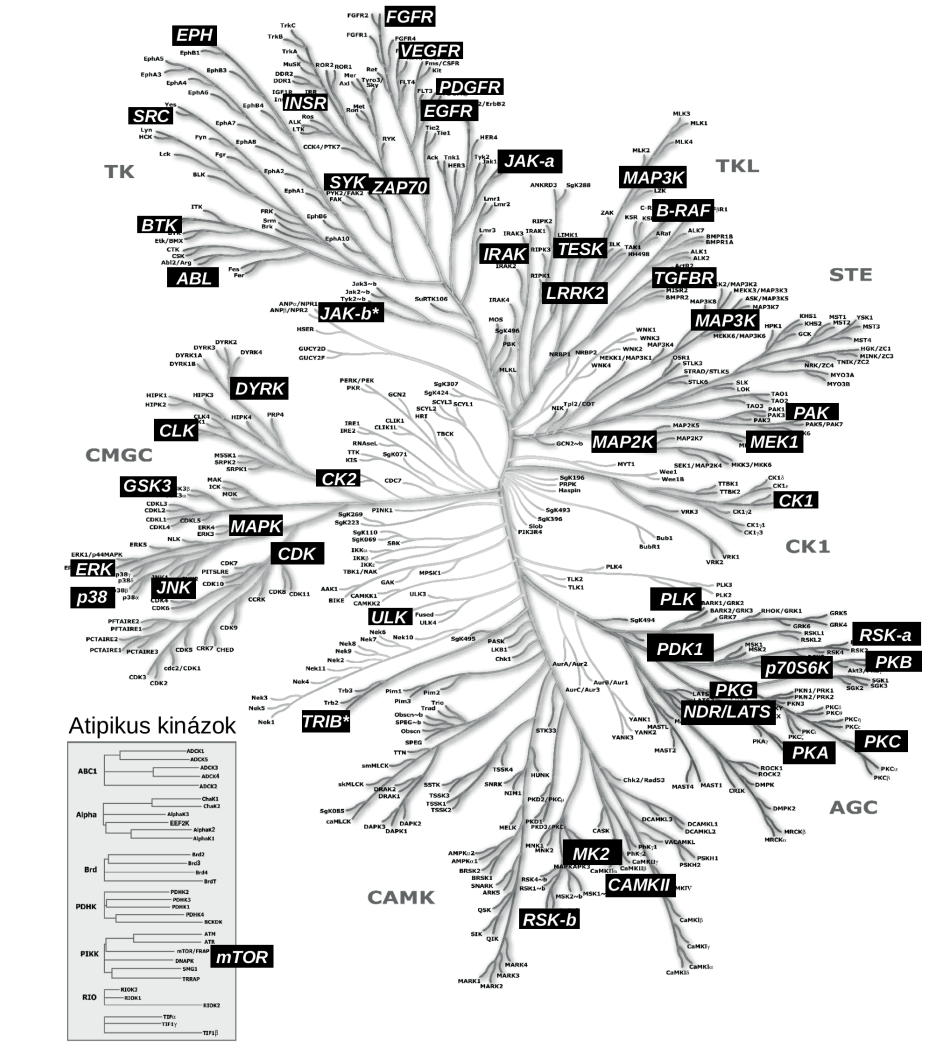
A humán genom szekvenciája alapján 2002-ben 478 tipikus és 40 atipikus fehérjekinázt azonosítottak (Manning et al. 2002a) (*9. ábra).* Ez az 518 fehérjetermék a humán fehérjék

1,7%-ának felel meg. A fehérjekinázok családja így a második legnagyobb enzimcsalád és az ötödik legnagyobb emberi fehérjecsalád a C2H2 cinkujjfehérjék (3%), a G-fehérje-kapcsolt receptorok (2,8%), a fő hisztokompatibilitási komplex fehérjék (2,8%) és a protázok (1,9%) után. A család 385 szerin-/treonin-, 90 tirozin- és 43 tirozinkinázszerű enzimet tartalmaz. A 90 tirozinkinázból 58 receptor, míg 32 nem receptor tirozinkináz. Sejten belüli elhelyezkedésük szempontjából számos kináz a sejtmembránhoz közel található, míg a legtöbb a citoplazmában vagy a sejtmagban lokalizálódik. Csupán három kináz található az endoplazmatikus retikulumban, és szintén kevés (5) a mitokondriális elhelyezkedésű.

Az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) ~130 fehérjekinázа közül 23 olyan van, aminek nincs a többsejtű organizmusokban fellelhető ortológja, viszont az ezeket magukban foglaló hét kinázcsalád a hasadó élesztőben (*Saccharomyces pombe*) is létezik, és ezek valószínűleg az egysejtűséghez kapcsolódó funkciókban vesznek részt (például külső stresszhez, sejtfalhoz, sejtciklushoz kapcsolódó válaszok). A TK- és a TKL-csoport az egysejtű élesztőben nincs jelen, az ebbe a két csoportba tartozó 90+43 kináz funkciója a többsejtűséghez köthető (például sejtdifferenciáció, egyedfejlődés, sejt-sejt kommunikáció). A fonálféregnek egyszerűbb biológiája ellenére kétszer annyi kinázа van, mint a légynek (454, illetve 234), de a különbségek nagyon egyenetlen eloszlást mutatnak az egyes kinázcsaládokban. A humán kinóm körülbelül kétszer akkora, mint a légyé vagy a fonalféregé, ha az utóbbiból levonjuk a csak néhány családban előforduló, szokatlanul nagyszámú féregspecifikus fehérjéket. Bár ez a kétszeres elemszám-növekedés több humán kinázcsaládra jel-

lemző, a növekmény erősen kinázcsalád-specifikus, és főleg olyanokra jellemző, melyek a fejlettebb emberi funkciókhoz társíthatóak (például az idegrendszer fejlődésében fontos szerepet játszó EPH-receptor tirozinkináz-családnak az emberben 14 tagja van, míg a légyben és a fonálféregben csak 1). A humán kinázcsaládok expanziójának eredete visszavezethető teljes genomduplikációs eseményekre a korai gerincesek kialakulásakor, illetve az ezt követő többgénes (úgynevezett paralogonok) vagy kisebb, akár egygénes régiók lokális tandemduplikációjára is, melyek lehetővé tették új funkciójú (paralóg) kinázok kialakulását.

Összefoglalva, a humán kinóm körülbelül 480 ePK-t és 40 aPK-t tartalmaz, s ezek összesen 134 családba és 201 alcsaládba oszthatók. Ha az ePK-kat a szekvenciájuk hasonlósága alapján számolt, filogenetikai kapcsoltságot is tükröző fa segítségével ábrázoljuk, akkor egy olyan kinómfát kapunk, amin a kinázok többsége hét nagy csoportba tömörül. A többsejtűség kialakulása után ennek a fának a nagyobb ágai (csoportok) rögzültek, de az ezeken belüli ePK-családok, -alcsaládok, illetve az aPK-k az organizmusok evolúciója során sokat változtak.


TK
TKL
STE
CMGC
CK1
AGC
CAMK
EPH
FGFR
VEGFR
PDGFR
INSR
EGFR
SRC
JAK-a
SYK
ZAP70
BTK
ABL
IRAK
TESK
MAP3K
B-RAF
TGFBR
LRRK2
MAP3K
JAK-b*
DYRK
CLK
GSK3
CK2
MAPK
CDK
ERK
p38
JNK
ULK
TRIB*
MAP2K
PAK
MEK1
CK1
PLK
PDK1
RSK-a
PKB
p70S6K
PKG
NDR/LATS
PKC
PKA
RSK-b
MK2
CAMKII
mTOR
Atipikus kinázok
ABC1
Alpha
Brd
PDHK
PIKK
RIO

9. ábra. A humán kinómfa

A humán kinázokat a fehérjekinázok katalitikus doménjének szekvenciája alapján hét nagy ePK- és plusz egy atipikus kinázcsoportba lehet osztani. A szekvenciahasonlóság alapján felrajzolt fán az elágazások és távolságok az evolúciós rokonságot is tükrözik. A könyvben megemlített kinázok helye fekete téglalapban külön kiemelve szerepel. (*: pszeudokinázok; az RSK-nak és JAK-nak két különböző kinázdoménja is van, a és b, az utóbbi esetben az egyik pszeudokináz.) Az ábra a Cell Signalling Technology, Inc (www.cellsignal.com) engedélyével, módosítás után került ábrázolásra. A kinázok neve az angol teljes név rövidítéséből származik. A legtöbb esetben ez egy mozaikszó, illetve egy betűszó, ami az eredeti név egyes szavainak a kezdőbetűiből állhat össze. PKA: protein kinase A; ERK: extracellular signal regulated kinases; IRK/INSR: insulin receptor tyrosine kinase; CDK: cyclin-dependent kinases; RSK: 90 kDa ribosomal S6 kinases, két kinázdoménjük van, RSK-a: AGC kinázdomén és RSK-b: CAMK domén; PKB: protein kinase B, másnéven AKT; PKG: protein kinase G; PDK: phosphoinositide-dependent kinase; CAMK: calcium/calmodulin-dependent kinases; CAMK II: calcium/calmodulin-dependent kinase II; CK1: casein kinase 1; CK2: casein kinase 2; MAPK: mitogen-activated protein kinases (például ERK1/2, p38α/β/γ/δ, JNK1-3, ERK5); GSK3: glycogen synthase kinase 3; CLK: CDC-like kinase; MLK: mixed lineage kinases; B-RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; PAK: p21-activated kinases; IRAK: interleukin-1 receptor associated kinases; LRKK2: leucine-rich repeat kinase 2; TGFBR: TGF beta receptors; MKK1: mitogen-activated protein kinase kinase 1, másnéven MEK1; MAP2K: MAPK kinases

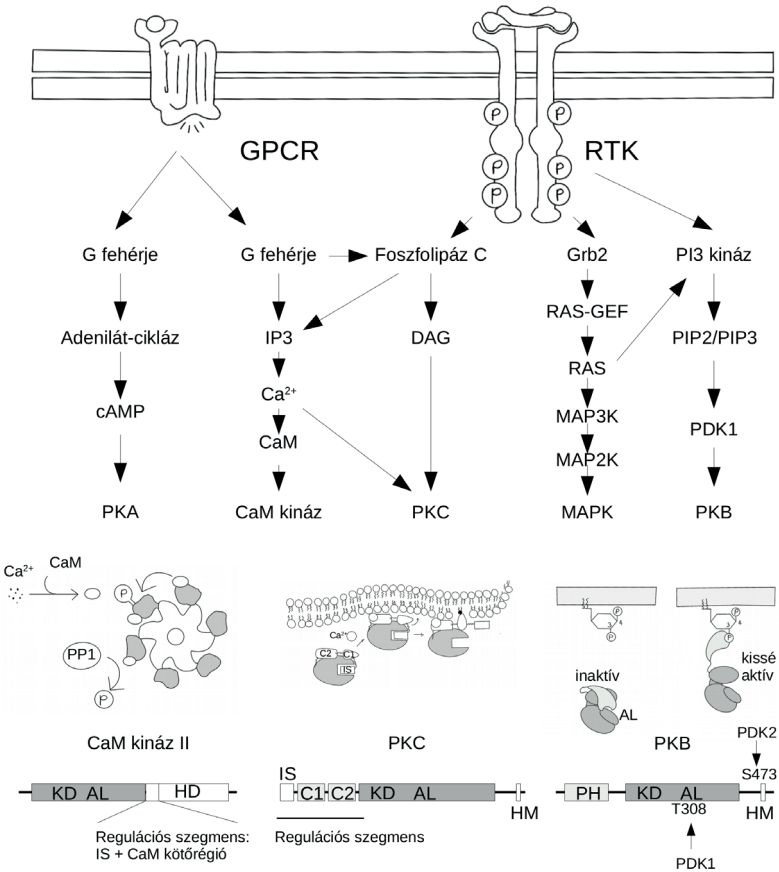
(például MKK1-7); MAP3K: MAPK kinase kinases (például B-RAF, MLK1-4, ASK, MEKK1-3); TESK: testis expressed serine kinases; DYRK: dual-specificity tyrosine-regulated kinases; ULK: unc-51 like autophagy activating kinases; TRIB: Tribbles homologs, pszeudokinázok; PLK: polo-like kinases; EGFR: epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, másnéven Erb-1/HER1; PDGFR: platelet-derived growth factor receptors; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptors; FGFR: fibroblast growth factor recpetors; EPH: ephrin receptors; JAK: janus kinases, két kinázdoménjük van, JAK-a: nem receptor tiozin kinázdomén és JAK-b: pszeudokináz-domén; ZAP70: zeta-chain-associated protein kinase 70; SRC: sarcoma; SYK: spleen tyrosine kinase; ABL: Abelson tyrosine kinases; BTK: Bruton's tyrosine kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinases; p38: p38 mitogen-activated protein kinases; MK2: MAPK activated protein kinase 2; p70S6K: 70 kDa ribosomal S6 kinases; NDR/LATS: nuclear Dfb2-related/large tumor supressor kinases; mTOR: mammalian target of rapamycin kinases. Sok kináznak van több számozott formája, például JNK1/2/3 vagy RSK1/2/3/4. Ezek különböző gének termékei és nem alternatív splicing termékek; szekvenciában és szerkezetileg természetesen nagyon hasonló fehérjék, de funkcióban különböznek.

6. SZERIN-/TREONIN- ÉS TIROZINKINÁZOK

MILYEN KONKRÉT JELPÁLYÁKBAN MŰKÖDNEK A SZERIN-/TREONIN-, ILLETVE A TIROZINKINÁZOK?

Becslések alapján a sejten belüli foszforilációs események ~98%-a Ser/Thr-kinázok aktivitásának az eredménye (p-Ser: ~85%, p-Thr: ~12%). A Ser/Thr-kinázok változatos csoportjának szigorúan szekvenciaalapú felosztása (AGC, CAMK, CK1, CMGC, STE, TKL) az egyes kinázok jelátviteli pályákban betöltött szerepére vonatkozóan nem informatív. Ezt a csoportosítást az alábbi módon egészíthetjük ki, ami még messze nem teljes, de a főbb kinázokat tartalmazza: 1. Az AGC kinázok csoportján belül kiemelhetjük azokat a kinázokat, melyeknek az aktivitását kismolekulás közvetítő molekulák szabályozzák (például PKA – cAMP, PKB – PIP2/PIP3, PKC – DAG + Ca^{2+}, PKG – cGMP, PDK – PIP3). Ezek a kinázok tehát lényegében a másodlagos hírvivő molekuláknak az érzékelői, amit az utóbbiak kötésére szakosodott moduláris doménjeikkel vagy alegységeikkel érnek el. 2. A CAMK-csoporton belüli kinázok a Ca^{2+} sejten belüli koncentrációjának a növekedését érzékelik, és lényegében a kalmodulinnal együttműködve, ennek a hírvivő ionnak a hatását fordítják át foszforilációs eseményekre. 3. A CK1 (casein kinase 1) cso-

port tagjai a Wnt jelátviteli pályában, a cirkadián ritmus és a transzkripciós faktorok sejtmag-citoplazma közötti transzportjának a szabályozásában játszanak fontos szerepet. 4. A CMGC-csoportot a sejtciklus szabályozásában fontos ciklinfüggő kinázok (CDK); a sejtnövekedést, differenciációt és sejthalált külső ingerektől függő módon szabályozó mitogénaktivált proteinkinázok (MAPK); a Wnt jelpályában és az embrionális fejlődés során fontos GSK3; valamint a pre-mRNS processzálásban és az alternatív mRNS splicingban fontos CLK alkotják. 5. A STE-csoportba olyan egymást aktiváló kinázok tartoznak, melyek a MAP kinázokat aktiválják (például számos MAP3K és az összes MAP2K), bár a csoport sok más tagja ettől eltérő és változatos funkciókban is részt vesz. 6. A TKL talán a legváltozatosabb Ser/Thr-csoport, tagjai szekvenciaszinten leginkább a tirozinkinázokhoz hasonlítanak. Ez a csoport is tartalmaz néhány MAP3K-t (például MLK és RAF), de idetartozik a patogének elleni védekezésben fontos interleukin-1 receptorasszociált kináz (IRAK) vagy az LRRK2 is. A csoport egyik érdekes tagja a TGFβ-receptor kináz, amely annyiban egyedi a Ser/Thr-kinázok között, hogy a sejtmembránban helyezkedik el és receptorként működik: extracelluláris ligandkötés hatására a citoplazmatikus kinázdoménje révén a SMAD látens transzripciós faktorokat foszforilálja (*10. ábra).*



10. ábra. Néhány Ser/Thr-kináz alapú jelpálya sémája

A PKA, CaM kináz és PKC Ser/Thr-kinázok a különböző másodlagos hírvivők érzékelői (például cAMP, CaM – kalmodulin, DAG – diacil-glicerol), melyek különböző GPCR-ek hatására termelődnek a sejtben köztes enzimek hatására (például adenilát-cikláz és foszfolipáz C). A sejtnövekedési pályákban

fontos MAPK-k és PKB a receptor tirozinkinázok (RTK) hatására lépnek működésbe. A Grb2 adapter foszfo-tirozin kötődését követő RAS-GEF rekrutáció után a RAS GTPáz beindítja a MAP3K-MAP2K-MAPK kaszkádot. A PKB bekapcsolásához szintén szükséges több felsőbb szintű kináz bekapcsolása: a PI3 kináz hatására a membránban feldúsuló foszfoinozitok (PIP2/PIP3) felszabadítják az enzimet a PH doménje általi gátlás alól. Ez azonban csak kis aktivitású enzimet eredményez, az enzim teljes aktivitásához szükséges még az aktivációs hurkán (AL) és a hidrofób motívumán (HM) való foszforiláció foszfoinozitid-függő kinázok (PDK) hatására. Az alsó ábrák a PKB mellett benutatják a CaM Kináz II és PKC sematikus működését is. A CaM kináz II egy Ser/Thr-kinázdoménből (KD), egy regulációs és egy hexamerizációs doménből (HD) áll. A regulációs szakaszban van egy inhibitor szegmens (IS), ami Ca^{2+}-CaM-kötés hiányában az enzimet gátolja. A növekvő Ca^{2+} szint a kinázdomén aktivációját növeli, aminek hatására a hexamer holoenzim egyre több alegysége tud a PP1 foszfatáz hatásának ellenére foszforilált állapotban maradni. A PKC-aktivitás szabályozása függ a C1 domén Ca^{2+} kötésétől és a C2 domén DAG-kötésétől. A PKC aktiválódása, az RTK és/vagy GPCR által beindított események révén, a megnövekedett Ca^{2+} szint és a foszfolipáz-aktivitás miatti DAG-szint-növekedés együttes hatására a sejtmembránnál válik teljessé: a pszeudoszubsztrát régió (inhibitor szegmens; IS) ebben az esetben átalakul, és a szubsztrátkötőzseb felszabadul a fehérje-szubsztrátok számára.

A fenti Ser/Thr-kinázok között vannak olyanok, amelyek nagyon egyszerű jelátviteli feladatokat látnak el. Ilyenek például a MAPK-kat aktiváló MAP2K-k, melyeknek jelenleg ismert egyedüli feladata, hogy a MAP3K-k és MAPK-k között a foszforilációs jelet közvetítsék. Biokémiai feladatuk lényegében annyiban merül ki, hogy MAP3K általi foszforilációjuk után a MAPK aktivációs hurkát egy treonin és egy közeli tirozin oldalláncon foszforilálják (például MKK1 az ERK1/2 MAP kinázokat). A MAP2K-k tehát kettős specificitású enzimek, és arra is jó példát szolgáltatnak, hogy a Ser/Thr-kinázok aminosav-preferenciája rugalmas is lehet (az STE-csoporton kívül a TKL- és a CGMC-csoportokban is vannak kettős specificitású enzimek, például TESK és DYRK, bár ezek inkább kivételnek számítanak). Más esetekben azonban a Ser/Thr kináz katalitikus doménje egy komplex reguláció központi eleme lehet. A CAMKII kináz a Ca^{2+} másodlagos hírvivővel és a PP1 foszfatázzal együtt képes egyfajta molekuláris memória kialakítására az alábbiak szerint. A CAMKII kináz teljes szekvenciája a Ser/Thr-kinázdoménen túl tartalmaz egy oligomerizációs régiót, amely révén az enzim egy hexamert alkot. A CAMKII kináz Ca/kalmodulin-kötés hatására – melyet a sejten belüli Ca^{2+} szint növekedése okoz – aktiválódik. A PP1 foszfatáz azonban a Ca^{2+} ellenében dolgozik, és egy konstans rátával defoszforilálja a CAMKII kináz aktivációs hurkát. A CAMKII hexamer struktúrája lehetővé teszi, hogy az egyes monomerek egymást aktiválják. Ha a sejten belül a Ca^{2+} szint növekedés frekvenciája meghalad egy bizonyos szintet, akkor a PP1 általi defoszforilációt túlfutja a monomerek közötti transzaktiváció, s így a CAMKII-aktiváció a hexamer struktúrájú holoenzimben a PP1 hatásának ellené-

re fenntartott marad. A CAMKII tehát képes a szubsztrátjait hosszú időn keresztül autonóm módon foszforilálni, ha a sejtfelszínről érkező jelek hatására korábban legalább egyszer a Ca^{2+} hírvivő molekula szintjének időbeli változása meghaladt egy küszöbértéket (Bradshaw et al. 2003).

A fenti csoportosításban megemlített konkrét Ser/Thr-kinázokon felül sok olyan Ser/Thr-kináz található még a humán kinómfán, amelyek nem tartoznak szigorúan véve egyik nagy csoportba sem. Ezek funkcionális szempontból szintén jelentősek, de úgy tűnik, hogy egyfajta átmenetet képeznek a nagyobb Ser/Thr-kinázcsoportok között. Az autofágia szabályozásában szerepet játszó ULK például a CAMK és CMGC ág között, míg a sejtosztódásban fontos PLK a CK1 és AGC ág között helyezkedik el.

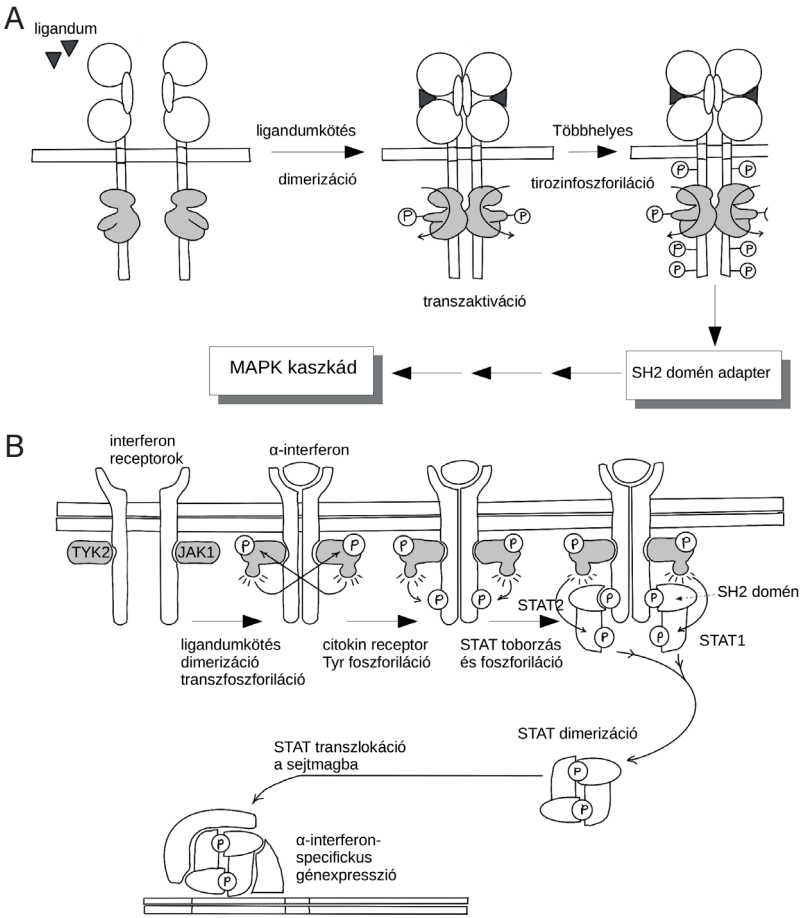
Bár a Tyr-kinázok a sejten belüli foszforilációs eseményeknek csak egy töredékét okozzák (~2%), funkcionális jelentőségük ennél sokkal nagyobb. A tirozinkinázok csoportjába emberben 90 kináz tartozik, ezek nagyobb része (58) úgynevezett receptor tirozinkináz (RTK: például EGFR, INSR/IRK, PDGFR, NGFR, FGFR, VEGFR), míg a nem receptor kinázok száma 32 (például SRC, ABL, ZAP70, JAK). Az RTK-csoport tagjai a sejtmembránban helyezkednek el és extracelluláris ligandumkötés hatására (például EGF: epidermal growth factor) dimerizálódnak és a citoplazma felőli oldalon lévő Tyr-kinázdoménjeik keresztbe foszforilálják egymást. Ennek hatására a receptor citoplazmatikus rendezetlen régiója különböző tirozin-aminosavakon foszforilálódik, melyekhez foszfotirozinkötő domének segítségével olyan fehérjék kötődnek, amelyek az RTK-aktivációt bekapcsolják az intracelluláris fehérjefoszforiláción alapuló jelterje-

désbe (*11/A ábra*). Az RTK-k számos növekedést serkentő hormon hatását közvetítik (például EGF, inzulin), és mutációik révén az extracelluláris jeltől függetlenített bekapcsolódásuk fokozott sejtnövekedéshez, akár rákhoz vezethet. A nem receptor kinázoknak nincs extracelluláris doménjük és transzmembrán régiójuk: a citoplazmában helyezkednek el szabadon, vagy membránhoz asszociált formában vannak. Az utóbbiak általában citokin- (például interleukin vagy interferon) receptorokhoz vagy az immunrendszer működésében központi szereppel bíró B-sejt- vagy T-sejt-receptorokhoz kötődnek. A felépítésük moduláris: a tirozinkináz-domén flexibilis linkerek révén kapcsolódik különböző egyéb globuláris doménekhez, melyek a kinázdomén aktivitását és az enzim szubsztrátkötését kontrollálják. A citokinreceptorhoz kötődő nem receptor kinázok egyik jó példája a Janus kinase (JAK), ami a STAT látens transzkripciós faktorok transzkripciós aktivitását tirozinfoszforiláció révén szabályozza (*11/B ábra*). A JAK az antivirális és más adaptív immunválaszok kiváltásában fontos interferonreceptorhoz kötődik, annak citoplazma felőli részéhez. Interferonkötés hatására a citokinreceptor dimerizálódik, és ennek hatására a receptorkötött tirozinkinázok egymást foszforilálják. Ezután megtörténik a receptor egyéb rendezetlen regióinak az autofoszforilációja is, ami végül az SH2 domént tartalmazó STAT (signal transducer and activator of transcription) dimerizációjához vezet, ami így bejut a sejtmagba, és serkenti az interferonválaszban részt vevő gének átírását. Az RTK-k és a citokinreceptorokhoz kötődő nem receptor tirozinkinázok aktivációja tehát sok hasonlóságot mutat, de míg az RTK-k integrált megoldást jelentenek az extracelluláris ligandumok

jelenlétének az érzékelésére, a citokinreceptorokból, nem receptor tirozinkinázokból és látens transzkripciós faktorokból felépülő hármas rendszer flexibilisebb, mert az egyes szinteken több komponensből lehet választani (ugyanis egy nem receptor kináz több citokinreceptorhoz is kötődhet, illetve több különböző STAT fehérjét is foszforilálhat). Egy másik eltérés a többlépcsős jelátviteli kaszkádokat szabályozó RTK-alapú bináris jelátvitelhez képest, ahol az RTK-aktiváció után egy további soklépcsős jelátviteli folyamat (például adapter, GTPáz, Ser/Thr-kináz kaszkád) közreműködésével történik meg a sejtmagi válasz, hogy a citokinreceptor-alapú jelátvitel az egyszerű felépítéséből adódóan inkább analóg típusú jelátvitelt eredményez, ahol a gének átírásának erőssége közel lineárisan változhat a receptor aktivációjának a mértékével.

A humán kinómfába be nem sorolható néhány atipikus kináz is fontos funkcióval rendelkezik. Ezek közül fontos megemlíteni az egymással rokon mTOR, ATM és ATR kinázokat, a PI3K-rokon nevű atipikus kinázcsaládból. Az utóbbi kettő a DNS-hibajavításban játszik szerepet, míg az mTOR (mechanistic target of rapamycin) egy sokfunkciós kináz, mely más alegységekkel kiegészülve fontos a sejtnövekedés és metabolizmus külső faktoroktól függő koordinálásában.

Összefoglalva elmondható, hogy a kinázok közötti szekvenciahasonlóság alapján egyedül nem tudjuk megbízható módon megjósolni egy kináz funkcióját, a jelátviteli pályákban betöltött konkrét szerepét. A génduplikációk utáni funkcionális diverzifikáció miatt még a kinómfa azonos ágához tartozó kinázok esetében is nagyon eltérően alakulhatnak a ro-



11. ábra. Receptor és nem receptor tirozinkináz alapú jelpályák
A) A receptor tirozinkinázok (RTK) az extracelluláris térben lévő ligandumok (például hormonok, növekedési faktorok) kötése révén dimerizálódnak, aminek hatására a citoplazmatikus régióban lévő kinázdomének aktiválódnak.

Ennek hatására megtörténik a kinázdoménen kívüli régiók tirozinfoszforilációja specifikus helyeken, melyek dokkolópontokként szolgálnak különböző SH2 domén tartalmú adapterfehérjék számára. Utóbbiak további jelátviteli fehérjék (például GEF, GAP, foszfatázok, kinázok) membránhoz való kötődését segítik elő. RTK-aktiváció gyakran eredményezi az MAPK-kaszkád bekapcsolását. B) Egy receptorasszociált nem receptor tirozinkináz alapú jelátviteli séma az α-interferon receptor-JAK-STAT rendszer példáján keresztül bemutatva. A TYK2 és JAK1 nem receptor tirozinkinázok a citokinreceptorokhoz kötve működnek. A JAK-STAT jelpályában a STAT egy látens transzkripciós faktor, ami a sejtmembránnál közvetlenül foszforilálódik, és ennek hatására jut be a sejtmagba. Az ilyen egyszerű felépítésű jelpályák alkalmasak analóg jelek továbbítására, azaz ebben a konkrét esetben a bemenettel (interferon) arányos mértékű transzkripciós válasz kialakítására. (Vannak receptorokhoz nem asszociált nem receptor kinázok is, például SRC vagy ABL, amelyek azonban inkább többlépcsős kinázkaszkádok tagjai).

kon kinázok fiziológiai hatásai. A kinázdomén szekvenciája alapján felállított szekvenciahasonlóságok talán csak abban az esetben utalnak hasonló vagy legalábbis részben átfedő funkciókra, ha a központi kinázdomén önállóan működik vagy hasonló járulékos domének kontrollja alatt áll, de ha változatos moduláris doménekkel és/vagy más fehérje alegységekkel egészül ki, akkor fiziológiai szerepe nagyban változhat. A humán kinómfa szerkezete az utóbbiról nem ad teljes képet, ezért a kinázok katalitikus doménszekvenciája alapján való csoportosítás inkább csak a különböző biokémiai re-

gulációs mechanizmusokra utal, amik a teljes szekvenciájú kinázokban újabb és újabb konkrét funkciókat nyerhetnek a sejtes élet komplex folyamatainak fehérjefoszforiláció alapú szabályozásában. A kinázok különböző típusú aminosavak foszforilációjára vonatkozó képességeik alapján történő felosztása inkább csak történeti szempontból fontos: a sejten belüli funkciók tekintetében ezek a felosztások mesterségesek, mert a Ser/Thr- és tirozinkinázokat használó jelpályák nem válnak el élesen egymástól, sőt általános, hogy ezek egy jelpályán belül keverednek, és együtt alakítanak ki egy adott biológiai választ.

7. PSZEUDOKINÁZOK

MIRE JÓK A KATALITIKUS AKTIVITÁS NÉLKÜLI ÁLKINÁZOK?

A pszeudokinázok a humán kinóm körülbelül 10%-át teszik ki, és olyan fehérjéket foglalnak magukba, melyek szerkezetükben hasonlítanak az „igazi" aktivitással rendelkező fehérjekinázokra. Lényegében defektív kinázok, melyekből hiányzik a foszfotranszfer-reakcióhoz szükséges valamelyik szerkezeti elem. Az aktív kinázok működéséhez feltétlenül szükséges három szekvenciamotívum: 1. a β3-lemez VAIK-motívumának lizin aminosava az αC-n elhelyezkedő glutamáttal együtt pozicionálja az ATP α- és β-foszfátcsoportjait, 2. a DFG-motívumból az aszpartát a Mg^{2+} ion kötését biztosítja, míg 3) a katalitikus hurok HRD-motívumának aszpartát aminosava közvetlenül a katalízisben játszik szerepet. A pszeudokinázokból hiányzik legalább egy, de akár több is ezek közül a szekvenciaelemek közül.

A különböző organizmusok kinómanalízise alapján (amelyben egyébként a pszeudokinázok száma organizmustól függő módon a teljes kinóm 10-30% között változik) hosszú ideig úgy gondolták, hogy a pszeudokinázok az aktív kinázok kialakulásához vezető evolúciós út haszontalan melléktermé-

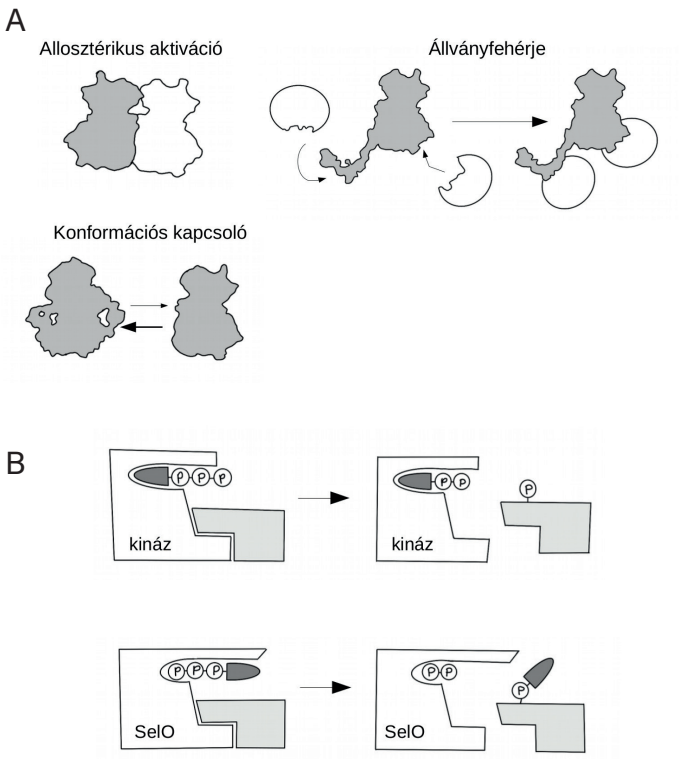
kei. Az utóbbi években azonban kiderült, hogy ez nem is lehetne messzebb a valóságtól (Mace & Murphy 2021). Először az lett gyanús, hogy a pszeudokinázok szekvenciája az „igazi" fehérjekinázokhoz hasonlóan, nagymértékű evolúciós konzerváltságot mutat, később azután számos pszeudokinázhoz sikerült konkrét biológiai funkciót is társítani. Az ilyen nem katalitikus, de mechanisztikus szempontból ugyanúgy fontos biokémiai funkcióhoz tartozik a fehérjekinázok allosztérikus aktivációja, a jelátviteli állványfehérje és a molekuláris konformációs kapcsoló szerep (*12/A ábra).*

A pszeudokinázok gyakran szabályozzák más kinázok aktivitását allosztérikus módon, ahol heterodimer-képződés hatására az utóbbiak konformációja, például az αC helyzete vagy a hidrofób gerinceket alkotó aminosavak dinamikája megváltozik. Érdekes, hogy az álkinázok sokszor képesek ATP-t kötni, és az ATP-kötés befolyásolhatja a konformációt és a szerkezeti dinamikát az „igazi" kinázokhoz hasonlóan, de itt ezt a fehérje nem a saját enzimatikus szabályozásában hasznosítja, hanem a nem katalitikus funkcióban. Ugyanakkor sok esetben az ATP-kötéshez szükséges szerkezeti elemek teljesen eltűntek, és a kofaktorkötés már nem játszik szerepet, de például az AL-foszoriláció által kiváltott szerkezeti változások regulációs szereppel bírhatnak, természetesen itt is csak a nem katalitikus funkciókra nézve. A pszeudokinázok a humán kinómfa mindegyik csoportjában előfordulnak, de konkrét biológiai jelentőségüket csak sokkal később kezdtük el felismerni a technikai szempontból könnyebben vizsgálható enzimaktivitással bíró, „igazi" kinázokhoz képest. A pszeudokinázok működésének megismerését az is nehezíti, hogy nincs olyan közös biokémiai tulajdonságuk, amely-

nek alapján egyszerűen vizsgálhatnánk őket: nem véletlen, hogy először azoknak a pszeudokinázoknak a tanulmányozása hozott érdekes eredményeket, amelyek más, „igazi" kinázok működését befolyásolják. Továbbá az „igazi" kinázok tanulmányozása során az is kiderült, hogy ezeknek az enzimeknek a fehérjefoszforiláción túl számos nem katalitikus szerepe is van, ami sokszor szintén a központi kinázdomén egyedi felépítéséből adódik (Kung & Jura 2016). Utóbbi miatt a pszeudokinázok inkább a kinázok nem katalitikus funkcióira szakosodott, kanonikus enzimfunkcióra alkalmatlan fehérjék nagyon változatos csoportjaként jellemezhetők.

A KSR1/2, HER3 és FAM20A pszeudokinázok heterodimerizáció révén aktiválnak különböző „igazi" kinázokat, sorrendben a B-RAF-et, EGFR-t és a FAM20C-t, míg a JAK-családban előforduló álkinázdomén negatív hatással van a vele szomszédos kanonikus tirozinkináz-doménre, amellyel egy flexibilis régió köti össze. A molekuláris kapcsoló/jelintegrátor szerepre pedig jó példát szolgáltat az MLKL álkináz, ami a RIPK3 általi AL-foszforiláció hatására olyan konformációs változáson megy keresztül, aminek hatására az N-terminálisan elhelyezkedő régió a felszínére kerül, oligomerizációt indukál, s végül a sejthalálnak egy kaszpázoktól független módját indítja be (az úgynevezett nekroptózist, ami a sejthalálnak a gyulladási folyamat révén beindított változata). A TRIB1/2/3 pszeudokinázokról pedig ismert, hogy állványfehérjeként működve elősegítik a COP1 E3 ubikvitin ligáz és annak C/EBP transzkripciós faktor szubsztrátja közötti fehérjekomplex kialakulását.

Talán meglepő, de a fehérjefoszforilációnak nemcsak az intracelluláris fehérjékre, hanem az extracelluláris fehérjékre nézve is lehet jelentősége. A FAM20C a Golgiban aktív



12. ábra. Pszeudokináz alapú mechanizmusok
A) A katalízisfüggetlen kinázfunkciók sémái (allosztérikus aktiváció, állványfehérje, jelátviteli konformációs kapcsoló). (A pszeudokináz sötétszürkére van színezve.) B) A klasszikus kinázok általi foszforilcsoport-transzfer és a SelO-kináz által katalizált AMP-iláció sémája. (A szubsztrát világosszürkére van színezve).

Ser/Thr-kináz, ami a biomineralizációban fontos extracelluláris fehérjéket foszforilálja. A FAM20C mutációja súlyos, a csontfejlődés elégtelenségéhez köthető, általában halálos betegséget okoz. A rokon FAM20A mutációja nem jár ilyen súlyos fenotípussal, de a fogak felületét beborító zománcréteg alulfejlettsége miatt gyenge és elszíneződött fogakat eredményez. A FAM20C önmagában gyenge aktivitású kináz, míg a FAM20A-nak nincs katalitikus aktivitása, de ATP-kötésre az utóbbi is képes. A FAM20A tehát egy pszeudokináz, ami azért nem aktív, mert az αC hélix egyik fontos aminosava glutaminsav helyett glutamin; „igazi" kinázokban ugyanis a glutamát a β3-lemez lizin aminosavával alkot fontos sóhidat, ami a katalízishez megfelelő ATP-orientáció beállításához szükséges. Érdekes, hogy amikor a FAM20A-ban ezt az aminosavat visszamutálták glutaminsavra, a fehérjéből aktív kináz lett. Hatékony zománcfehérje-foszforilációhoz a sejtekben a FAM20A és FAM20C egyaránt szükséges volt. Biokémiai kísérletekkel azután kiderítették, hogy a FAM20A és a FAM20C heterodimerizálódik, és a FAM20A kötődésének a FAM20C-re nézve allosztérikus aktiváló hatása van. Ilyen típusú együttműködésre pszeudokináz-kináz heterodimerek között már a rokon bakteriális és nyálkagomba-fehérjék esetében is találtak példát. Érdekes, hogy ez az ősi FAM20A-FAM20C heterodimer nem használ foszforilációt az „igazi" kináz bekapcsolásához, és érdekes feltételezés, hogy az ilyen kötődés okozta allosztérikus aktiváció talán egy ősi szerkezeti mechanizmust mutat be, ami aztán később elvezetett a kinázok egymás közötti AL-foszforiláción alapuló, ma már jóval elterjedtebb mechanizmusához (Cui et al. 2015).

Egy másik ősi kináz esete (SelO) azt példázza, hogy korábban inaktívnak hitt kinázokról is kiderülhet, hogy ak-

tívak, csak éppen nem úgy, ahogy ezt korábbi ismereteink alapján elvárhattuk volna. Minél többet tudunk a fehérjekinázokról, a kutatók egyre megbízhatóbb módon képesek kinázműködésre utaló szekvenciatulajdonságokat azonosítani az ismeretlen funkciójú géntermékekben. A genom egyébként eddig funkcionálisan feltáratlan, „sötét" része valószínűleg még számos pszeudokinázt tartalmaz, hiszen a humán kinómban 2002-ben azonosított kinázok száma 2020-ra, főleg az egyre hatékonyabban azonosított pszeudokinázok miatt 518-ról 634-re nőtt, bár ezeknek az újonnan leírt fehérjéknek a funkciója egyelőre alig ismert (Essegian et al. 2020). Például csak 2012-ben gondolták először, hogy a humán SelO nevű fehérje egy pszeudokináz, mert szekvenciája alapján hasonlóságot mutat a ma ismert kinázokhoz, ám hiányoznak belőle a kanonikus kinázműködéshez szükséges katalitikus elemek. Egy bakteriális ortológ kristályszerkezete valóban megerősítette a szekvencia alapján megjósolt kinázstruktúrát, azonban nagy meglepetésként érte a kutatókat, hogy az ATP-kötőzsebben a kofaktor a kanonikus kinázokhoz képest fordítva kötődött, azaz a γ-foszfát- és α-foszfát-csoport helye felcserélődött (Sreelatha et al. 2018). Később kiderítették, hogy a SelO a szubsztrátjait nem foszforilálja, hanem az AMP-csoport transzfere révén adenilálja. Miért működik ez az enzim fordítva, s mi a jelentősége az AMP-ilációnak a foszforiláció helyett? Erről ma még csak találgatni lehet. Talán mert az AMP nagyobb a foszfátcsoporthoz képest, így vele könnyebben lehet fehérje-fehérje kölcsönhatásokat módosítani, vagy mert az AMP-t nem lehet olyan könnyen eltávolítani, mint a standard foszfátcsoportot, amit a foszfatázok könnyedén lehasítanak?

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a pszeudokinázokból hiányzik valamilyen kanonikus kinázokra jellemző fontos szerkezeti elem, de ez nem jelenti azt, hogy funkció nélküli fehérjék lennének. Sőt, az eddig feltárt példák alapján azt mondhatjuk, hogy az „igazi" kinázokhoz hasonló kétlebenyes szerkezetük révén fontos nem katalitikus funkciókat látnak el (például allosztérikus reguláció, molekuláris kapcsoló vagy állványfehérje szerep). Idővel még az is megtörténhet, hogy a pszeudokinázokon keresztül újabb kinázstruktúra alapú enzimatikus képességeket fedezünk majd fel (lásd például AMP-iláció).

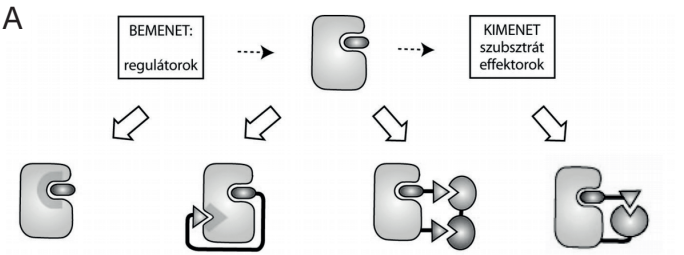
8. A FEHÉRJEKINÁZOK KÖLCSÖNHATÁSAI MÁS FEHÉRJÉKKEL ÉS EGYMÁSSAL

MILYEN KÖLCSÖNHATÁSOK BIZTOSÍTJÁK A FEHÉRJEKINÁZOK SPECIFICITÁSÁT?

A szubsztrátok módosítása természetesen szükségszerűvé teszi a fizikai kölcsönhatást a kinázok és a módosítandó szubsztrátfehérjék között. A foszforilálandó szakasz az aktív hely közelében lévő szubsztrátkötőzsebbe köt, és kialakul a Michaelis–Menten (MM) katalitikus komplex, ami a módosítás után disszociál. Bár a kinázok csoportjai között az aktív hely/szubsztrátkötőzseb targethely specificitása nagymértékben különbözhet, s vannak bázikus, savas, hidrofób vagy prolin aminosavakat preferáló targetmotívumok, a közös szerkezeti felépítés miatt a hasonló kinázok szubsztrátkötőzsebe jelentősen nem különbözik. A rokon enzimek a szubsztrátkötőzsebük alapján egyedül nem tudnának szelektív módon működni: például a prolin-irányított kinázok szubsztrátkötőzsebe a CMGC-csoportból csupán egy S/T-P-motívumot igényel, míg az AGC-kinázok egy nagy csoportja bármilyen olyan szekvenciát elfogad, ami tartalmaz egy RxxS/T-motívumot) (*13/A ábra).* Továbbá a szubsztrátkötőzseb meglehetősen sekély, ami ugyan lehetővé teszi a magas katalitikus rátát (mert a legtöbbször ren-

dezetlen régióban elhelyezkedő foszforilációs targethely így könnyen tud bekötődni, illetve a foszfo-aminosavat tartalmazó termék könnyen távozhat), de a szubsztrátok specifikus kiválasztásában hátrányt jelent. Számos fehérjekinázról azonban már régóta ismert, hogy az aktív helytől független, kiegészítő mechanizmusok révén választják ki a célfehérjéiket: nevezetesen úgynevezett dokkoló motívumokkal, moduláris doménekkel vagy állványfehérjékkel történő asszociációk révén.

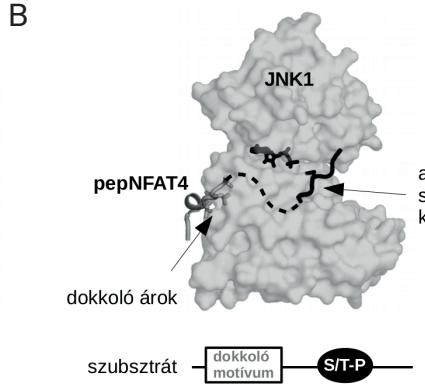
A dokkoló kölcsönhatások olyan bináris fehérje-fehérje kölcsönhatások, melyek a tranziens természetű enzim-szubsztrát kötődésen felül, attól térben elkülönülve segítik elő a kináz és a partnere közötti interakciót. Számos kinázon ismerünk olyan, a szubsztrátkötőzsebtől eltérő felszíneket, melyek a szubsztrátfehérjében lévő targethely módosítását közvetve segítik elő (Miller & Turk 2018). Eredetileg ilyen kölcsönhatásokat kináz-szubsztrát párokra írtak le, ahol az enzimreakció K_M-jének erősítése révén a szubsztrát foszforilációját teszik hatékonyabbá, de ezek az interakciók az aktivátor kinázhoz, deaktiváló foszfatázhoz vagy akár állványfehérjékhez való kötődést is elősegíthetik. Az állványfehérjék változatos interakciós doménjeik vagy lineáris motívumaik révén képesek több kinázkomponenst egyidejűleg kötni. Érdekes, hogy a humán kinómfa különböző ágaihoz tartozó kinázok eltérő módon használnak dokkoló vagy moduláris (például SH2, SH3) doméneket. A CMGC-kinázcsoportban elterjedt a dokkoló motívumokat fogadni képes kinázdoménen elhelyezkedő dokkoló árok, míg a tirozinkinázok (például SRC, ABL), de akár az AGC szerin/treonin-kinázok is moduláris doméneket tartalmaznak a legtöbb esetben (például



aktív hely / szubsztrátkötőzseb dokkoló árok állványfehérje moduláris domén

	Kináz	Targethely motívum
Bázikus	PKA	R-[RK]-x-**S**-φ
	PAK	[RK]-R-x-**S**-φ
	PKC	[RK]-[RK]-[RK]-[GR]-**S/T**-φ-[RK]-[RK]
	p70S6K	R-x-R-x-x-**S/T**
	RSK	R-x-R-x-x-**S/T**-φ
	CAMK	φ-x-R-Q-x-**S**-φ
Prolin-irányított	MAPK	[Pφ]-x-**S/T**-P
	CDK	**S/T**-P-x-[KR]
	DYRK	R-x-x-**S/T**-P
Savas	CK1	[DE]-[DE]-[DE]-x-x-**S/T**-φ
	CK2	**S/T**-[DE]-x-[DE]
	GSK3	**S**-x-x-x-pS
	PLK	[DE]-x-**S/T**-φ
	FAM20C	**S**-x-[EpS]
Tirozin	EGFR	[ED]-[ED]-[ED]-**Y**-[pYF]-x-φ
	SRC	E-E-[IV]-**Y**-[EG]-x-φ
	ZAP70	[DE]-**Y**-[Eφ]-x-φ
	ABL	I-**Y**-A-x-P

B



NFAT4-típusú motívumok
Általános definíció:
Θ – x – x – φ_L – x – φ_A – x – φ_B
Konkrét definíció:
[**RK**]-[^P]-[^P]-[**LIM**]- **L –** x- [**LIVMF**]

Konkrét előfordulások:

NFAT4	146	**R**-D-H-**L**-Y-**L**-P-**L**	153
MKK7	27	**R**-I-D-**L**-N-**L**-D-**I**	34
MKK4	41	**R**-K-A-**L**-K-**L**-N-**F**	48
CJUN	47	**K**-Q-S-**M**-T-**L**-N-**L**	42
ATF2	48	**K**-H-E-**M**-T-**L**-K-**F**	55
HSF4	206	**K**-R-K-**L**-S-**L**-M-**L**	213

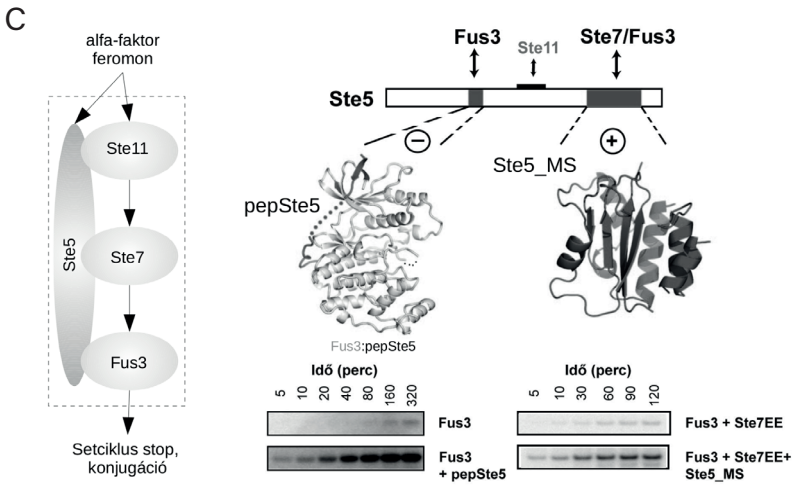
...

JIP1-típusú motívumok
Általános definíció:
Θ – φ_L – x – x – φ_A – x – φ_B
Konkrét definíció:
[**RK**]- **P** –[^P]-[^P] – **L –** x –[**LIVMF**]

Konkrét előfordulások:

JIP1	160	**R**-**P**-T-T-**L**-N-**L**	166
IRS1	857	**R**-**P**-T-R-**L**-S-**L**	863
SMTL2	184	**R**-**P**-V-S-**L**-S-**L**	190
PDE4B	73	**R**-**P**-T-T-**L**-P-**L**	79

...



13. ábra. Fehérjekinázokra jellemző fehérje-fehérje kölcsönhatás-mechanizmusok

A) Az aktív hely, dokkoló árok, állványfehérje és moduláris domén által közvetített fehérje-fehérje interakciók sémája. A legegyszerűbb esetben a foszforilálandó aminosav körüli régió kötődik a kináz aktív helyéhez, és ennek a régiónak a térbeli szerkezete határozza meg a szubsztrátspecificitást. Dokkoló kölcsönhatások esetében a kinázdomén aktív helytől elkülönülő felszíne (az úgynevezett dokkoló árok) és a szubsztrátfehérjéből származó rövid régió (úgynevezett dokkoló peptid) közötti kötődés biztosítja a kináz-szubsztrát funkcionális kapcsolat szelektivitását. Több esetben azonban a szubsztrát és az azt foszforiláló kináz csak egy harmadik fehérje (úgynevezett állványfehérje) közreműködése révén lép interakcióba. Ebben az esetben a kináz-szubsztrát pár specificitása az állványfehérjével alkotott kölcsönhatások-

ban rejlik, illetve lehetséges, hogy a fehérjekináz rendelkezik egy szubsztrátkötődést elősegítő, moduláris doménnel. Az ábra alsó részén a táblázat néhány kináz aktív hely/szubsztrátkötőzseb preferenciáját mutatja be a targetaminosav környékén (az előbbi vastagítva és aláhúzással kiemelve; S – szerin, T – treonin, S/T – szerin vagy treonin; a szögletes zárójelen belüli aminosavak egyenértékű alternatívákat jelentenek, például [RK] – arginin vagy lizin; x – bármelyik aminosav; pS – foszforilált szerin; ϕ – hidrofób aminosav). B) A MAPK dokkoló árka és az ide kötődő SLiM komplexe. A szerkezeti ábra a JNK1-pepNFAT4 komplex kristályszerkezetét (PDB ID: 2XRW) mutatja kiegészítve a szubsztrátkötőzsebbe kötődő target S/T-P-motívummal. A JNK dokkoló árka egy negatív töltésű és három hidrofób zsebből áll, melyek a dokkoló motívumok pozitív töltésű (θ), illetve hidrofób részleteit kötik (ϕ_L, ϕ_A és ϕ_B). Érdekes, hogy ebben a dokkoló árokban két különböző konformációban is köthetnek kölcsönható motívumok, s ezért léteznek NFAT4-, illetve JIP1 típusú dokkoló motívumok is. C) A Ste5 állványfehérje összetett szerepe az élesztő konjugációs jelpályájában. A Ste5 állványfehérje a Ste11 MAPKKK kötő régión kívül két jól elkülöníthető funkcióval rendelkező kölcsönható régiót tartalmaz: pepSte5 és Ste5_MS. Előbbi szerkezete Fus3-mal komplexben a bal oldalon, míg az utóbbi szerkezete a jobb oldalon látható. A pepSte5 allosztérikus módon növeli Fus3 autoaktivitását, ami azonban a jelpálya aktivitását negatívan befolyásolja *in vivo* (-) (lásd szöveg). Ugyanakkor intakt Ste5_MS domén szükséges a Ste7 általi hatékony Fus3-foszforilációhoz, ez a domén tehát a jelpálya aktivitását növeli (+). (Az ábra alsó panelje Fus3-foszforiláció nyomon követésére alkalmas ^{32}P autoradiogrammokat mutat. Ezekben az in

vitro kináz esszékben tisztított rekombináns fehérjekomponenseket kevertek össze, majd a MAPK foszforilációját időben követték nyomon. Az egyes fehérjék a sejten belüli becsült koncentrációban (1 μM) voltak jelen. Ste7EE: a MAPKK egy konstitutív aktív formája, mely a Ste11-foszforilációtól függetlenül is aktív).

PH domén – PKB, C1 és C2 domén – PKC). Ezekben az interakciókban a kinázok globuláris doménjein lévő kötőárkok mellett az ezekhez kötődni képes, a fehérjék rendezetlen szakaszaiban elhelyezkedő, rövid lineáris motívumoknak (angolul short linear motifs; SLiM) van fontos szerepük, melyek egyébként a foszfatáz-szubsztrát kölcsönhatásokban is elterjedtek (Reményi et al. 2006). Az ilyen fehérje-peptid típusú kölcsönhatások egyik jó példája a mitogénaktivált proteinkinázok (MAPK) dokkoló árkába kötődő D-motívumok szerepe a szubsztrátok kötésében (D mint dokkoló). Az NFAT4 transzkripciós faktor a JNK1 kináz természetes szubsztrátja, és az NFT4-ben lévő D-motívum kölcsönhatása (K_D ~ 5 μM) a JNK1-gyel elősegíti a szubsztrát S/T-P targetszerkvenciájának foszforilációját. Ez utóbbi így könnyebben tud a JNK1 sekély szubsztrátkötőzsebéhez kötni a megnövekedett lokális koncentráció miatt (a targetmotívum affinitása a szubsztrátkötőzsebhez ugyanis önmagában kicsi; K_M ~ 100 μM) (*13/B ábra).*

A jelátviteli állványfehérjék használata elterjedt az egysejtű eukariótáktól kezdve az emlősökig. Az első jelátviteli állványfehérjét 1994-ben genetikai módszerekkel azonosították az élesztőgombában (Choi et al. 1994). A *Ste5* gén kiütése élesztőben ugyanis sterilitást okoz, azaz az a-típusú

haploid sejtek képtelenek az α-típusú sejtek által kiválasztott feromon érzékelésére, amely egyébként egy GPCR-t aktivál és egy MAPK jelpályát kapcsol be, ami végül a két eltérő genotípusú haploid sejt konjugációjához vezet. A fentiek miatt az a-típusú sejtek nem tudnak összenőni az α-típusú sejtekkel, így nem indul be a két sejt összeolvadásával kezdődő diploid genetikai program. A *Ste5* gén random mutagenezise révén sikerült kideríteni, hogy ez a fehérje a GPCR aktivációja után aktiválódó háromszintű MAPK-kaszkád mindegyik tagját köti (Ste11, Ste7 és Fus3). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy ez az állványfehérje más később azonosított további hasonló fehérjékhez hasonlóan csupán passzív módon segíti a fehérjekinázok közötti információáramlást, mert a MAPK-modul több komponensének egyidejű kötése eleve segítheti a jelterjedést az egymást aktiváló fehérjekinázok lokális koncentrációjának növelése révén is (Zeke et al. 2009). Később azonban sikerült bizonyítani, hogy állványfehérjék ennél sokkal érdekesebb módon is képesek jelpályák aktivitását modulálni, bár alapvető tulajdonságuk, hogy több egymásra ható kinázt egyszerre kötnek (Alexa et al. 2010).

A Ste5 állványfehérje működésének megértéséhez vezető kalandos út egyik első lépése annak kiderítése volt, hogy a fehérje melyik része kötődik a Fus3 MAPK-hoz. *In vitro* fehérje-fehérje interakció detektálásán alapuló kísérletekben azt találták, hogy egy kb. 30 aminosav hosszúságú Ste5 peptid (pepSte5) nagy affinitással képes Fus3-at kötni (Bhattacharyya et al. 2006b). Érdekes módon a peptid allosztérikus módon aktiválta a Fus3-at *in vitro*. A Fus3-pepSte5 komplex kristályszerkezete fényt derített ennek a szokatlan jelenségnek a molekuláris mechanizmusára. A pepSte5 a kináz mindkét le-

benyéhez egyidejűleg kötődik, s valószínűleg a két lebeny közötti dinamikus mozgásokat módosítja oly módon, hogy az a MAPK autoaktivációját eredményezi. A Fus3-pepSte5 kristályszerkezet birtokában lehetővé vált az állványfehérje által generált allosztérikus jelenség vizsgálata *in vivo*. A Ste5 génjének megváltoztatása révén olyan élesztőtörzseket állítottak elő, amelyek a pepSte5 régióba bevitt mutációk révén megszüntették a Fus3-pepSte5 interakciót. Így ezekben a törzsekben a Ste5 által közvetített allosztérikus aktiváció hiányzott, de meglepő módon α-faktor stimulációja után mégis lényegesen nagyobb konjugációs aktivitást mértek. További kísérletekkel aztán bebizonyították, hogy a Ste5 által közvetített allosztérikus MAPK-aktiváció a konjugációs pályán belüli negatív visszacsatolás (feedback) generálásában fontos. Ez a pályaaktivitást negatív módon befolyásolja, s megszüntetése a mutáns törzsekben végső soron a teljes pálya aktivitásnövekedését eredményezte (Bhattacharyya et al. 2006b). Érdekes, hogy egy ilyen feedback mutáns élesztőtörzs képtelen volt az α-típusú konjugációs partner jelenlétét érzékelni, s annak irányába nyúlványt növeszteni az α-faktor grádiens érzékelésében mutatott hiányossága miatt (Malleshaiah et al. 2010). A továbbiakban a Ste5 fehérje MAPKK→MAPK (Ste7→Fus3) információátvitelben játszott szerepének felderítését vizsgálták. Ez az a terület, ahol a dokkoló és állványfehérjék által közvetített fehérje-fehérje kölcsönhatások jelentősége a pályák szelektív jelterjedésében talán a legjobban tetten érhető. Érdekes, hogy az úgynevezett fonalas növekedésért felelős program és a konjugációs MAPK-pálya ugyanazt a MAPKK-t (Ste7) tartalmazza. Kísérletekkel bizonyítható, hogy Ste7-aktiváció után a fonalas növekedést beindító MAPK (Kss1)

foszforilálása csupán intakt dokkoló kölcsönhatást igényel, és állványfehérje jelenlétére nincs szükség (Good et al. 2009). Ez élesen különbözik a konjugációs MAPK (Fus3) esetétől: a Fus3 foszforilásához az intakt dokkoló kölcsönhatás a Ste7-tel nem elégséges, de szükséges feltétel. A Ste7→Fus3 információátvitel a Ste5 jelenlétét is igényli. Ez genetikai alapú *in vivo* kísérleteken kívül bemutatható tisztított, rekombináns fehérjekomponensekkel is *in vitro*. Egy MAPK-aktivitás detektálásán alapuló módszer segítségével megállapították, hogy a Ste7→Fus3 foszforiláció közvetítéséhez szükséges Ste5 régió egy ~200 aminosavat tartalmazó globuláris elem (Ste5_MS: Ste5_MiniScaffold). Ennek a doménnek a szerkezetét szintén meghatározták, és további kísérletek során azt találták, hogy a Ste5_MS egyaránt képes Ste7-hez és Fus3-hoz is kötődni. A Ste7-Fus3-Ste5_MS tehát egy olyan fehérjekomplex, amelyben dokkoló és állványfehérje kölcsönhatások egymással együttműködve hoznak létre egy produktív MAPKK-MAPK enzim-szubsztrát komplexet (Good et al. 2009) (*13/C ábra).*

A kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata nemcsak az enzimek specifikus működésének a megértéséhez fontos, hanem a kinázalapú jelátviteli hálózatok evolúciójának megértéséhez is elengedhetetlen. A regulációs hálózatok az evolúció során egyre összetettebbé válnak, mert az információfeldolgozó kapacitásra való igény egyre növekszik. A gének kifejezéséért és a sejten belüli jelátvitelért felelős rendszereket leegyszerűsítve leírhatjuk mint transzkripciós faktorokból, illetve fehérjekinázokból álló hálózatokat, melyeket azután gráfelméleti szempontból is lehet elemezni. Ha ezeket a hálózatokat mint gráfokat rajzoljuk fel az 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. A rendelkezésre álló genomszekvencia- és organizmusszintű fehérje-fehérje interakciós adatok alapján azt mondhatjuk, hogy talán az utóbbi jelenség az, ami az evolúciós létra felső fokain álló organizmusokat igazán komplexszé teszi. Erre szemléletes példa jelátviteli hálózatok esetében, hogy például a muslicát és az embert összehasonlítva nem a fehérjekinázgének száma, hanem a kinázok egymás közötti vagy más fehérjékkel alkotott kölcsönhatásainak száma nő (Bhattacharyya et al. 2006a).

A gének expressziójának tanulmányozása során tárták fel először azokat az általános mechanizmusokat, amelyek egy nagy léptékű, akár organizmusszintű biológiai szabályozásért felelős rendszer működését tudják megbízható módon biztosítani, s ugyanakkor lehetővé teszik ezen rendszerek folyamatos fejlődését az evolúció során. Ezért érdekes ennek a transzkripciós faktor alapú rendszernek az összevetése a fehérjekináz alapú sejtes jelátviteli rendszerrel: a probléma ugyanis hasonló, és felvetődik a kérdés, hogy léteznek-e közös elvek, megoldások a két rendszerben. Transzkripciós hálózatokban a génaktivitás szabályozása a 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, mert így

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 az evolúciójára vonatkozó talán legfontosabb felismerés, hogy az effektor és a regulációs funkciók fizikai szétválasztása révén az új kapcsolatok kialakítása lényegesen egyszerűbbé válik: egy adott gén aktivitásának szabályozása nemcsak egy új transzkripciós faktor létrehozásán keresztül, hanem egy egyszerű DNS-enhanszer szekvenciájának a megváltoztatása révén is megtörténhet.

A génregulációs hálózatokra felismert elveket a jelátvitelt szabályozó fehérjekináz alapú hálózatokban is megtalálhatjuk. A sejtbiológiai folyamatok egyik rejtélye, hogy kis szubsztrátspecificitású enzimeket használó jelátviteli hálózatok hogyan építenek fel az organizmus szintjén specifikusan működő jelpályákat. A 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 a jelátvitelben szerepet játszó fehérjekinázok a klasszikus metabolikus enzimekhez képest sokkal több moduláris elemet használnak bemenet-kimenet kapcsolataik létrehozására. Ez egyértelműen tükröződik a kinázokhoz kapcsolódó fehérje-fehérje kölcsönhatásokra szakosodott moduláris domének változatosságában és számában (Pawson & Nash 2003). Egy másik érdekes jelenség, hogy sok fehérjekináz esetében az aktív hely körüli régió promiszkuus módon ismeri fel és foszforilálja a szubsztrátokat *in vitro* (Ubersax & Ferrell 2007).

A fehérjekinázok szubsztrátspecificitását 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 keresztül történő interakciók integrált megoldások, addig az állványfehérjék által közvetített kinázasszociációk a modularitás legmagasabb fokát képviselik. Egy aktív hely körüli háromdimenziós struktúra genetikailag nehezen transzferálható, azaz nem lehet „újrahasznosítani" más fehérjékben, s ezért nagymértékben integrált megoldás. Ezzel szemben kinázok közötti asszociációk állványfehérjékkel egyszerűen, genetikailag moduláris módon változtathatóak (például egy kinázt kötő fehérje génjének duplikációja és későbbi változtatása révén, vagy két kinázt kötő fehérje génjeinek illegitim rekombinációja révén). A fenti szempontok alapján a dokkoló peptideken, valamint a moduláris doméneken keresztül zajló fehérje-interakciók köztes megoldások. Az előbbi esetben egy kismértékű konszenzusszekvenciát igénylő fehérjeszakasz létrehozása egyszerűen megtörténhet már létező SLiM-tartalmú régiók illegitim rekombinációja vagy akár véletlen mutációk révén (de novo SLiM-generálás), 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 et al. 2006a).

Összefoglalóan elmondható, hogy organizmusszintű fenotípusos változatosság és komplexitás inkább rejlik a regulációs hálózatok elemei közötti kapcsolatok sokféleségében,

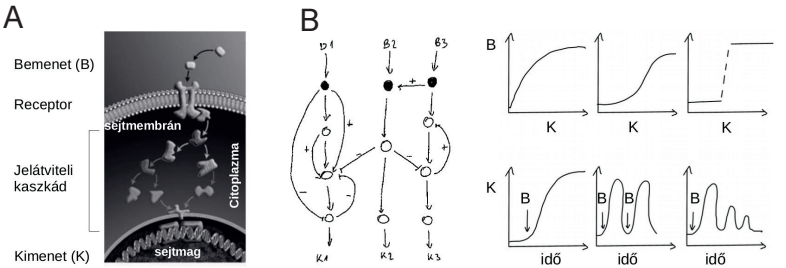
mintsem új elemek folyamatos generálásában. Napjaink számítástechnikai fejlesztéseinek sikere is ennek a stratégiának a gyakorlati alkalmazásához köthető: fantasztikusan komplex módon működő logikai áramkörök építhetők egyszerű elektronikus elemekből azok változatos módon történő összekapcsolása révén. A fentiek miatt fontos megérteni, hogy az új bemenet-kimenet összefüggések sejten belüli regulációs hálózatok esetében hogyan jönnek létre, s hogy azok milyen molekuláris logika mentén szerveződnek. Egy általános jelenség, hogy a szubsztrát kémiai módosításához szükséges effektor elemek fizikailag elválnak a felismerés/szabályozás specificitásáért felelős elemektől, amely azután a moduláris felépítésből eredően lehetővé teszi ezen funkciók egymástól független, különutas fejlődését.

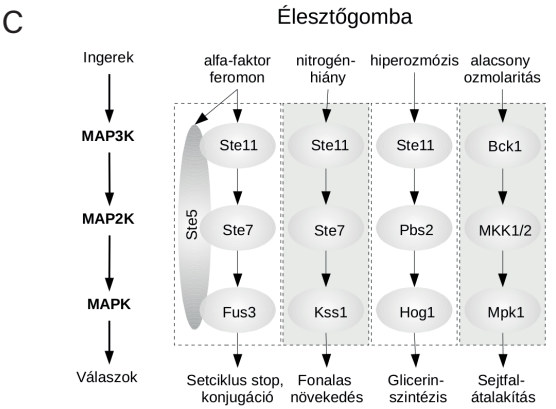
9. FEHÉRJEKINÁZ ALAPÚ JELÁTVITELI KASZKÁDOK

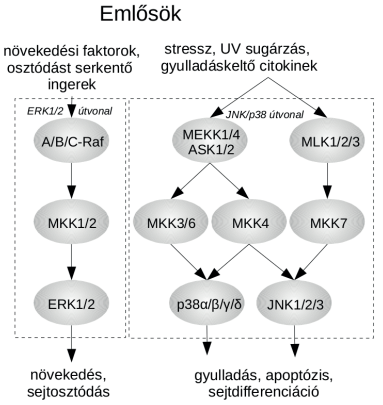
MIÉRT FOSZFORILÁLJÁK EGYMÁST A KINÁZOK?

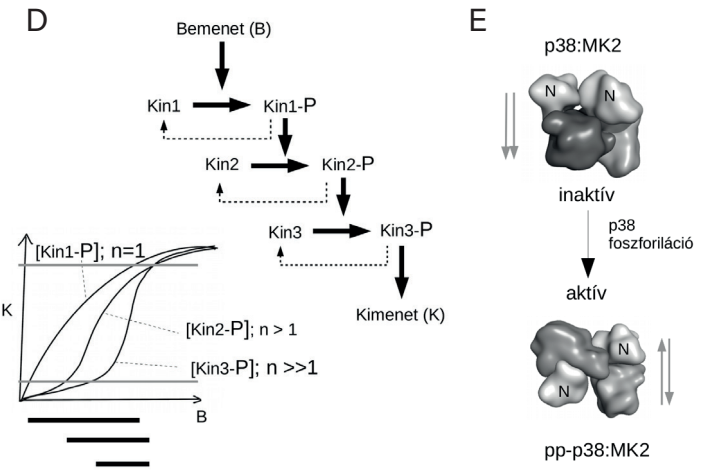
Sejtjeink a környezetükből érkező jelekre folyamatosan válaszolnak, az ingerek lehetnek olyan kémiai vagy fizikai természetű hatások, melyek a sejtek vagy a belőlük felépülő organizmusok szempontjából fontosak. Kémiai hatás lehet például egy hormon jelenléte a véráramban, fizikai hatás lehet például a fény a retinában elhelyezkedő pálcikasejtek számára. Az ingerek érzékelése receptorokon keresztül zajlik, az ingerre adott biológiai válasz pedig olyan sejten belül lejátszódó folyamatok összességeként írható le, melyek egy adott inger hatására alakulnak ki. Biológiai válasz például a hámsejtek osztódása növekedési faktorok hatására vagy a membrándepolarizáció fény hatására pálcikasejtekben. Sok esetben a külvilágból érkező ingerek a sejtmagban gének átírását indítják el. A biológiai válaszok tehát a jelátviteli pályák kimenetei (*14/A ábra).*

Klasszikus értelemben a jelátviteli pálya olyan fehérjékből és másodlagos hírvivő molekulákból (például Ca^{2+}, cAMP, foszfolipidek) álló kaszkád, amely egy bemenetet egy kimenettel kapcsol össze. Például az inzulinkoncentráció


A
Bemenet (B)
Receptor
Jelátviteli kaszkád
Kimenet (K)
sejtmembrán
Citoplazma
sejtmag
B
B
K
K
K
B
B
B
K
idő
idő
idő


C
Élesztőgomba
Ingerek
alfa-faktor feromon
nitrogén-hiány
hiperozmózis
alacsony ozmolaritás
MAP3K
MAP2K
MAPK
Válaszok
Ste5
Ste11
Ste11
Ste11
Bck1
Ste7
Ste7
Pbs2
MKK1/2
Fus3
Kss1
Hog1
Mpk1
Setciklus stop, konjugáció
Fonalas növekedés
Glicerin-szintézis
Sejtfal-átalakítás


Emlősök
növekedési faktorok, osztódást serkentő ingerek
stressz, UV sugárzás, gyulladáskeltő citokinek
ERK1/2 útvonal
JNK/p38 útvonal
A/B/C-Raf
MEKK1/4
ASK1/2
MLK1/2/3
MKK1/2
MKK3/6
MKK4
MKK7
ERK1/2
p38α/β/γ/δ
JNK1/2/3
növekedés, sejtosztódás
gyulladás, apoptózis, sejtdifferenciáció



14. ábra. Kinázkaszkádok a jelátviteli pályákban/hálózatokban
A) Jelátviteli kaszkádok sémája. B) Bemenet-kimenet kapcsolatok komplexitása. A bemeneti jelet a kimenettel összekötő citoplazmán belüli jelátviteli kaszkád a valóságban a visszacsatolások és áthallások miatt lényegesen komplexebb egy egyszerű szekvenciális kaszkádnál. Ez azt eredményezi, hogy a bemenet-kimenet kapcsolatot mennyiségileg jellemző dózis-válasz görbe az egyszerű telítési görbéből (hiperbola alak; bal szélső grafikon, amit lineáris viselkedésnek is hívunk, mert a görbe elején a B(K) függvény lineáris) ultraérzékennyé vagy akár kettős állapotúvá válhat. Az alsó grafikonsor pedig azt mutatja, hogy a kimenet erőssége az időben a bemenet hatására az egyszerű telítő Michaelis–Menten típusú kinetikához (bal szélső grafikon) képest miképp válhat nem lineárissá: a bemenetre a rendszer a kezdeti állapotba visszatérő adaptálódott jelet ad (középen), illetve a minimum és maximum

érték között csillapodva oszcillál (jobb szélső grafikon). C) Élesztő és humán MAPK-modulok. Az emlősökben az élesztő Fus3 és Hog1 MAPK-alapú kinázmodulok az ERK és a p38 modulnak feleltethetők meg. A szürke hátterű élesztő Kss1- és Mpk1-modulok elvesztek, míg a JNK-modul újonnan jelent meg. D) A többszintűségből eredő ultraérzékeny bement-kimenet kapcsolat. A grafikon alatti vastag, vízszintes vonal azt a bemeneti jeltartományt mutatja, amelyben az adott szinten elhelyezkedő aktív kináz mennyisége köztes (azaz 10%-nál messzebb van a minimum vagy a maximum értéktől, lásd szürke, vízszintes vonalak). Ez a tartomány az alsóbb szintű kinázokra nézve egyre kisebb. E) Inaktív és aktív p38-MK2 kináz-kináz komplexek eltérő negyedleges szerkezete. Az ábra a kináz heterodimér szerkezeteket durva felszín ábrázolásával mutatja az N- és C-terminális lebenyeket külön-külön színezve (N: N-terminális lebeny; a nyilak a monomerek N→C irányát mutatják).

növekedés és egy glükóztranszporter működése között kapcsolatot teremtő jelátviteli molekulák egy csoportját nevezhetjük a glükózfelhasználást stimuláló pályának. Ennek elemei a következők: inzulin, inzulinreceptor kináz, inzulinreceptor szubsztrát (IRS – adapter), PI3 kináz, PIP3 (foszfolipid), Akt/PKB kináz, GEF, Rab GTPáz, GLUT4. Ez a példa jól szemlélteti, hogy az inzulin és a GLUT4 nevű, a glükóz felvételét elősegítő transzporter fehérje aktivációja között sok köztes lépés van. Ezek összessége szükséges ahhoz, hogy a GLUT4-et tartalmazó intracelluláris vezikulák fúziója a sejtmembránnal megtörténjen: a sejtek a vérből tehát glükózt vesznek fel. A korábbi példától eltérően azonban a jel-

átviteli pályák legtöbbször egy sejtmagi válasszal végződnek. Ilyen például a növekedési faktorok hatása a korai gének átírására (például c-fos, c-jun), amelyek azután ciklin-D-átírást serkentenek. Egy konkrét növekedési faktor (például EGF) hatására aktiválódó jelátviteli molekulák csoportját nevezhetjük például az EGF sejtosztódást serkentő pályájának. Elterjedt azonban, hogy egy adott szignál transzdukciós pályájára a központi komponens(ek) neve(i) alapján utalunk (például JNK, TNFα, TGFβ, 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.

A sejtekben a bemenet és kimenet társítását nem lineáris/szekvenciális módon szerveződött jelpályák összességeként kell elképzelnünk. A jelátvitel inkább olyan folyamat, melynek során a sejt a környezetből érkező ingerek hatására egy erre specializálódott fehérjékből felépülő hálózat segítségével, a beérkező ingerek összességétől függő biológiai választ ad. Az emberi gondolkodás számára könnyebben kezelhető lineáris/szekvenciális felépítésű jelátviteli pályák tehát áthallanak egymásba, és inkább hálózatos felépítést mutatnak: az egyes jelátviteli fehérjéken több jelpálya is osztozhat egyszerre. Például a korábban említett glükózfelhasználást stimuláló pálya nem teljesen független az EGF sejtosztódást serkentő pályájától. Az inzulin például korai génaktiváción keresztül sejtosztódást is tud serkenteni. Továbbá a klasszikus lineáris kaszkád típusú pályaarchitektúra tovább bonyolódik a komponensek közötti pozitív vagy negatív előre- és visszacsatolások révén (*14/B ábra*).

A konkrét jelátviteli pályákban a sejtfelszíni kezdeti és a citoplazmában vagy a sejtmagban a végső választ kiváltó események között többszintű, alapvetően eltérő jelátviteli funkciókat betöltő komponensekből álló fehérjekaszkád működik (például receptor/ion csatorna, adapter, köztes enzimek, GEF/GAP, GTPáz, kináz/foszfatáz és effektor fehérje). Az is megfigyelhető, hogy ez a nagyobb rendszer gyakran tartalmaz egymást szekvenciálisan aktiváló kinázokat, amelybe a foszfatázok is változatos módon kapcsolódhatnak be. Erre jó példa a sütőélesztő gombától az emberig nagymértékű evolúciós konzerváltságot mutató, háromszintű MAPK-modul. A MAPK-ok számtalan fiziológiás szerepben vállalnak fontos szerepet, amelyek során az enzimek egy három tagból álló kaszkádban végzik feladatukat *(14/C ábra).* A modul legalsó tagja egyben a jelpálya névadó kinázа is, így megkülönböztetünk 4 klaszszikus MAPK-útvonalat. Ezek sorrendben ERK1/2, JNK, p38 és ERK5 jelpályák. Az ezeket aktiváló fehérjék, azaz MAPK-kinázok (MAP2K) azonos sorrend mentén az MKK1/2, MKK4/7, MKK3/4/6 és MKK5 nevet viselik. A legfelső szintet a szerkezetileg igen diverz MAPK kinázok (MAP3K) alkotják. A kaszkádok azonos szintjén található fehérjék evolúciósan közeli rokonságban állnak egymással. Az egyes MAPK-modulok a korábbiak teljes duplikációjával alakulhattak ki, ebből eredően kinázdoménjeik szerkezete nagy hasonlóságot mutat. Az élesztőgomba és a humán MAPK-modulok összehasonlításából jól látszik, hogy a kinázkaszkád alapstruktúrája megmaradt, de az adott funkcióért felelős kaszkád komponensei közötti egyszerű kapcsolatok (egy MAP3K – egy MAP2K – egy MAPK) bonyolultabbá váltak, és az egy szinthez tartozó komponensek száma is megnőtt. A MAP3K-ok száma az ember-

ben az élesztőgombához képest 4-ről 28-ra, MAP2K-ok száma 4-ről 9-re, a MAPK-k száma pedig 4-ről 13-ra nőtt. Ebből jól látszik, hogy a lineáris huzalozás csak az egyszerűbb élesztőgomba MAPK-moduljára jellemző. Később ez sokkal komplexebbé vált, ahol egy MAP3K már több MAP2K-t, és az utóbbiak pedig egyszerre több MAPK-t is aktiválhatnak, bár az alapvető, háromszintű hierarchia megmaradt. Az egyre komplexebb jelátviteli igények kielégítése elméletileg megtörténhetne újabb és újabb egymástól függetlenül működő párhuzamos receptor-kináz-effektor rendszerekkel is, ahol az egyes receptor-effektor funkcionális kapcsolatok különböző kinázok vagy azokból létrejött kaszkádok révén valósulnának meg. Praktikusan azonban ez túl nagy genetikai költséggel járna, mert a beérkező ingerek és biológiai kimenetek sokszínűségét „költséges" lenne lekövetni újabb és újabb kinázgének feltalálásán/evolválásán keresztül. Ugyanakkor a receptorok és az effektorok számán nem lehet spórolni, mert ezek szükségesek a külvilágból érkező ingerek egyre kifinomultabb érzékelésére, illetve az effektorok az ezekre adott válaszok sokszínűségét adják.

Első ránézésre talán nem egyértelmű, hogy miért van szükség számos komponensből álló kaszkádokra a receptoraktiváció utáni effektor fehérje aktivációjához. Léteznek olyan egyszerű rendszerek, ahol a ligandumkötődés hatására aktiválódott receptor közvetlenül foszforilál egy citoplazmatikus transzkripciós faktort, ami foszforilált formájában a sejtmagba jut, és ott beindítja a génexpressziót. Az ilyen látens transzkripciós faktorok a Ser/Thr- és a tirozinfoszforiláción alapuló jelpályákban is egymástól függetlenül kialakultak. A TGF-β sejtfelszíni Ser/Thr-receptor kináz extracelluláris ligandumkötés hatására aktiváló-

dik a citoplazmatikus kinázdoménjén, ami a SMAD fehérjék foszforilációját okozza. Heterodimerizáció után az így aktivált SMAD-ok a TGF-β receptor aktivitásával arányos génexpressziós választ adnak. A JAK-STAT tirozinfoszforiláción alapuló rendszer is hasonlóan működik, de itt egy citokinreceptor (például az interferon-receptor) ligandumkötése által kiváltott nem receptor tirozinkináz (például JAK) aktiváció a STAT-látens transzkripciós faktorok foszforilációját eredményezi, melyek heterodimerizáció után jutnak be a sejtmagba. Ezek az egyszerű, csak néhány komponenst és egy kinázt tartalmazó rendszerek leginkább analóg jelek közvetítésére alkalmasak, s a receptoraktivációval arányos mértékű génexpressziós válasz kiváltásában működnek közre (például morfogének vagy citokinek által stimulált folyamatokban).

A többszintű enzimatikus kaszkádok esetében nyilvánvaló előny lehet, hogy egy kezdeti gyenge jel könnyen felerősíthető, mert egy enzim sok szubsztráttermék átalakítást végzi, és ez több lépcsőben időegységre nézve felerősíti a jelet a kaszkád egyre alsóbb szintjeire érve. Levezethető, hogy egyenként lineáris dózis-válasz görbét produkáló, klasszikus Michaelis–Menten-enzimkinetikájú rendszerek egymásba kapcsolva nem lineáris, ultraérzékeny dózis-választ produkálnak a bemeneti jel és a végső kimeneti termék tekintetében. Ez azt eredményezi, hogy egy háromszintű kinázkaszkád, mint például a MAPK-modul, a bemeneti jel (például a sejtfelszíni események felől érkező jel) és a kimeneti jel (például az aktivált MAPK mennyisége) közel bináris kapcsolóként is működhet, azaz ultraérzékeny, ami azt jelenti, hogy a klasszikus hiperbola típusú szubsztráttelítés-görbéhez képest a bemeneti je-

leknek egy sokkal szűkebb tartományában ad köztes jelet, és az eredmény inkább a minimum vagy az elérhető maximum közelében van. Az ilyen viselkedést matematikailag az úgynevezett Hill-koefficienssel (n) lehet jellemezni, ahol n=1 a klasszikus lineáris viselkedésre utal, és bármilyen ennél nagyobb szám a görbe szigmoid típusú, ultraérzékeny viselkedését jellemzi. Bár egy többszintű enzimatikus rendszer már önmagában is adhat bizonyos mértékű ultraszenzitív viselkedést (Hill n > 1), ez a háromszintű MAPK-modulban még tovább fokozódik azzal, hogy a MAP2K-ok és a MAPK-k aktivációs hurka két helyen foszforilálódik, amit kizárólag a felsőbb szintű kináz tehet meg, illetve a foszforilált, aktivált enzimeket foszfatázok defoszforilálhatják. Utóbbiak miatt, ha a modul kimeneteként értelmezhető duplán foszforilált, teljesen aktív MAPK-PP mennyiségét a MAP3K-ra érkező bemeneti jel függvényében ábrázoljuk, akkor ultraérzékeny viselkedésre jellemző görbét kapunk (n ~ 5). Biológiai szempontból ez azért jelentős, mert így egy küszöbérték feletti kismértékű növekedés a bemeneti jelben a rendszer által produkálható maximumkimenet közelébe löki a választ (Huang & Ferrell 1996) (*14/D ábra).*

A többszintű kinázkaszkádok tehát a kaszkádba érkező bemeneti jel és az onnan az alsóbb jelátviteli szintek felé továbbított jel szempontjából magasabb szintű kapcsolókként viselkednek, amelyek alkalmasak analóg bemenő jelekre digitális típusú kimenő jelet adni. Ez a tulajdonságuk fontos olyan nagy léptékű sejtfiziológiai válaszok beindításához, amelyek bináris döntési mechanizmust igényelnek (például sejtosztódás, differenciáció vagy apoptózis). A többszintűségből azonban még további regulációs lehetőségek is szár-

mazhatnak: az előre- és visszacsatolások (feedforward és feedback) révén a kaszkádon belüli aktivitás további modulációja, ami további érzékenyítéshez, oszcillációhoz vagy zajszűréshez vezet. Jellemző továbbá a különböző kaszkádok integrálása a különböző szinteken lévő komponensek közötti áthallások növelése révén, ami végül hálózatosodáshoz és a kaszkádok integrációjához vezet. A GPCR és RTK jelpályák is aktiválnak kináz/foszfatáz-kaszkádokat, és egy adott receptor által kiváltott későbbi jelátviteli események specificitása nem az adott jelátviteli enzim vagy effektor fehérje specificitásán múlik, hanem azt az alsóbb szintű komponensek időbeli és térbeli aktivitásainak különböző mintázataiban kell keresni. Mindez a kaszkádszerű felépítésből következő visszacsatolások és más, receptoraktiváció után aktiválódó kompenensektől származó áthallások miatt jön létre (Kholodenko 2006). Utóbbiak alapja a különböző szinteken vagy funkcionális szempontból eltérő kinázkaszkádok közötti kapcsolatok kialakulása olyan biofizikai kölcsönhatásokon keresztül, melyek a kinázok szubsztrátjaikkal való kölcsönhatásait is jellemzik, s amelyre számos konkrét példát ismerünk, például az alapvetően hierarchikus módon szerveződő MAPK-hálózatokon belül is (Lake et al. 2016).

További fontos tényező, hogy a többszintűség lehetővé teszi a bemeneti jelek mintázatától függő feltételes jeltovábbítást is. Bizonyos kinázcsaládokban jellemző (például AGC), hogy tagjaik csak egyszerre több kináztól származó független foszforilációs események hatására aktiválódnak. Ez egyedi szerkezeti felépítésükből adódik, mert több olyan régiót tartalmaznak, melyek foszforiláción keresztül történő módosítása egyszerre szükséges az aktív konformá-

ciós állapot létrehozásához, s az egyes helyek csak egy-egy adott kinázzal kompatibilisek. A PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) egy állandóan aktív kináz, és számos AGC kinázt képes az aktivációs hurkán foszforilálni (például PKA, PKB, PKC, RSK és p70S6K), de ezek aktiválásához még egy másik kináz általi foszforiláció is szükséges egy C-terminális allosztérikus helyen, az úgynevezett hidrofób motívumukon (HM). Az RSK AGC kinázdoménjének HM foszforilációját egy MAPK általi esemény okozza, míg az aktivációs hurkát a PDK1 foszforilálja. A p70S6K esetében a PDK1 általi foszforilációt az mTOR kináz egészíti ki. Ezek a példák szemléltetik, hogy néhány kináz aktivációja csak akkor történik meg, ha egyszerre két független jel korábban már a felsőbb szintű kinázokat aktiválta, azaz a két feltételnek egyidejűleg kell teljesülnie.

A kinázkaszkádok elemei közötti asszociációkról szerkezeti szempontból kevés ismeretünk van. Kináz-kináz komplex szerkezetek csak korlátozott számban állnak rendelkezésre, aminek az oka az lehet, hogy az ilyen komplexek általában tranziens természetűek. Ha ez nem így lenne, akkor a komplexek nem tudnák a felülről érkező jeleket az alsóbb szintek felé megfelelő hatékonysággal továbbítani: a heterodimer befagyna egy olyan állapotban, amely nem esik szét, s így a katalitikus ráta lecsökkenne, mivel képtelen lenne az újabb szubsztrátmolekulák módosítására. A két kölcsönható kinázdomén között mindenképpen szükséges egy domén-domén típusú asszociáció olyan térállásban, ami lehetővé teszi, hogy a felsőbb szintű kináz aktív helye hozzáférjen az alsóbb szintű kináz aktivációs hurkához vagy más egyéb foszforilálandó helyhez. Bizonyos

esetekben a kináz heterodimer aktív állapota stabilizálható járulékos kölcsönhatásokon keresztül. Az ERK2-RSK1 és a p38-MK2 komplexek kristályszerkezetét meg lehetett határozni, mert a bennük lévő két kinázdomén (MAPK és MAPKAPK) tranziens domén-domén kontaktjait a MAPK dokkoló árka és a kölcsönható kinázból származó dokkoló motívumok közötti nagy affinitású kölcsönhatások egyben tartották. Ezekből az inaktív szerkezetekből kiindulva, amik a MAPK-kat defoszforilált állapotban tartalmazták, az aktív heterodimerek szerkezete modellezhető volt. Az így kapott ppERK2-RSK1 és pp-p38-MK2 katalitikusan aktív kináz heterodimerek szerkezetét összehasonlítva az inaktívakéval, azt találták, hogy a felsőbb szintű kináz aktivációs hurkán a foszforilcsoportok jelenléte miatt bekövetkező szerkezeti változások olyan negyedleges szerkezetek kialakulását segítik elő, amelyek révén az alsóbb szintű szubsztrátkináz aktivációs hurkán lévő targetszekvencia közel kerülhet a felsőbb szintű kináz szubsztrátkötőzsebéhez (*14/E ábra)* (Alexa et al. 2015, Sok et al. 2020). Az enzim szerepét betöltő kináz aktivációs hurkán bekövetkező kis lokális szerkezeti változás tehát a kináz heterodimerek domén-domén szintű mozgásának a dinamikáját, „ensemble" viselkedését változtatja meg. Ez hasonló ahhoz, ahogy a foszoriláció egy adott kináz szerkezeti ensemble viselkedését a harmadlagos szerkezetben a molekulán belül befolyásolja.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a kinázok kaszkádokba való szerveződése új, magasabb rendű szabályozások molekuláris alapját teremti meg. Erre a kinázok/foszfatázok szintjén nem mindig van szükség: például a látens transzkripci-

ós faktorok aktivációja közvetlenül történhet a receptor után egy kináz által is, mert ezek a bemeneti analóg jelek erősségével korreláló lineáris jeleket közvetítenek a sejtmagba. A többszintűség révén a bemeneti jelek és kimenetek közötti mennyiségi viszony egy enzim-szubsztrát párhoz képest azonban komplexebb, nem lineáris természetű lesz. Már a kinázkaszkádokon belül is kialakulhatnak fehérjefoszforiláció alapú visszacsatolások, melyek a foszfatázok hatásával kiegészülve a receptoroktól kiinduló analóg jeleket az ultraérzékeny viselkedés miatt lényegében digitalizálják, s ezzel elősegítik a sejtekben a bináris döntéseket.

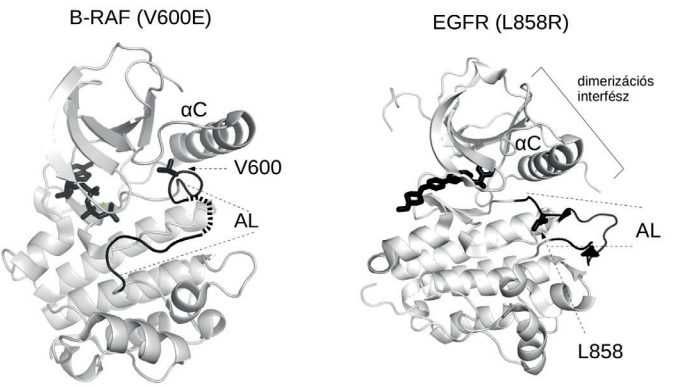
10. A FEHÉRJEKINÁZOK PATOLÓGIÁS MŰKÖDÉSE

HOL VANNAK A FEHÉRJEKINÁZOK GYENGE PONTJAI?

Valószínűleg nehéz lenne túlértékelni a kinázok jelentőségét a jelátviteli folyamatokhoz köthető betegségekben. A kinázok a sejtes élet szinte minden aspektusát szabályozzák, működésük defektusai befolyásolják sejtek osztódását, növekedését, halálát, differenciációját, mozgását és metabolikus folyamatait. A kinázok patológiás működése leginkább a rákhoz kapcsolódóan kutatott, de szerepük a gyulladási folyamatokban (például a sejthalál különböző formáinak szabályozásában betöltött fontos szerepük miatt) is egyre gyakrabban kerül a vizsgálatok előterébe. Milyen molekuláris defektusok okozzák a kinázok működésének a zavarait? Mechanisztikai szempontból ezek több csoportba sorolhatók: 1. mutációk, melyek a kinázdomén szerkezetét, dinamikáját változtatják meg; 2. mutációk olyan kinázdoménen kívüli régiókban, melyek a kinázt alapállapotban inaktív állapotban tartják; 3. más fehérjékben létrejövő genetikai változások, amik a kinázok aktivitását közvetett módon befolyásolják (például foszfatázokban, állványfehérjékben, alegységekben létrejövő mutációk); 4. a szubsztrátok foszforilációs helyeinek és kör-

nyezetük mutációi. Ebben a fejezetben a kinázok struktúrájából és a foszforiláción alapuló jelátviteli hálózatok felépítéséből adódó sérülékeny pontokat tárgyalom. A fehérjekinázok aktivitásának szabályozása, szubsztrátspecificitása, a foszforilációs helyek helyzete az evolúciós skálán plasztikusan változott, és ezek mutációk révén az ember élete során is megváltozhatnak. A legtöbb információnk a kinázok rákot okozó (onkogén) mutációival kapcsolatos.

A legkönnyebben azonosítható gyenge pontok a kinázok szerkezetéből adódnak. A kinázok molekuláris kapcsolókként működnek, ahol az aktív konformáció kialakulása a jelátviteli kaszkád felsőbb szintjein történő eseményektől függ. Korábban láttuk, hogy az inaktív-aktív szerkezeti átalakulásban az aktivációs hurok milyen fontos szerepet játszik, s ezért nem meglepő, hogy bármilyen olyan mutáció, ami az AL konformációját az inaktív kinázban destabilizálja, vagy az aktív kinázban az AL konformációját stabilizálja, fokozott kinázműködéshez vezet. Ezenfelül előfordulnak az egyes kinázcsaládokra specifikus mutációk is, hiszen a kinázok aktivitásának lefojtására sokféle, kinázcsoportokként változó szerkezeti megoldás létezik. Például egy többdoménes moduláris allosztéria révén szabályozott kinázdomén (például SRC vagy PKB) aktivitása a konformációs vagy sztérikus természetű gátlást biztosító aminosavak mutációja révén is változik. A szerkezeti modellek segítségével a mutációk hatása sokszor már a pozícióból és az aminosavcsere kémiai természete alapján is megmagyarázható (*15. ábra*). A melanómák nagy részében előforduló B-RAF V600E mutáció aktiváló hatása például arra vezethető vissza, hogy a mutáció miatt a B-RAF aktivációs hurka már foszforiláció nélkül is az aktív szerkezet kialaku-



15. ábra. Onkogén mutációk hatása a kinázdomén szerkezetére
Mutációs forrópontok a B-RAF és EGFR kinázdoménben. A bal oldali panel a B-RAF kinázdomén inaktív állapotának a szerkezetét mutatja. Aktív állapotban az aktivációs hurok (AL) foszforilálódik és flexibilisebbé válik. Az inaktív szerkezetben (PDB ID: 6U2G) a szubsztrátkötés gátolt. A V600E mutáció az aktivációs hurok (AL) inaktív állapotát foszforiláció nélkül is flexibilisebbé teszi, mert a nagyobb térkitöltésű és negatív töltésű aminosav oldallánc kevésbé összeférhető azzal a hidrofób zsebbel, ami az AL N-terminális részét az N-lebenyhez rögzíti. Az EGFR kinázdoménje dimerizáció révén allosztérikus módon autoaktiválódik (PDB ID: 2J6M), az AL konformációja megváltozik. Az L858R mutáció hatására az AL konformációs átalakulása az inaktívból az aktív állapotba dimerizáció nélkül spontán is végbemegy, mert az arginin oldallánc alapállapotban is képes az AL konformációját az aktív állapotban rögzíteni új hidrogénhidak segítségével: az enzim aktivációja ezért függetlenné válik az eredetileg a dimerizáció által kiváltott, az αC-n keresztül ható allosztérikus hatástól.

lását segíti, s így a kináz a felső jelektől függetlenül serkenti az ERK sejtnövekedési pályát, ami végül rákhoz vezet (Wan et al. 2004). Az EGFR tirozinkináz doménjében azonosított, a nem kissejtes tüdőrák esetek közel 40%-ában előforduló L858R mutáció hatása is hasonlóan magyarázható: az inaktív→aktív szerkezeti átalakulás spontán megvalósulhat a szabályozás szempontjából fontos egyik szerkezeti elem megváltozása révén. Fiziológiásan az EGF hatására az EGFR dimerizálódik, és a két citoplazmatikus kinázdomén olyan heterodimert alkot, amiben az egyik domén a másikat allosztérikus módon aktiválja. Ennek során megváltozik az αC pozíciója. Az L858R mutáció hatására az inaktív állapotra jellemző αC pozíció magától megváltozik, és nem igényli a dimerizációs partner jelenlétét, ami lényegében azt eredményezi, hogy a mutáns kinázdomén az EGF ligand kötődésétől függetlenül folyamatosan bekapcsolt állapotban van (Yun et al. 2007).

A fenti példák funkciónyeréses szomatikus misszensz mutációk voltak, s érthető, hogy ezek a változások miért okoznak előnyt a sejtek növekedésében: a mutáns gént tartalmazó sejtek növekedési előnybe kerülnek, mert a mutációk a sejtnövekedést elősegítő jelpályákban közreműködő kinázokban lépnek fel. Funkcióvesztéses mutációk is valószínűleg hasonló mértékben történnek, hiszen a kináz aktivitását nemcsak serkenteni, hanem gátolni is lehet; az ilyen mutációkat hordozó sejtek viszont a szervezetben nem tudnak elterjedni és „csendben" eltűnnek. A kinázaktivitást ugyan romboló, de a kináz más, nem katalitikus funkcióinak tekintetében „funkciónyeréses" mutációk azonban okozhatnak kóros sejtnövekedést. A 2000-es évek elejére a B-RAF-ban már több tucat onkogén mutációt azonosítottak: 22 ilyen onkogén mutáció

vizsgálatakor kiderült, hogy ezek közül 18 mutáció a B-RAF katalitikus aktivitását növelte, főleg a kinázdomén aktivációs hurkának vagy a G-hurok körüli régiók szerkezetének/dinamikájának változtatása révén. Négy esetben azonban a mutáns kináznak alacsonyabb volt az aktivitása az aktivált állapotú intakt kinázhoz képest *in vitro*. Az utóbbiakról kiderítették, hogy teljesen más mechanizmus alapján okoznak fokozott ERK-aktivitást és sejtnövekedést, és a bennük lévő misszensz mutációk funkciónyerése csak a sejtekben érvényesül: ezek a mutációk a B-RAF kinázdoménjét olyan állapotba hozzák, amelynek révén hatékonyabban kötődnek a B-RAF egy dimerizációs partneréhez (C-RAF). Az ilyen mutáns B-RAF fehérjék nagyobb allosztérikus aktiváló hatást fejtenek ki a C-RAF-on, tehát hatásuk az utóbbin keresztül érvényesül (Wan et al. 2004).

A kinázokhoz köthető, fehérjefoszforiláción alapuló működési zavarokat azonban nem csak az enzim katalitikus szabályozásának a megváltozása okozhatja. Ha valamilyen okból például egy kináz a megszokott fiziológiai működésétől eltérő szubsztrátokat kezd el módosítani, akkor úgynevezett illicit, azaz alapesetben tiltott jelátvitel történik. A génduplikációval létrejött, új funkciót nyerő paralóg kinázok kialakulásában az illicit kináz-szubsztrát kapcsolatok nagyon fontos szerepet játszhattak az evolúciós időskálán, hiszen ezzel új kinázalapú jelátviteli funkciók jöttek létre; az egyed szintjén a kinázok szubsztrátspecificitását megváltoztató mutációk azonban károsak lehetnek. Az első ilyen esetet a RET receptor tirozinkinázban írták le: a multiplex endokrin neoplázia MEN2B formája egy öröklődő rákbetegség. A RET kinázdomén M918T mutációja az enzim

szubsztrátkötőzsebében azt okozza, hogy az enzimnek kissé megváltozik a szubsztrátspecificitása, ami a receptor aktivációja után eltérő tirozinfoszforilációs profilt eredményez a proteóm szintjén (Santoro et al. 1995).

Mennyire gyakoriak az ilyen szubsztrátspecificitási profilváltozást okozó humán kinázmutációk? Ennek a kérdésnek a megválaszolásához először a kutatóknak a humán kinóm egyes tagjainak a szubsztrátspecificitását meghatározó aminosav pozícióit kellett feltérképezniük. Amikor ezt a feladatot leszűkítették a szubsztrátkötőzsebbe bekötni képes peptidekre, illetve kizárólag a kinázdoménhez tartozó aminosavak szerepére, akkor azt találták, hogy az univerzális kinázdomént alkotó aminosav pozíciók eltérő mértékben járulnak hozzá a kinázdomén – szubsztrát peptid kapcsolatok kialakításához. Az megjósolható volt, hogy a szubsztrátkötőzseb közvetlen szomszédságában lévő aminosavak fontosak lesznek, de sikerült ettől távolabbi helyek szerepét is felismerni, tehát olyan pozíciókét is, melyek nem kerülnek közvetlen kapcsolatba a szubsztráttal. További fontos megfigyelés volt az is, hogy a szubsztrátkötőzseb aminosavai és a távolabbi régiók aminosavai együttesen alakították ki az adott kinázra jellemző specificitási profilt (Creixell et al. 2015a). Szerkezetileg ezek a szubsztrátspecificitási profilokat meghatározó aminosavak több klaszterbe tömörültek, melyek a kináz belsejében lévő szerkezeti „csatornákon" keresztül kapcsolódtak egymáshoz, és így közvetve a szubsztrát peptidhez. Ezek a régiók ugyanakkor élesen elkülönültek a kinázok katalitikus aktivitását biztosító C- és R-gerincektől. A szubsztrátspecificitásért felelős kinázrégiókban fellelhető misszensz mutációk a rák kialakulásában is

fontos szerepet játszanak, ezek a genetikai változások tehát a kináz-szubsztrát kapcsolatok gyenge pontjait támadva okoztak sejtnövekedési előnyt (Creixell et al. 2015b).

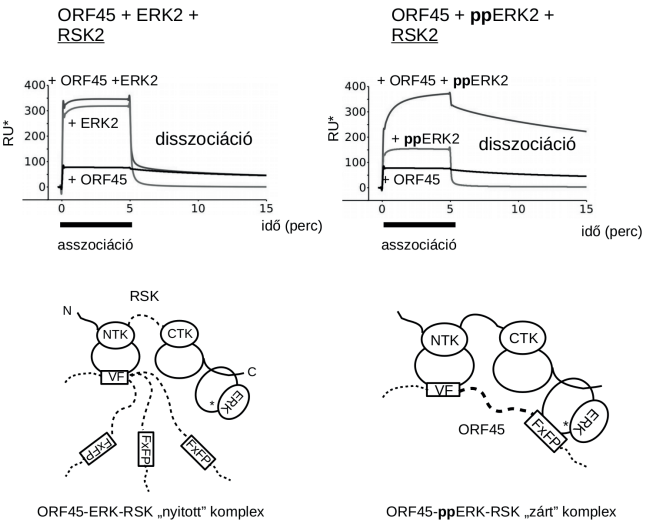
Az eddigiek alapján összegzésképpen elmondhatjuk, hogy azok a szerkezeti tulajdonságok, melyek lehetővé teszik a kinázok számára, hogy specifikus allosztérikus kapcsolóként működjenek, kompromisszummal járnak, mert a plasztikus, változásra képes struktúrának vannak olyan gyenge pontjai, amiket az egyed szintjén például a rák kialakulására jellemző szomatikus mutációk is kihasználhatnak. A kinázok fontos szerepe miatt patogén organizmusok szintén manipulálják ezeket az enzimeket, s a következő részben néhány olyan példát mutatok be, melyekben a kinázalapú jelátvitel módosítása a hálózat szintjén történik meg.

A kórokozó baktériumok, vírusok számára létkérdés, hogy jelenlétük a gazdaszervezet számára rejtve maradjon, illetve a gazdasejten belül képesek legyenek reprodukálódni. Ehhez a gazdaszervezet patogén felismerésére, elpusztítására vagy a fertőzött sejtek eltakarítására szakosodott immunrendszer működését beindító jelátviteli rendszert el kell nyomni, illetve a reprodukcióhoz, növekedéshez szükséges, sejten belüli folyamatokat mesterséges módon kell beindítani. Intracelluláris patogének vagy vírusok gyakran térítenek el jelátviteli pályákat a fehérjekinázokon keresztül. Több olyan vírus is van, amelyik a fehérjekinázoknak olyan állandóan aktív verzióját kódolja, ami a gazdasejt valamelyik sejtnövekedési jelpályáját fokozott működésre serkenti, és ezzel elősegíti a vírus DNS-ének és fehérjéinek szintézisét. Érdekes, hogy az első retrovirális onkogén, amelyet felfedeztek, az SRC kináz volt (1978-ban a v-SRC, amiből hiányzik az a C-terminális sza-

kasz, ami a kinázt alapállapotban inaktívan tartja). Számos kórokozó baktérium rendelkezik olyan fehérjékkel, amelyeket a gazdasejtbe injektálva olyan jelátviteli zavart okoznak, ami valamilyen szempontból előnyös a baktérium túlélése, szaporodása szempontjából. A lépfene (más néven anthrax) baktérium egy olyan proteázzal rendelkezik, ami a MAPK-kinázoknak (MAP2K) azt a rövid N-terminális szakaszát vágja le, ami a MAP2K→MAPK aktivációhoz szükséges: ez a régió tartalmazza azt a dokkoló motívumot, ami a két kináz között a kötődést biztosítja (Duesbery et al. 1998). A pestisbaktériumnak egy egész fehérjearzenálja van, aminek segítségével képes kijátszani a makrofágokban az immunválaszt. Ezek közül a YOPJ egy olyan enzim, ami a MAP2K-ok, illetve még más, az immunrendszer aktivációjában fontos kinázok szerin/treonin acetilációját okozza (például az IKK az NF-κβ látens transzkripciós faktor működését szabályozó pályából, vagy a TAK1: TGFβ által aktivált kináz), ami miatt ezek a jelátviteli enzimek működésképtelenné válnak (Mukherjee et al. 2006). Egy ennél kifinomultabb trükköt alkalmaz a pestisbaktérium egy másik fehérjéje: a YOPM-nek nincs enzimatikus aktivitása, de rendelkezik olyan kötőrégiókkal, melyek révén eredetileg két különböző jelpályában működő humán kinázt (PKR2 és RSK) köt és aktivál egyszerre (McDonald et al. 2003). A kinázok ilyen mesterséges kötése a bakteriális állványfehérjéhez új szubsztrátok foszforilációját eredményezi a gazdasejtben (Chung et al. 2016).

A herpeszvírusok olyan DNS-vírusok, amelyek már régóta az emberrel együtt fejlődnek, és egészséges emberekben nem okoznak komoly betegségeket. A kutatók éppen ezért feltételezték, hogy az ilyen vírusok alaposan kitanulták a gaz-

daszervezet működését, hogy azt a nekik megfelelő módon tudják módosítani. Megfigyelték, hogy a Kaposi-szarkóma herpeszvírus (KSHV) életciklusának a lítikus szakaszában a megfelelő virulenciához, azaz az utód vírusok hatékony képződéséhez szükség van egy megnövekedett mértékű ERK-jelpálya-aktivitásra. Kiderült, hogy a KSHV ORF45 fehérje a gazdasejt sejtnövekedésében fontos jelátviteli pályák két fontos fehérjekinázát (ERK és RSK) egyszerre köti. *In vitro* biofizikai mérések segítségével bizonyították, hogy az ORF45 az ERK-RSK komplexet stabilizálja, meggátolja annak szétesését (*16. ábra).* Később aztán kiderült, hogy ehhez a megnövekedett stabilitáshoz az ORF45 fehérjének csupán egy ~60 aminosavnyi rendezetlen szakasza is elég, s az egyes kinázokhoz való kötődést egy-egy rövid, lineáris kötőmotívum biztosítja. Hogyan vezet a nagyobb ERK-RSK komplex stabilitás a sejten belül megnövekedett ERK- és RSK-aktivitáshoz? A kérdés megválaszolásához először meghatározták a kináz-ORF45 peptid komplexek szerkezetét, amelyek feltárták azokat a felszíneket, melyek révén a kinázok az ORF45-höz kötnek. Ebből a szerkezeti vizsgálatból kiderült, hogy ezek a felszínek ugyanazok, amiket a kinázok az aktivátoraikkal, foszfatázaikkal vagy szubsztrátjaikkal való kötődéshez is használnak. Mindezeknek az egymással sokszor versengő (kompetitív) természetű kölcsönhatásoknak a figyelembevételével felállítottak egy mechanisztikai szempontból korrekt modellt, amiben az egyes interakciókra és enzimatikus katalitikus rátákra kísérletesen meghatározott paramétereket használtak. A modell alapján futtatott számítógépes szimulációk segítségével be lehetett mutatni, hogy a vírusfehérje „rátalált" egy olyan kvantitatív niche-re a kinázokkal alkotott



16. ábra. A KSHV ORF45 fehérje hatása az ERK-RSK kináz heterodimer disszociációjára

Az ábra egy olyan felületi plazmon rezonancia (SPR: surface plasmon resonance) alapú kísérlet eredményét mutatja, amiben az ORF45 vírusfehérje hatását vizsgálták az ERK2-RSK2 komplex kölcsönhatására. Az RSK két kinázdomént is tartalmaz, amiket egy flexibilis linker köt össze (NTK és CTK; N- és C-terminális kinázdomének). Az ORF45 egy rendezetlen fehérje, amely két rövid SLiM-et tartalmaz: a VF-motívum az NTK-hoz köt (K_D ~1 nM), míg az FxFP-motívum az ERK2-höz (K_D~1μM), de az utóbbi interakció szelektív, mert az aktív állapotú ERK2-t (ppERK2) lényegesen erősebben köti a vírusfehérje. Az SPR lehetőséget ad arra, hogy két fehérje kötődését valós időben mérjük. Ebben a kísérletben az RSK2 volt egy mérőcella felszínéhez immobilizálva, és a cellába ORF45-öt, az

ERK2-t (bal oldalon) vagy az aktív állapotú ERK2-t (ppERK2; jobb oldalon) egyenként, illetve a két fehérjét együttesen injektálták 5 percig (asszociációs szakasz). A görbékből látszik, hogy a kötődés elért egy stacionárius (dinamikus egyensúlyi) állapotot, amikor a fehérjék kölcsönhatási affinitásának és az injektált fehérjék koncentrációjának megfelelő mennyiségű komplex képződött a felszínen; (RU: response units). Ezután a felszínt elkezdték mosni pufferrel, s ennek a disszociációs szakasznak az időbeli lefutásából lehetett kiszámolni a komplex szétesésének a mértékét. A kísérletből látható, hogy az aktív állapotú ERK2-t tartalmazó ORF45-ppERK-RSK2 komplex sokkal stabilabb, mint ami az ERK2-t inaktív állapotban tartalmazza. Ennek a lassabb disszociációnak az az oka, hogy a vírusfehérje az RSK2 NTK-hoz való kötődésén túl az FxFP szakaszán keresztül is kötődhet az aktív ERK2-höz. Érdekes, hogy a kétpontos kötődés kiegészül még egy újabb, független SLiM-interakcióval, ugyanis az ERK2 egy másik felszínén (az úgynevezett dokkoló árkán) keresztül az RSK C-terminális dokkoló motívumát köti. Utóbbi szintén hozzájárul a harmadlagos komplex stabilitásához, bár a bináris ERK2-RSK2 komplexben ez nem biztosít stabil kötődést a két fehérje között, de szükséges az ERK2→RSK jelátvitelhez.

kölcsönhatási paraméterek tekintetében, amelynek révén az endogén aktivátor-kináz-szubsztrát-foszfatáz jelátviteli rendszer dinamikája az ORF45 jelenlétében úgy módosul, hogy az ERK-RSK komplex aktív állapota a foszfatázok hatásának ellenáll, de az aktivációhoz és a szubsztrátok foszforilációjához szükséges kölcsönhatások működőképesek maradnak (Alexa et al. 2022).

Összegezve elmondhatjuk, hogy a kinázdomén plaszticitásából adódó, katalízisre vagy szubsztrátspecificitásra ható mutációs forrópontokon kívül a kinázok működését befolyásoló patogén fehérjék rámutatnak a kinázalapú reguláció további gyenge pontjaira. Utóbbiak főleg a kinázok más fehérjékkel való kölcsönhatásaihoz köthetők, ami rávilágít annak a jelentőségére, hogy a kinázokat nagyobb komplexek és jelátviteli hálózatok kontextusában is fontos vizsgálnunk. Egy másik megközelítésből nézve viszont ezek a gyenge pontok hasznosak, amikor a kinázok működését mi magunk szeretnénk előre eltervezett módon megváltoztatni, hasonlóan ahhoz, ahogy ezt a „természetes" mutációk és a kórokozók teszik.

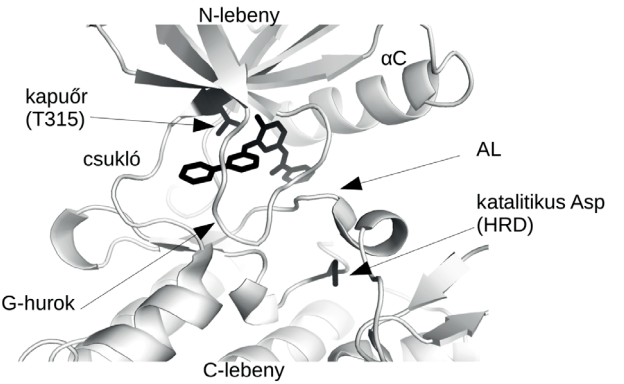
11. HATÓANYAG-TERVEZÉS

HOGYAN TERVEZHETÜNK FEHÉRJEKINÁZOK MŰKÖDÉSÉT BEFOLYÁSOLÓ VEGYÜLETEKET?

Az első vegyületeket, melyek a kinázok működését gátolják, az 1980-as évek közepén fedezték fel (izokinolin szulfonamidok). Ezek alacsony specificitású, ATP-vel kompetáló inhibitorok voltak. Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a kinázok specifikus gátlása lehetetlen. Egyrészt a sejten belüli ATP-koncentráció magas (2-10 mM), és az 1991-ben meghatározott PKA kristályszerkezetben azonosított ATP-kötésért felelős aminosavak meglehetősen konzerváltnak tűntek. Később azután kiderült, hogy a rapamicin nevű, talajbaktériumból azonosított vegyület csak az mTOR kinázra hat, a staurosporin nevű antimikrobiális vegyület pedig a PKC-t gátolta nanomolós koncentrációban (Cohen 2002). A 90-es években indult célzott tirozinkináz-inhibitor fejlesztések első konkrét eredménye volt, hogy a Gleevec (imatinib) vegyület 1996-ban a klinikai kipróbálás fázisába léphetett, s 2001-ben gyógyászati alkalmazásba került a krónikus mieloid leukémia (CML) ellen. A Gleevec (imatinib) hatékonyan gátolja a BCR-ABL kinázt, ami egy CML-specifikus kromoszóma átrendeződése miatt létrejövő, folyamatosan bekapcsolt álla-

potú kiméra enzim. A vegyület egy olyan ATP-kompetitív inhibitor, ami az ABL tirozinkináz nukleotid kötőzsebéhez köt, de a molekula kinyúlik az aktív hely felé is: az aktivációs hurok N-terminális régióját egy olyan konformációs állapotban rögzíti, ami az inaktív kináz szerkezetére jellemző (Schindler et al. 2000) (*17. ábra).* A később kifejlesztett más ATP-kompetitív inhibitorok közös vonása, hogy általában van egy az ATP adeninbázisának helyére kötődő központi részük, de ezt kiegészítik még egyéb csoportok, melyek révén elérhető egy adott kinázcsaládra vagy egyedi kinázra specifikus kötődés. Utóbbiak az ATP-kötőzseb peremén (az úgynevezett oldatfronton) lévő különböző szerkezeti tulajdonságokat használják ki.

Húsz évvel az imatinib sikere után már 76 kináz inhibitort fogadtak el klinikai használatra, és több száz inhibitor került a klinikai kipróbálás különböző fázisaiba (Cohen et al. 2021). A 2021-re elfogadott inhibitorok a kinázok 21 különböző családját támadják (a TK, TKL, STE, CMGC, AGC, és atipikus csoportokból), mindez azonban kevesebb, mint a humán kinómot alkotó több mint száz kinázcsalád egyötöde. Az inhibitorok elsődlegesen még mindig csak mindössze 42 kinázt gátolnak, és az inhibitorok jóval több mint fele 30 tirozinkinázra került kifejlesztésre. A kinázok sejtnövekedést befolyásoló fontos szerepe miatt a klinikumban használt inhibitorok több mint 60%-a az onkológia területéhez köthető (Attwood et al. 2021). Az imatinib elfogadása óta (2001) eltelt két évtized fontosabb mérföldkövei az alábbiak: az első EGFR inhibitorok megjelenése 2002-ben (gefitinib, erlotinib), az első racionális tervezésű Ser/Thr-kináz inhibitor (RAF – vemurafinib) 2012-ben, az első allosztérikus kináz inhibitor

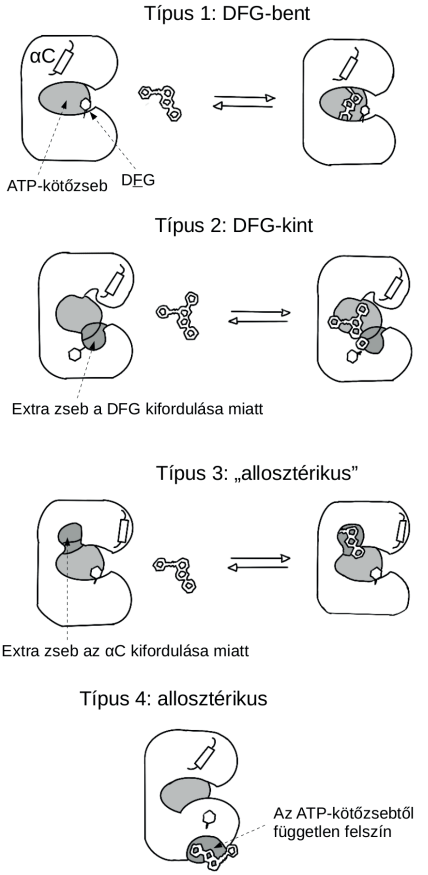


17. ábra. Az ABL-imatinib komplex szerkezete
Az imatinib (fekete) az ATP-kötőzsebben helyezkedik el: a bal oldali fele az ATP adeninrészletével hasonló pozícióban a csukló és a kapuőr pozíció közelében foglal helyet, de az imatinib igazi ereje abból származik, hogy a jobb oldali felén lévő csoportok segítségével az aktivációs hurkot (AL) egy olyan szerkezetben stabilizálja, ami meggátolja a szubsztrátok hozzáférését a katalitikus (HRD) hurok fontos aszpartát aminosavához (PDB: 1FPU).

2013-ban (MEK – trametinib). A fentiek mellett az elmúlt időszakot az jellemezte, hogy a korábban bevezetett inhibitorok ellen idővel kialakuló rezisztencia miatt az eredeti vegyületeket folyamatosan tovább kellett fejleszteni (például második és harmadik generációs EGFR és ALK inhibitorok), illetve megjelentek a kombinatorikus terápiák, amikor a hatás fokozása érdekében vagy a szerzett rezisztencia esélyének csökkentése miatt egyszerre több kinázgátlót használnak. Az első

olyan inhibitor, ami nem onkológiai vonatkozású, 2012-ben jelent meg a köszvény és az autoimmun betegségek során fellépő krónikus gyulladás csökkentésére, ami egy JAK inhibitor (tofacitinib). A SYK tirozinkináz gátlására is létezik már hatóanyag, ami a kináz allergiás és autoimmun betegségekben betöltött fontos szerepe miatt került a célpontba. További, az onkológia és az immunológia területén kívül eső betegségekre alkalmazható inhibitorok egyelőre a ROCK, mTOR, VEGFR és az FLT3 kinázokat gátolják. A jelenleg klinikai tesztek alatt lévő inhibitorok nagy számát és változatosságát figyelembe véve az utóbbi lista hamarosan bővülni fog. A kismolekulás kinázgátlókon kívül léteznek ellenanyag alapú biologikumok is, amik az RTK-k sejtfelszíni lokalizációját használják ki és a receptor kinázok ligandkötését gátolják, vagy a receptor internalizációját segítik elő.

A jóváhagyott kismolekulás kináz inhibitorok több mint 90%-a az ATP-kötőhelyet támadja. Itt többféle mechanizmust különböztethetünk meg (*18. ábra).* Az inhibitor a kináz aktív állapotához köt, és az inhibitor purinváza az ATP-csuklóval alkotott hidrogénkötéseit utánozza; az αC és a DFG szakasz az aktív „DFG-in" állapotban van, de a G-hurok szerkezete torzult (Típus 1). Az inhibitor a kináz inaktív állapotához köt, amit a DFG szakasz kifelé fordulása jellemez („DFG-out"), létrejön egy kisebb hidrofób zseb az ATP-kötőrégió közelében, s ezt a központi vázhoz kapcsolt extra csoportok beépítésével lehet kihasználni az affinitás és szelektivitás növelésére – az αC és a G-hurok az aktív konformációra jellemző állapotban van (Típus 2). Több ATP-kompetitív inhibitor azonban nem tartozik a fenti két csoport egyikéhez sem, és valamilyen köztes állapotú enzimhez köt (Típus 1.5), amikben talán



18. ábra. A kináz inhibitorok különböző típusai

A kináz inhibitorokat osztályozni lehet aszerint, hogy a kinázdoménen milyen felszínekhez kötődnek. Az ATP-kötőzseb hozzáférhetősége szempontjából fontos DFG szakasz konformációja (DFG-in – DFG-bent és DFG-out – DFG-kint),

az αC helyzete és az ATP-kötőzsebtől független felszínek alapján különböző típusokat lehet felállítani. A különböző kinázcsoportokban az ATP-kötőzsebet kiegészítő extra zsebek, illetve az előbbitől független felszínek változnak, ami szelektívebb kinázgátlók fejlesztésére, illetve az ATP-kompetitív inhibitorok használata miatt kialakult szerzett rezisztencia ellen adnak újabb lehetőségeket.

annyi közös van, hogy az R-gerinc összeállását gátolják, vagy egyéb esetekben az inhibitor egy olyan szerkezeti átalakulást indukál, ami az aktív konformációnak nem ideális (például a defoszforilált aktivációs hurok általi autoinhibíciót segíti vagy a G-hurok egy alternatív konformációját rögzíti), de a DFG régió „DFG-in" állapotban van.

Az úgynevezett allosztérikus kináz inhibitorok az ATP-kötőzseben kívül kötnek, tehát ATP-kötés mellett is gátolhatnak. Az allosztérikus inhibitorok nagyon változatos módon működnek, mert egy adott kinázcsaládra, sőt egyedi kinázokra jellemző szerkezeti tulajdonságokat használnak ki, és ebből adódóan szelektívek. A kinázdoménen való kötődési hely alapján az allosztérikus inhibitorokat két nagy csoportba oszthatjuk. A Típus 3 inhibitorok az ATP-kötőzseb közelében lévő egyéb felszíni zsebekhez kötnek. Ilyen kialakulhat az inaktív kinázokban, például amikor az αC kifordult állapotban van, vagy amikor néhány kináz aktivációs hurka az inaktív állapotban rögzül. A klinikumban használt MEK1/2 inhibitorok (például trametinib) az ATP-kötőzseb melletti, úgynevezett hátsó allosztérikus zsebet használják, és az ATP-vel töltött kinázt is gátolják. A Típus 4 inhibitorok kötőhelye az ATP-kötőhelytől távol helyezkedik el. Ilyenre példa az

ABL-kináz úgynevezett mirisztoil zsebébe kötő harmadik generációs asciminib, melyet az ATP-kompetitív BCR-ABL inhibitorok használata során kialakult rezisztencia ellenében fejlesztettek ki. A kutatók BCR-ABL transzformált sejtvonalon egy molekulatár vegyületeinek a hatását vizsgálták, és azonosítottak egy olyan molekulát (GNF-2), ami hatékonyan gátolta a sejtek proliferációját, de nem az ABL ATP-kötőzsebéhez kötődött, hanem a C-terminális lebeny mirisztoil zsebéhez. Az inaktív, teljes szekvenciájú ABL kinázban, aminek többdoménes szerkezete hasonló az SH3 és SH2 doméneket is tartalmazó SRC-kinázhoz, az N-terminális régió mirisztoilált (ami egy lipidlánc módosítása), és ez a kinázdoménhez kötve inaktív állapotban tartja az enzimet. A BCR-ABL fúziós termékben az ABL eredeti N-terminális régiója hiányzik, ezért az enzim aktív állapotban van, de a GNF-2 az intramolekuláris mirisztoilcsoport általi természetes allosztérikus gátlás hatását imitálja (Zhang et al. 2010). A kinázok allosztérikus regulációját célzó inhibitorok azonosítása és fejlesztése nagyon ígéretes terület, mivel a stratégia nagy specificitású vegyületek kifejlesztésével kecsegtet. A lehetőségek még nagyrészt kiaknázatlanok, mert a klinikai kutatások az ATP-kötőzsebtől távol kötő vegyületekre vonatkozóan még csak az elején tartanak.

Korábban a kovalens inhibitorok használatát sokáig mellőzték, mert a szervezetben káros mellékhatásokat okozhatnak, de az utóbbi időben egyre szélesebb körben terjednek el. A kinázok esetében már több ilyen kovalens inhibitort alkalmaznak gyógyszerként (például az afatinib EGFR és az ibrutinib BTK inhibitort 2013 óta). Az ilyen Típus 5 inhibitorok általában az akrilamid elektrofilcsoportot használják az

ATP-kötőzsebben vagy annak közelében lévő egyik nukleofil cisztein oldallánc támadására és irreverzibilis kovalens kötés kialakítására. Ez a stratégia alkalmas az ATP-kompetitív molekularész specificitásának növelésére, mert kovalens kötés kialakulása csak akkor lehetséges, ha az adott kináz tartalmaz egy ciszteint az ATP-kötőzseb környékén. Mivel a humán kinóm jelentős része rendelkezik kovalens kötés kialakítására alkalmas támadható ciszteinnel az ATP-kötőzseb közelében – bár ezek konkrét pozíciója családonként, de néha még családon belül is változó –, ennek a stratégiának a jelentősége óriási, többek között azért is, mert így a hatóanyag tartózkodási ideje növelhető (Chaikuad et al. 2018).

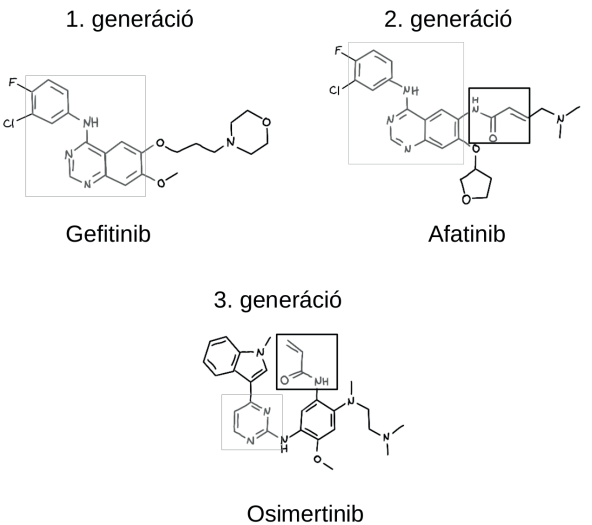
Az onkológia területén alkalmazott hatóanyagok esetében nagy probléma, hogy a kezelés során idővel kialakulhat rezisztencia, és a hatóanyag hatástalanná válik. Ennek a szerzett rezisztenciának több oka is lehet: például olyan jelátviteli utak előtérbe kerülése, melyek megkerülik a célfehérjét, a rákos sejtek túlélése olyan helyen, ahová a hatóanyag nem jut el (például központi idegrendszerbe a hatékony vér-agy gát védelem miatt), vagy transzporter fehérjék fokozott termelődése miatt fellépő, megnövekedett hatóanyagexport okozta úgynevezett multidro-grezisztencia. Egy további közvetlen mechanizmus lehet az is, ha a targetkináz egy másodlagos mutációja miatt a hatóanyag-kötődés megszűnik, így azok a rákos sejtek, melyek hordozzák ezt a mutációt, rezisztens klónokként növekedési előnyhöz jutnak. Az imatinibkezelések klinikai elterjedése után sajnos hamar kiderült, hogy ez a mechanizmus valóban nagyon gyakori. A kinázdomén szerkezetéről szerzett információkat azonban felhasználhatjuk az ilyen mutációk hatásának megértéséhez, s felvehetjük a

harcot a szerzett mutációk ellen újabb és újabb inhibitorok racionális tervezése révén. A kinázok szerkezetének és gyenge pontjainak, illetve egy adott inhibitor kötődési típusának/konformációjának az ismeretében már a kezelések megkezdése előtt megjósolhatjuk, hogy hol történnek majd meg a kötődés erősségét csökkentő mutációk, s ezt ma már figyelembe veszik az új inhibitorok kezdeti tervezésénél is (Aldeghi et al. 2019).

A specifikus kináz inhibitorok fejlesztése során a kutatók olyan szerkezeti elemeket próbálnak kihasználni, amelyek specifikusak egy adott kinázcsaládra vagy szerencsés esetben egy adott kinázra. Az ATP-kötőzseb környéken nincs ilyen aminosavakból nagy választék, ezért itt könnyen felléphetnek olyan mutációk, amik az ATP-kötéssel még összeférhetők lesznek, de a kompetitív inhibitor kötésével már nem. Az alábbiakban két konkrét szerzett mutációt mutatok be a BCR-ABL és az EGFR tirozinkinázokban, melyek gyakran előfordulnak első generációs tirozinkináz inhibitorok (TKI) használata után, s ez szükségessé teszi a második, sőt néha a harmadik generációs TKI-k fejlesztését. Az imatinib klinikai alkalmazása során már korán kiderült, hogy az ATP-kötőzseb egy fontos pozíciójának a mutációja (T315I, az úgynevezett „gatekeeper" – kapuőr aminosav) megszünteti a drog kötését a mutálódott BCR-ABL-hez (Gorre et al. 2001). Később azt is megfigyelték, hogy a nem kissejtes tüdőrák kezelésére használt EGFR ellen fejlesztett gefitinib és erlotinib TKI-k ellen is kialakulhat szerzett rezisztencia, és az esetek körülbelül felében ez a kináz kapuőr pozíciójában bekövetkező T970M mutációra volt visszavezethető (Nguyen et al. 2009). Az évek során azután számos más esetben azonosítot-

tak mutációkat a kapuőr pozícióban, az ATP-kötőzseb körüli úgynevezett oldatfronton, ahol a legtöbb inhibitor fontos kiegészítő kontaktba lép az enzimmel, vagy a DFG szakaszban. A hatóanyag-fejlesztők ezekre az új mutációk által támasztott kihívásokra általában az eredeti vegyület szerkezetének a racionális változtatása révén válaszoltak, és a klinikumba kerültek a második generációs hatóanyagok (például az EGFR esetében az afatanib, ami már egy kovalens töltetet is tartalmazott, és hatékonyabb volt, de alapvetően az első generációs gefitinibhez volt hasonló). Ezeket aztán követték a harmadik generációs gátlószerek, amelyek már célzottabban voltak képesek például a T970M EGFR mutánst is támadni, és kevésbé interferáltak a vad típusú enzim aktivitásával. Ehhez azonban szükséges volt egy új központi vázat találni, ami szerkezetileg eltért a korábbi generációs vegyületekétől (például osimertinib) (Cohen et al. 2021) (*19. ábra).*

Minden kináz közös tulajdonsága az ATP-kötés. Miért fejlesztenek a kutatók egy ilyen általános mechanizmus ellenében inhibitorokat, amikor igazán specifikus vegyületeket inkább a kinázok egyedi funkcionalitását adó kináz-szubsztrát vagy egyéb fehérje-fehérje kölcsönhatások ellenében lenne célszerű fejleszteni? A válasz röviden az, hogy szükségből. Az ATP-kötőzseb eredetileg is kismolekula kötésére alakult ki: egy viszonylag mély hasadék a két kinázlebeny között, ami sokkal kedvezőbb üreg, mint azok a sekély felszínek a kinázokon, melyek a szubsztrátot kötik, vagy amik a fehérjedokkoló peptid típusú kölcsönhatásokért felelnek. Az utóbbiak technikailag nehezebben célozhatók kismolekulákkal, mert a szükséges magas kötődési affinitás eléréséhez ezek a sekély felszínek csak kevés olyan kontaktpontot biztosítanak,



19. ábra. A különböző generációs EGFR inhibitorok szerkezete
Az évek során az onkológiai kezelésekben használt EGFR inhibitorok folyamatos fejlesztéseken mentek keresztül. Az első generációs EGFR inhibitorok (például gefitinib) egy anilinkinazolin központi vázat tartalmaztak (szürke keretben.) Amit a második generációs vegyületekben (például afatinib) ezt kiegészítették egy akrilamid alapú kovalens töltettel (fekete keretben) az inhibitor hatásának a növelése érdekében, ami azonban nagyobb mértékű toxicitással is járt. A harmadik generációs inhibitorokban (például osimertinib) a központi vázat egy pirimidin vázra cserélték, és a molekulát lényegesen átalakították, hogy a T790M mutáció miatt fellépő szerzett rezisztencia ellen is hatékonyan lehessen fellépni.

melyek az oldat felől védettek. Az ilyen stratégiának előnye lehet azonban, hogy a leszorítani kívánt interakciós partnerek nem millimólos (ATP), hanem csak mikromólos mennyiségben vannak jelen a sejten belül (például szubsztrátok, kölcsönható aktivátor fehérjék). A kinázok katalitikus aktivitásának közvetlen gátlásán túl tehát léteznek még egyéb, a kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatásaira fókuszáló közvetettebb stratégiák is, de az ilyen megközelítések egyelőre nem nyertek klinikai alkalmazást. Az olyan kinázok esetében, melyek használnak a szubsztrátkötőzseb mellett még egy dokkoló árkot is a hatékony szubsztrátfoszforilációhoz (például CMGC kinázok közül a MAPK-k vagy a CDK-ciklin komplexek), érdekes lehet az olyan inhibitorok fejlesztése is, melyek ezeket a kinázcsaládra specifikus régiókat célozzák. S mivel ezek a fehérje-fehérje kölcsönhatást biztosító árkok a családon belüli egyedi kinázok (például ERK, p38, JNK) szubsztrátspecificitási profiljához is nagymértékben hozzájárulnak, az ide kötődő vegyületek kinázspecifikus gátlást valósíthatnak meg. Ezzel egyrészt a MAPK jelátviteli hálózatokba teljesen új mechanizmus révén lehet beavatkozni, ahol lényegében csak a kináz-fehérje kapcsolatok gátlódnak, de az enzimaktivitás intakt marad; másrészt viszont az ide kötődő molekulák kiegészíthetik a klasszikus ATP-kompetitív MAPK inhibitorokat, amire a jövőben nagy igény lehet a MAP3K (például RAF) és/vagy MAP2K (például MEK1/2) kinázgátlók hatására kialakuló, szerzett rezisztencia miatt is.

A fentieken túl a kináz-kináz komplexekre specifikus kismolekulás hatóanyag-fejlesztés kínál még egy újabb stratégiát. Láttuk, hogy a kinázok sokszor alkotnak kaszkádokat, amelynek során egy kináz egy másik kinázt köt. Egyelőre

azonban a kinázok egymással alkotott komplexeiről kevés szerkezeti információnk van, de a kinázkaszkádok intakt működéséhez szükséges kináz-kináz komplexek összeállásának és szétválásának a dinamikáját befolyásoló vegyületek szintén lehetnek hatékony inhibitorok. Egy olyan vegyület például, ami a komplexhez szelektíven kötődik, és meggátolja a komplex szétesését, a kaszkád szintjén gátolni fog, mert elvágja a felső kináztól az alsó kináz felé terjedő foszforilációs jelet, azaz a komplex „befagy". Egy molekulatár szűrése során a kutatók olyan vegyületeket kerestek, amelyek szelektíven gátolják a p38 MAPK jelpályában a p38-MK2 kináz-kináz komplex működését, de a p38-aktivitás önmagában intakt marad (Wang et al. 2018, Cumming et al. 2015). Erre az alábbiak miatt volt szükség. A p38 jelpálya számos gyulladást serkentő citokin gén kifejeződését serkenti, és a krónikus gyulladásos folyamatokhoz köthető betegségekben kívánatos lenne ennek a MAPK-nak a gátlása. A klinikai tesztelés fázisába jutott számos p38 ATP-kompetitív inhibitor azonban toxicitás miatt elbukott, mert a p38 általános katalitikus gátlását a szervezet nem tolerálja – valószínűleg a p38 egyéb, a gyulladási folyamatokban betöltött szerepétől független, fontos funkciói miatt. Később kiderült, hogy a gyulladási folyamatokban betöltött szerepét ez a MAPK az általa aktivált MK2-vel együtt éri el, ahol az utóbbi kináz a p38 szubsztrátja. A több százezer vegyületet tartalmazó molekulatár szűrése után sikerült egy olyan inhibitort találni, mely a p38-MK2 komplex működését specifikusan gátolja. Ez a molekula szintén a p38 ATP kötőzsebéhez köt, de a központi részén túl tartalmaz olyan csoportokat is, melyek a megfelelő kötődést csak az MK2-kötött p38-hoz teszik lehetővé. A vegyület tehát nem a p38 katali-

tikus aktivitását gátolja az összes p38 szubsztrát felé (amiből több száz létezik), hanem csak az egyik p38 szubsztrát, azaz az MK2 kináz foszforilációját/aktivációját csökkenti. A jelátviteli hálózat szintjén így a p38-aktiváció utáni szubsztrátok közül csak az MK2 működéséhez köthető szubsztrátok esnek ki, amik főleg a gyulladási folyamatokban játszanak szerepet, de a többi p38 szubsztrát foszforilációja intakt marad. Későbbi kutatások kiderítették, hogy ez az MK2 p38 általi aktiválódását gátló (angolul PoA: prevention of activation) vegyület úgy működik, hogy a p38-MK2 komplexet annak inaktív állapotában stabilizálja, és meggátolja a két kinázdomén olyan típusú összeállását, ami a p38→MK2 aktiváláshoz szükséges: a vegyület tehát egy inaktív állapotú kináz-kináz heterodimert „fagyaszt be" (Sok et al. 2020).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a mai gyógyszerkémiai fejlesztések jelentős része a fehérjekinázokra fókuszál, s talán a GPCR-ek után a kinázok csoportja az, ahol az utóbbi két évtizedben a legintenzívebb hatóanyag-fejlesztési munka történt és eredmény született. A kinómnak azonban még mindig csak egy töredékére vonatkozóan léteznek specifikus inhibitorok. Az onkológia területén és a gyulladási folyamatok ellen bevetett kinázgátlókon kívül egyre nagyobb érdeklődés van a más betegségekben való alkalmazásra is (például vérnyomás-szabályozás, neurodegeneratív betegségek). Az imatinib sikere bebizonyította a célzottan kinázalapú hatóanyag fejlesztésének lehetőségét és klinikai jelentőségét. A racionális, szerkezetalapú inhibitor fejlesztését a rendelkezésre álló több ezer fehérjekináz-szerkezet segíti, és a humán kinómból kb. 300 egyedi kináz szerkezete ismert.

Az ATP-kompetitív inhibitorok mellett egyre nagyobb szerepet kapnak a jövőben az úgynevezett allosztérikus inhibitorok. Ilyen, az ATP-kötőzsebtől eltérő helyen kötődő vegyületektől a jövőben nagymértékű specificitással működő inhibitorokat várunk, illetve a kezelések során fellépő szerzett rezisztencia ellenében is fontosak lesznek, mert kiegészítik a klasszikus ATP-kompetitív inhibitorokat.

12. SZERKEZETALAPÚ RENDSZERBIOLÓGIA

HOGYAN SEGÍTI A SZERKEZETI BIOKÉMIA A FEHÉRJEFOSZFORILÁCIÓ RENDSZERSZINTŰ LEÍRÁSÁT?

A kinázok globuláris doménjeinek szerkezetmeghatározása már több mint három évtizede folyik, 2022-ben a humán kinázok több mint feléről van szerkezeti információnk. A kinázok farmakológiai jelentősége miatt az akadémiai műhelyekben, gyógyszercégeknél és biotechnológiai vállalkozásokban ez az aktivitás még valószínűleg hosszú ideig fontos marad, annak ellenére is, hogy a homológiaalapú szerkezetjósló módszerek egyre megbízhatóbb módon működnek. A kutatások fókusza a következő évtizedekben ugyanakkor egyre inkább a fehérjekinázok egyedi szintű vizsgálatáról átkerül a komplexebb rendszerekre. Ez két párhuzamos úton is haladhat: egyrészt a kinázok sejtekben való működését meghatározó, egyre nagyobb komplexek irányába, ami mechanisztikai információt ad a fehérje-fehérje komplexek szintjén; másrészt a foszforilációra érzékeny, azaz a foszfotranszfer-reakció hatására funkciót váltó úgynevezett foszfokapcsolók azonosítása felé, ami pedig információt ad az organizmuson belüli foszforilációs jelenségek rendszerszintű jelentőségéről. Hogyan működik egy szerkezetileg jól feltárt

globuláris kinázdomén a teljes szekvenciájú kinázban? Hogyan jönnek létre a kináz-kináz és a kináz-szubsztrát komplexek? Hol vannak a foszforiláció révén módosított funkcionális régiók a proteómban? A fenti kérdések megválaszolásához fel kell hagynunk azzal a redukcionista megközelítéssel, ami csak a szerkezetileg könnyebben megközelíthető globuláris doménekre fókuszál. Nyilván ez eleinte szükséges volt, de a jövőben egyre nagyobb hangsúlyt kell helyezni a szerkezet nélküli régiók kísérletes szerkezeti vizsgálatára is. Bár ez a mondat elsőre furcsán hangzik, nem ellentmondásos, mert a „szerkezet nélküli" régióknak is van szerkezete, csak nem olyan, amit a makroszkópikus világban vagy akár a globuláris domének atomi szintű vizsgálata során megszoktunk. A teljes hosszúságú kinázok, komplexeik és a foszfokapcsolók vizsgálatához a szerkezeti sokaságok, eloszlások, illetve a sokaság különböző állapotai közötti valószínűségek kezelése, mérése vagy legalábbis a modellezése szükséges. További fontos aspektusa lesz a foszforiláción alapuló biológiai szabályozás megértésének a rendszerszintű hatások kvantitatív leírására való törekvés. Ehhez konkrét, kísérletesen validálható *in silico* jelátviteli modellek kellenek, amik építenek a modellkomponensekre és a köztük lévő kapcsolatokra vonatkozó, szerkezeti biokémiai ismereteinkre. Fontos ugyanis ismerni, hogy egy kináz-szubsztrát kötés milyen felszíneken keresztül történik, mert a szubsztrátkötés például kompetícióban állhat az aktivátor kinázzal vagy a foszfatázokkal; illetve hogy milyen fehérjék jelenlétében vagy hiányában kerülhet a kináz aktív állapotba.

Az alábbiakban egy-egy példán keresztül fogom szemléltetni a szerkezeti biokémiai megközelítés jelentőségét a

kinázok fehérje-fehérje kölcsönhatásainak nagy léptékű feltárására és a foszfokapcsolók működésének rendszerszintű megértésére. A fehérjék rendezetlen régióiban található SLiM-ek (angolul: short linear motifs) fontos szerepet játszanak a kinázok más fehérjékhez való kötődésében. A SLiM-ek olyan rövid (3-25 aminosav hosszú) szakaszok, amelyekben a kötést kialakító aminosavak a szekvenciában egymáshoz közel helyezkednek el. Ez alapvetően különbözik a domének közötti interakciótól, ahol a kötésért felelős aminosavak mindkét fehérjéből a szekvenciában általában egymástól távol foglalnak helyet. A fentiek miatt a SLiM-ek szekvenciaalapú keresése könnyebb problémának tűnhet, de a SLiM-ek rövidségük miatt, illetve abból fakadóan, hogy a kötődéshez csak néhány (2-3, bár tipikusan inkább 4-5) pozícióban elhelyezkedő aminosav is elég lehet, szekvencia alapon nehezen azonosíthatóak megbízható módon. A lineáris motívumok egyre megbízhatóbb azonosítása a proteómban azonban nagymértékben segíthetné a proteómszintű foszforilációs mintázatok megértését. De a SLiM-ek csak laza konszenzusszekvenciát mutatnak, és az optimálisnak vélt szekvenciától nagymértékben eltérhetnek. Ezért a tisztán szekvenciaalapú *in silico* stratégiát célszerű kiegészíteni a SLiM és a kötőárka közötti, szerkezetalapú komplementaritásra vonatkozó szűréssel is. Ehhez természetesen rendelkezésre kell állnia néhány releváns kináz-SLiM peptid szerkezetnek. Egy ilyen szekvencia- és szerkezetalapú, hibrid megközelítéssel az ERK1/2, p38 és JNK MAP kinázok szubsztrátjainak a számát lehetett megbízható módon növelni (Zeke et al. 2015).

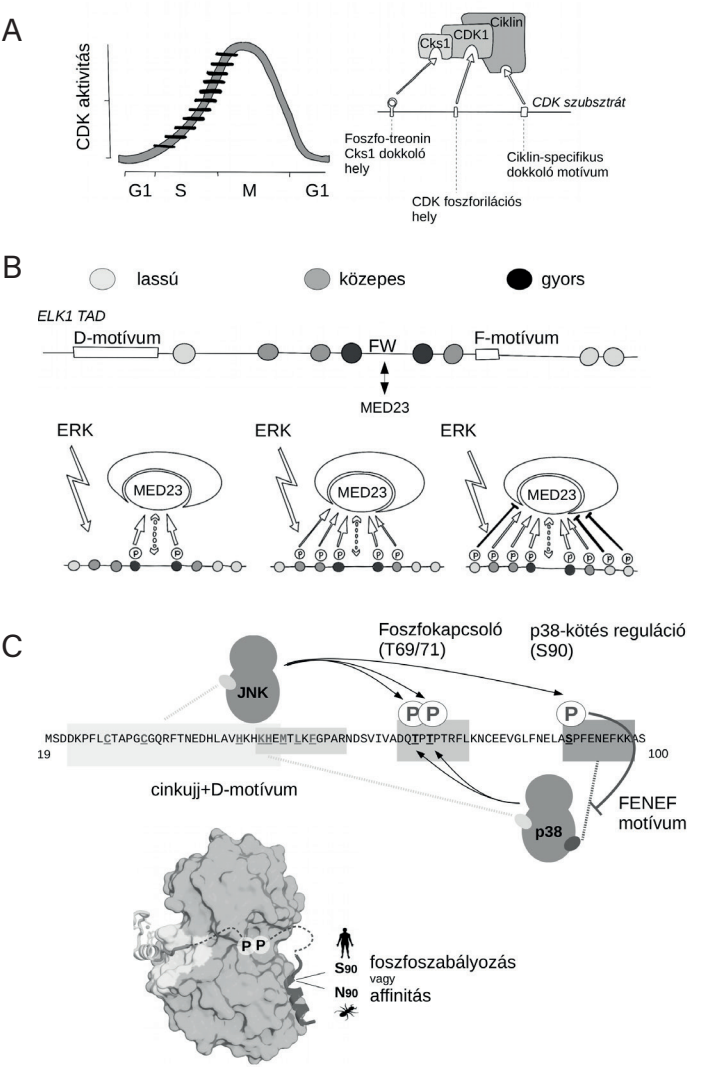
A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat az interakcióért felelős SLiM-ek foszforilációtól függő módon is szabályozhat-

ják. Fontos megemlíteni, hogy az ilyen foszfokapcsolók a legtöbb esetben nem kétállapotú váltókapcsolóként működnek, hanem a kölcsönhatás erősségét a foszforiláció csak kisebb mértékben módosítja, s a kölcsönhatási affinitás sokszor kevesebb mint egy nagyságrenddel változik (Gógl et al. 2019b). A foszfokapcsolók azonban nemcsak egy helyen, hanem több helyen is foszforilálódhatnak. Ezek a komplexebb, többhelyes foszfokapcsolók módosulhatnak egy adott kináz által több helyen vagy több kináz által is egyszerre. A foszfokapcsolók a foszforilcsoportok jelenlétére biofizikai/szerkezeti szempontból érzékenyek, és ez lehetővé teszi, hogy magasabb szintű biológiai regulációs mechanizmusok építőköveiként lehessen őket alkalmazni, például a zajszűrésben, ultraszenzitív viselkedésben vagy jelintegrációban. A következő részben bemutatom, hogy a ciklinfüggő kináz (CDK) aktivitásküszöbök milyen szerepet játszanak a sejtciklus-specifikus fehérjefoszforilációban, illetve a mitogénaktivált kinázok (MAPK) hogyan szabályoznak transzkripciós faktoraktivitásokat a MAPK-aktiváció erősségétől vagy többenzimes mintázatoktól függő módon.

A CDK sejtciklusfüggő aktivációját sejtciklus-specifikus ciklinek biztosítják. Az utóbbiak a sejtciklus fázisától függő specifikus kifejeződést mutatnak, azaz időben rendezik a CDK-aktivitás szinteket a sejtciklus során, amelyek azután eltérő CDK-szubsztrátfoszforilációs profilokat eredményeznek. De hogyan alakulnak ki a CDK-aktivitásoktól függő különböző szubsztrátfoszforilációs profilok a proteóm szintjén? Feltárták, hogy az élesztőgombában a CDK szubsztrátok foszforilációs rátáját egyszerre három faktor határozza meg: 1. az aktív hely specificitása, 2. a Cks1 adapter fehérje kötőhe-

lyének és 3. a ciklin alegység dokkoló árkához kötődő dokkoló motívumnak (SLiM) a megléte. A CDK1 komplexet alkot egy specifikus ciklinnel (allosztérikus aktivátor) és a Cks1 fehérjével (foszfo-treonin kötő adapter). A CDK aktív hely minimális S/T-P vagy teljes S/T-P-x-K/R targetszekvenciákat módosít, a ciklin a dokkoló motívumot tartalmazó szubsztrátrégiót köti, és a Cks1 alegység pedig a foszfo-treonin szubsztrát-helyekhez kötve elősegíti a közeli szubsztrátrégió további többhelyes foszforilációját. A ciklin-CDK-Csk1 komplex egy olyan foszforilációs gépezet, ami a rendezetlen CDK1 szubsztrátokat köti, és felépítéséből adódóan, rendezett módon hajtja végre a többhelyes szubsztrátfoszforilációt. A többhelyes foszforilációs kód hipotézise szerint a lineáris motívumok (foszforilációs helyek és kötőmotívumok) mintázata lényegében egy olyan vonalkód, ami a foszforiláció mértékét egyedi módon határozza meg minden CDK1 szubsztrát esetében (*20/A ábra).* A ciklin-CDK1-Cks1 komplex képes kiolvasni ezt a vonalkódot, és a CDK1 katalitikus domén aktivitását a sejtciklus egy adott időpontjában élesíti (Örd et al. 2019).

Korábban bemutattam, hogy a külvilági ingerekre adott fiziológiai válaszok a MAPK-k (ERK1/2, JNK, p38) komplex aktivitási mintázatait eredményezik. Az úgynevezett korai gének (például ELK1 vagy ATF2) által szabályozott transzkripciós válaszokat a MAPK jelpályák közvetlenül szabályozzák, és az általuk szabályozott gének átírási rátája a felülről érkező jelek erősségével van összefüggésben (Hazzalin & Mahadevan 2002). Az elsődleges válasz a külvilági jelre a transzkripciós faktor úgynevezett transzaktivációs régiójának (angolul TAD: transactivation domain) a MAPK-k általi foszforilációja. A TAD általában rendezetlen, és az ELK1



20. ábra. A foszfokapcsolók szabályozása

A) A CDK-aktivitásküszöbök révén kontrollált sejtciklus-specifikus szubsztrátfoszforiláció mechanisztikai alapját az egyes szubsztrátok lineáris motívumarchitektúrája adja (konkrétan a foszforilációs targethelyek, például SP vagy TP, illetve a kötőmotívumok egymástól való távolsága és relatív helyzete). B) Az ELK1 TAD és a génexpressziót elősegítő Mediátor komplex kölcsönhatásának szabályozása ERK általi foszforilációval. Az ELK1 transzkripciós faktor az FW motívumán keresztül kötődik a Mediátor komplex MED23 alegységéhez. A kötőhely környéken számos (8db) ERK foszforilációs hely van, melyek eltérő kinetikával foszforilálódnak attól függően, hogy milyen irányban és távolságra helyezkednek el az ERK-et kötő két dokkoló motívumtól (D- és F-motívumok). Kiderítették, hogy a gyors és közepes kinetikai rátával foszforiládó helyek az ELK1-MED23 kölcsönhatást segítik, míg a lassú helyek gátolják. Egy küszöb felett az ERK-aktivitás tehát az ELK1 transzkripciós aktivitását már csökkenteni fogja. C) Az ATF2 transzkripciót szabályozó régiójának (TAD) a szekvenciája a benne elhelyezkedő génexpressziót szabályozó foszfokapcsolóval (T69/T71), a JNK és a p38 MAPK-kat kötő cinkujj+D-motívummal és FENEF-motívummal, valamint a p38-kötést szabályozó S90 regulációs hellyel. A szerkezeti ábra alul a p38-ATF2(TAD) szerkezetét mutatja, kiemelve a kötést reguláló S90 (gerinctelenekben N90) pozíció helyét.

esetében a génexpresszióhoz szükséges Mediátor (transzkripciós koaktivátor) komplex egyik alegységéhez köt. A Mediátor kötőhely körül nyolc ERK foszforilációs hely helyezkedik el, és a régió még tartalmaz két különböző típusú ERK dokkoló motívumot (D- és F-motívumok; SLiM). Az ELK1

TAD-ban lévő ERK targethelyek foszforilációjának mértékét azok D- és F-motívumoktól való távolsága és relatív helyzete határozza meg. Az ERK által gyors kinetikával foszforilált helyek elősegítik, míg a lassú kinetikával foszforilálódó helyek csökkentik a transzkripciós koaktivátorral való interakciót (*20/B ábra).* Alacsony/közepes ERK jelátviteli pályaaktivitás hatására tehát az ELK1 TAD serkenti, míg magas ERK jelpálya-aktivitás hatására csökkenti az ELK1 által szabályozott gének átírását. Az ELK1 TAD-ban lévő többhelyes foszfokapcsoló érdekességét az adja, hogy egy kritikus bemeneti jelszint felett foszfatázok működése nélkül is képes saját maga kikapcsolására (Mylona et al. 2016).

Egy másik MAPK jelátvitelt vizsgáló tanulmányban az ATF2 TAD általi transzkripciós szabályozást vizsgálták, s itt is azt találták, hogy a rendezetlen ATF2 TAD-ban elhelyezkedő MAPK targethelyek és különböző MAPK kötőelemek egymáshoz való relatív elhelyezkedése, azaz a foszfokapcsoló lineáris architektúrája határozza meg azt, hogy a TAD hogyan válaszol a felülről jövő JNK és p38 MAPK jelpályák aktiválására. Az ATF2 TAD két egymáshoz nagyon közeli MAPK targethelyet tartalmaz (T69/71), és ezek JNK vagy p38 általi foszforilációja egyaránt serkenti a TAD által közvetített transzkripciót. A JNK kötéséhez szükséges D-motívum a T69/71-től N-terminális, míg a p38-kötéshez szükséges F-motívum C-terminális irányban helyezkedik el. Ez a fajta relatív elhelyezkedés a MAPK kötőhelyek és a transzkripciót kontrolláló foszforilációs hely között evolúciósan konzervált, de gerincesekben a TAD tartalmaz még egy JNK foszforilációs helyet (Ser90) is, ami a p38-at kötő F-motívum mellett helyezkedik el, és a p38-TAD kötést foszforiláció után gátolja

(*20/C ábra*). Az utóbbi miatt a gerincesekben az ATF2 TAD a két MAPK felől érkező jeleket nemcsak egyszerűen összesíti/integrálja – ami egyébként az eredeti funkciónak tűnik, és máig így maradt a gerinctelenekben –, hanem a két MAPK jelpálya relatív erősségétől függő módon közvetít a TAD által szabályozott folyamatok felé. Az új architektúrában ugyanis a megnövekedett JNK jelpálya-aktivitás egy bizonyos szint felett – a p38-ra ható negatív hatása miatt – inkább gátol a foszforilációs események ellenében dolgozó foszfatázok jelenlétében. A komplexebb szabályozást lehetővé tevő architektúra nagyon egyszerűen jött létre az eredeti gerinctelen típusúból. A gerinctelenekben ugyanis a Ser90-nek megfelelő pozícióban egy nem foszforilálható aszparagin aminosav van, ami optimális a p38-kötéshez, de gerincesekben ez mutálódott egy foszforilálható szerin aminosavra, amely foszforilálatlan állapotban még mindig erős p38-TAD kötést biztosít, foszforilált állapotban azonban interferál a kötőfelszínnel (Kirsch et al. 2020).

A génreguláció evolúciójának fontos mechanizmusa lehet, ha egy adott transzkripciós faktor jelpályáktól függő aktivitása megváltozik. A CEBPB (angolul: CCAAT/enhancer binding protein-) transzkripciós faktor és az őt szabályozó cAMP/PKA/GSK3 jelpálya szolgáltat erre egy érdekes példát. A mai méhlepényes emlősökben a CEBPB transzkripciós aktivitását befolyásoló fehérjerégióban a GSK3 által módosított targethelyek mutációk révén megváltoztak: két ősi hely eltűnt, és egy új más helyen megjelent. A fenti változások miatt a méhlepényes emlősök CEBPB regulátor szakaszának a szerkezete foszforilációra másképp változik meg a korábbiakhoz képest: a GSK3 által közvetített foszforilációs esemé-

nyek a CEBPB által szabályozott prolaktin hormon génjének az átírására már nem negatívan, hanem serkentőleg hatnak (Lynch et al. 2011).

A fenti példák szemléltetik, hogyan valósulhat meg komplex, az egyedi enzim aktivitásán túlmutató, rendszerszintű szabályozás a kináz kötőelemek és foszforilációs targetrégiók kombinálása révén a fehérjefoszforiláción alapuló jelátviteli rendszerekben. A szabályozás mértéke, de akár annak logikája is könnyen változhat a rendezetlen fehérjerégiók átalakulása során. Összegezve az itt leírtakat, láthatjuk, hogy a fehérjekináz-katalitikus domének, a kölcsönható partnerek és a foszforiláció révén szabályozott fehérjerégiók párhuzamos vizsgálata egyszerre szükséges a rendszerszintű megértéshez. Ezzel összhangban a jövőben a jelátviteli folyamatok kvantitatív leírásában a szerkezetileg korrekt alapokon felállított számítógépes modellek jelentősége nagymértékben nőni fog.

IRODALOM

Adam, K. & Hunter, T. (2018). Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Lab. Invest.* 98, 233–247.

Ahuja, L. G., Taylor, S. S. & Kornev, A. P. (2019). Tuning the "violin" of protein kinases: The role of dynamics-based allostery. *IUBMB Life* 71, 685–696.

Aldeghi, M., Gapsys, V. & de Groot, B. L. (2019). Predicting Kinase Inhibitor Resistance: Physics-Based and Data-Driven Approaches. *ACS Cent. Sci.* 5, 1468–1474.

Alexa, A., Varga, J. & Reményi, A. (2010). Scaffolds are "active" regulators of signaling modules. *FEBS J.* 277, 4376–4382.

Alexa, A., Gógl, G., Glatz, G., Garai, Á., Zeke, A., Varga, J., Dudás, E., Jeszenői, N., Bodor, A., Hetényi, C. et al. (2015). Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 2711–2716.

Alexa, A., Sok, P., Gross, F., Albert, K., Kobori, E., Póti, Á. L., Gógl, G., Bento, I., Kuang, E., Taylor, S. S. et al. (2022). A non-catalytic herpesviral protein reconfigures ERK-RSK signaling by targeting kinase docking systems in the host. *Nat. Commun.* 13, 472.

Attwood, M. M., Fabbro, D., Sokolov, A. V. Knapp, S. & Schiöth, H. B. (2021). Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 839–861.

Baker, M. D., Wolanin, P. M. & Stock, J. B. (2006). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* 28, 9–22.

Barford, D. & Johnson, L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 340, 609–616.

Bhattacharyya, R. P., Reményi, A., Yeh, B. J. & Lim, W. A. (2006a). Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular

interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Ann. Rev. Biochem.* 75, 655–680.

Bhattacharyya, R. P., Reményi, A., Good, M. C., Bashor, C. J., Falick, A. M. & Lim, W. A. (2006b). The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* 311, 822–826.

Bradshaw, J. M., Kubota, Y., Meyer, T. & Schulman, H. (2003). An ultrasensitive Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II-protein phosphatase 1 switch facilitates specificity in postsynaptic calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10512–10517.

Brent, R. & Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729–736.

Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859–869.

Chaikuad, A., Koch, P., Laufer, S. A. & Knapp, S. (2018). The Cysteinome of Protein Kinases as a Target in Drug Development. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57, 4372–4385.

Chen, M. J., Dixon, J. E. & Manning, G. (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci. Signal.* 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, 499–512.

Chung, L. K., Park, Y. H., Zheng, Y., Brodsky, I. E., Hearing, P., Kastner, D. L., Chae, J. J. & Bliska, J. B. (2016). The Yersinia Virulence Factor YopM Hijacks Host Kinases to Inhibit Type III Effector-Triggered Activation of the Pyrin Inflammasome. *Cell Host Microbe* 20, 296–306.

Cohen, P. (2002). Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309–315.

Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P. A. (2021). Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 551–569.

Creixell, P., Palmeri, A., Miller, C. J., Lou, H. J., Santini, C. C., Nielsen, M., Turk, B. E. & Linding, R. (2015a). Unmasking determinants of specificity in the human kinome. *Cell* 163, 187–201.

Creixell, P., Schoof, E. M., Simpson, C. D., Longden, J., Miller, C. J., Lou, H. J., Perryman, L., Cox, T. R., Zivanovic, N., Palmeri, A. et al. (2015b). Kinome-wide decoding of network-attacking mutations rewiring cancer signaling. *Cell* 163, 202–217.

Cui, J., Xiao, J., Tagliabracci, V. S., Wen, J., Rahdar, M. & Dixon, J. E. (2015). A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *Elife* 4, e06120.

Cumming, J. G., Debreczeni, J. É., Edfeldt, F., Evertsson, E., Harrison, M., Holdgate, G. A., James, M. J., Lamont, S. G., Oldham, K., Sullivan, J. E. et al. (2015). Discovery and Characterization of MAPK-activated Protein Kinase-2 Prevention of Activation Inhibitors. *J. Med. Chem.* 58, 278–293.

Damle, N. P. & Köhn, M. (2019). The human DEPhOsphorylation Database DEPOD: 2019 update. Database (Oxford). 2019.

Dovat, S., Ronni, T., Russell, D., Ferrini, R., Cobb, B. S. & Smale, S. T. (2002). A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes Dev.* 16, 2985–2990.

Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. H., Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Copeland, T. D., Ahn, N. G., Oskarsson, M. K., Fukasawa, K., Paull, K. D. et al. (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734–737.

Eckhart, W., Hutchinson, M. A. & Hunter, T. (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18, 925–933.

Essegian, D., Khurana, R., Stathias, V. & Schürer, S. C. (2020). The Clinical Kinase Index: A Method to Prioritize Understudied Kinases as Drug Targets for the Treatment of Cancer. *Cell Reports. Med.* 1, 100128.

Gógl, G., Schneider, K. D., Yeh, B. J., Alam, N., Nguyen Ba, A. N., Moses, A. M., Hetényi, C., Reményi, A. & Weiss, E. L. (2015). The Structure of an NDR/LATS Kinase-Mob Complex Reveals a Novel Kinase-Coactivator System and Substrate Docking Mechanism. *PLoS Biol.* 13, e1002146.

Gógl, G., Kornev, A. P., Reményi, A. & Taylor, S. S. (2019a). Disordered Protein Kinase Regions in Regulation of Kinase Domain Cores. *Trends Biochem. Sci.* 44.

Gógl, G., Biri-Kovács, B., Durbesson, F., Jane, P., Nomine, Y., Kostmann, C., Bilics, V., Simon, M., Reményi, A., Vincentelli, R. et al. (2019b). Rewiring of RSK–PDZ Interactome by Linear Motif Phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 431.

Gógl, G., Biri-Kovács, B., Póti, A. L., Vadászi, H., Szeder, B., Bodor, A., Schlosser, G., Ács, A., Turiák, L., Buday, L. et al. (2017). Dynamic control of RSK complexes by phosphoswitch-based regulation. *FEBS J.*

Good, M., Tang, G., Singleton, J., Reményi, A. & Lim, W. A. (2009). The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* 136, 1085–1097.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N. & Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876–880.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52.

Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L. C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 30–40.

Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J. & Shoelson, S. E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92, 441–450.

Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V. & Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 43, D512-20.

Huang, C. Y. F. & Ferrell, J. E. (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10078–10083.

Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L. & Hendrickson, W. A. (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746–754.

Hunter, T. (2014). The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a020644.

Huse, M. & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275–282.

Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O'Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z. & Dunker, A. K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 32, 1037–1049.

Kanev, G. K., de Graaf, C., de Esch, I. J. P., Leurs, R., Würdinger, T., Westerman, B. A. & Kooistra, A.J. (2019). The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 818–832.

Kholodenko, B. N. (2006). Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 165–176.

Kirsch, K., Zeke, A., Tőke, O., Sok, P., Sethi, A., Sebő, A., Kumar, G. S., Egri, P., Póti, Á. L., Gooley, P. et al. (2020). Co-regulation of the transcription controlling ATF2 phosphoswitch by JNK and p38. *Nat. Commun.* 11.

Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407–414.

Kornev, A. P. & Taylor, S. S. (2015). Dynamics-Driven Allostery in Protein Kinases. *Trends Biochem. Sci.* 40, 628–647.

Kung, J. E. & Jura, N. (2016). Structural Basis for the Non-catalytic Functions of Protein Kinases. *Structure* 24, 7–24.

Lake, D., Corrêa, S. A. L. & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4397–4413.

Lim, W. A. & Pawson, T. (2010). Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 142, 661–667.

Lynch, V. J., May, G. & Wagner, G. P. (2011). Regulatory evolution through divergence of a phosphoswitch in the transcription factor CEBPB. *Nature* 480, 383–386.

Mace, P. D. & Murphy, J. M. (2021). There's more to death than life: Noncatalytic functions in kinase and pseudokinase signaling. *J. Biol. Chem.* 296, 100705.

Malleshaiah, M. K., Shahrezaei, V., Swain, P. S. & Michnick, S.W. (2010). The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature* 465, 101–105.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002a). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.

Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002b). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27, 514–520.

McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B. & Dixon, J. E. (2003). The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 18514–18523.

Miller, C. J. & Turk, B.E. (2018). Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. *Trends Biochem. Sci.* 43, 380–394.

Minguez, P., Letunic, I., Parca, L., Garcia-Alonso, L., Dopazo, J., Huerta-Cepas, J. & Bork, P. (2015). PTMcode v2: a resource for functional associations of post-translational modifications within and between proteins. *Nucleic Acids Res.* 43, D494–D502.

Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J. & Orth, K. (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211–1214.

Mylona, A., Theillet, F.-X., Foster, C., Cheng, T. M., Miralles, F., Bates, P. A., Selenko, P. & Treisman, R. (2016). Opposing effects of Elk-1 multisite phosphorylation shape its response to ERK activation. *Science* 354, 233–237.

Nguyen, K.-S. H., Kobayashi, S. & Costa, D. B. (2009). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin. Lung Cancer* 10, 281–289.

Örd, M., Möll, K., Agerova, A., Kivi, R., Faustova, I., Venta, R., Valk, E. & Loog, M. (2019). Multisite phosphorylation code of CDK. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 649–658.

Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191–203.

Pawson, T. & Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445–452.

Pawson, T. & Scott, J. D. (2005). Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* 30, 286–290.

Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R. et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679–684.

Reményi, A., Schöler, H. R. & Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 812–815.

Reményi, A., Good, M. C. & Lim, W. A. (2006). Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 676–685.

Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D. P., Dathan, N. A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B. & Kraus, M. H. (1995). Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267, 381–383.

Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B. & Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938–1942.

Serber, Z. & Ferrell, J. E. (2007). Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell* 128, 441–444.

Sok, P., Gógl, G., Kumar, G. S., Alexa, A., Singh, N., Kirsch, K., Sebő, A., Drahos, L., Gáspári, Z., Peti, W. et al. (2020). MAP Kinase-Mediated Activation of RSK1 and MK2 Substrate Kinases. *Structure* 28, 1101–1113.e5.

Sreelatha, A., Yee, S. S., Lopez, V. A., Park, B. C., Kinch, L. N., Pilch, S., Servage, K. A., Zhang, J., Jiou, J., Karasiewicz-Urbańska, M. et al. (2018). Protein AMPylation by an Evolutionarily Conserved Pseudokinase. *Cell* 175, 809–821.e19.

Strickfaden, S. C., Winters, M. J., Ben-Ari, G., Lamson, R. E., Tyers, M. & Pryciak, P. M. M. (2007). A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell* 128, 519–531.

Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M. & Kornev, A. P. (2012). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 2517–2528.

Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. & Dominguez, R. (2004). Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429, 780–784.

Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 530–541.

Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D. et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855–867.

Wang, C., Hockerman, S., Jacobsen, E. J., Alippe, Y., Selness, S. R., Hope, H. R., Hirsch, J. L., Mnich, S. J., Saabye, M. J., Hood, W. F. et al. (2018). Selective inhibition of the p38α MAPK–MK2 axis inhibits inflammatory cues including inflammasome priming signals. *J. Exp. Med.* 215, 1315–1325.

Xu, W., Harrison, S. C. & Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595–602.

Yaffe, M. B. & Elia, A. E. H. (2001). Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 131–138.

Yun, C.-H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M. & Eck, M. J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 11, 217–227.

Zeke, A., Lukács, M., Lim, W. A. & Reményi, A. (2009). Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol.* 19, 364–374.

Zeke, A., Bastys, T., Alexa, A., Garai, Á., Mészáros, B., Kirsch, K., Dosztányi, Z., Kalinina, O. V. & Reményi, A. (2015). Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *Mol. Syst. Biol.* 11, 837.

Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 A resolution. *Nature* 367, 704–711.

Zhang, J., Adrián, F. J., Jahnke, W., Cowan-Jacob, S. W., Li, A. G., Iacob, R. E., Sim, T., Powers, J., Dierks, C., Sun, F. et al. (2010). Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* 463, 501–506.

Zschiedrich, C. P., Keidel, V. & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J. Mol. Biol.* 428, 3752–3775.