

GÓGL GERGŐ–NYITRAY LÁSZLÓ–REMÉNYI ATTILA

A sejtes élet és halál urai

A protein-kináz alapú jelátviteli komplexek

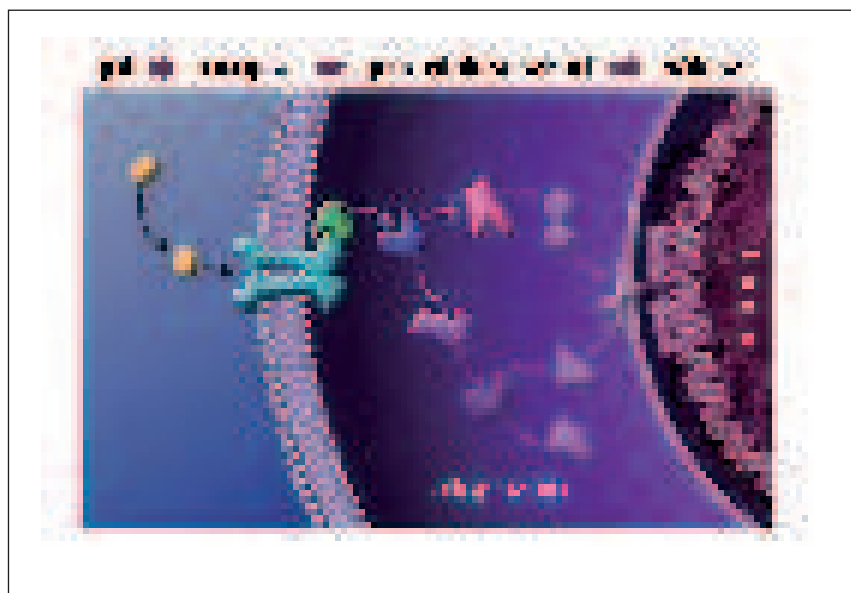
Szervezetünkben mindennapos a sejt-halál, az egészséges élethez elengedhetetlen az egyensúly a szabályozott módon végbemenő sejtsztódás és pusztulás között. Ha a mérleg az egyik irányba billen ki, akkor rákos sejtburjánzás, ha a másikba, akkor krónikus gyulladás indul be. Persze a különböző szövetekben nagymértékben eltérő lehet a két antagonisztikus folyamat aránya. Például vannak a felnőtt korban is gyorsan regenerálódó szövetek (pl. máj- vagy hámsejtek) és vannak osztódásban sokkal inkább gátoltak (pl. idegsejtek). Az egyes szövetekre, sejttípusokra jellemző osztódási képesség beállításában jelátviteli szakosodott enzimek, *protein-kinázok* vesznek részt. *Jelátvitel* alatt azt értjük, hogy a sejtek a külső környezetükből érkező információra (ez a „jel”) molekuláris szintű szabályozó lépéseken keresztül valamilyen biológiai válaszreakciót adnak. A protein-kináz enzimek a sejt energiaraktáraként szolgáló ATP-molekulából származó foszfátcsoport „mozgatásán” keresztül fejtik ki hatásukat. A foszfátcsoport kovalens kötéssel a célfehérjék meghatározott oldalláncaira kerülhet. (Megjegyzendő, hogy ez reverzibilis, ún. posztranszlációs szabályozás, s a foszfátcsoport eltávolítását végző protein-foszfátáz enzimek is fontos szerepet játszanak a sejtek életében, de ebben a cikkben csak a protein-kinázok szerepével foglalkozunk.)

A protein-kinázok a foszforilációval közvetlenül a célfehérjék aktivitását változtatják meg, míg hosszabb távon transzkripciós faktorok (génexpressziót szabályozó fehérjék) foszforilációján keresztül akár egyszerre számos gén kifejeződését, azaz számos fehérje termelődését is befolyásolhatják. További fontos tulajdonsága a kinázokon alapuló jelátviteli útvonalaknak, hogy egyrészt egymás aktivitását is foszforilációval szabályozzák, protein-kináz „kaszádokat” hoznak létre, másrészt az aktivitásukat más fehérjékkel kialakuló kölcsönhatások is szabályozzák. Összefoglalóan úgy is fogalmazhatunk, hogy a protein-kinázok olyan *molekuláris irányítóközpontok*, amelyek arra jöttek létre, hogy más fehérjék működésének módosításán keresztül a sejtmozgást, az anyagcserét, a sejtnövekedést, a sejtdifferenciációt, a gének kifejeződését és sok más sejtbiológiai folyamatot szabályozzanak. Hogyan működnek ezek a foszforiláción és fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapuló szabályozó gépezetek, mi a

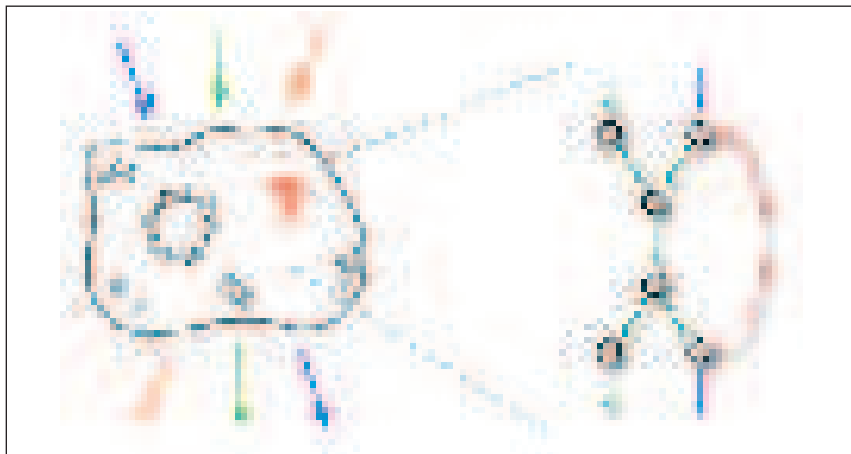
szerepük a rákban és a gyulladásozó folyamatokban? Lehetséges-e, hogy a megértésükön keresztül közelebb kerüljünk az említett két betegség gyógyításához?

A kérdések megválaszolásához két dologra kell szem előtt tartanunk. Az egyik, hogy fel kell tárnunk a protein-kinázok kölcsönhatási hálózatát, s hogy ezek miként szerveződnek jelátviteli útvonalakba, egymásba fonódó jelátviteli hálózatokba. A másik, hogy meg kell ismernünk a protein-kinázok atomi felbontású szerkezetét, hiszen a fehérjék működésének megértéséhez elengedhetetlen a szerkezeti biológia megközelítés. Ezek az ismeretek azért is fontosak, mert a rákos vagy gyulladá-

sos tüneteket produkáló, „félresiklott” sejtek működését „helyrehozni” gyógyszermolekulák segítségével – nem kívánt mellékhatások nélkül – csak úgy leszünk képesek, ha a fontos szabályozó fehérjék szerkezetét és azoknak egy nagyobb fehérjehálózaton belül betöltött szerepét egyaránt jól ismerjük. A továbbiakban röviden ismertetjük azokat a szerkezeti biológiai eredményeket, amelyeket az ELTE Biokémiai Tanszékén és az MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében dolgozó két kutatócsoport ért el 2015-ben. Továbbá bemutatjuk, hogy ezek az eredmények a jövőben hogyan segíthetik azokat a kutatásokat, amelyek az áttétképzés-



1. ábra. A sejtes jelátviteli folyamatok egyszerű sémája. Általában a jel érzékelése a sejtmembránban elhelyezkedő fehérjereceptorokhoz való kötődés után a sejtmembránban valamilyen génkifejeződési válaszhoz vezet (de a hatás sok más citoplazmatikus folyamat is lehet, pl. a sejt alakját, a sejtváz dinamikáját befolyásoló válaszok). A sejtmembránban és sejtmagban zajló jelátviteli események között a kapcsolatot legtöbbször egy protein-kinázoktól függő, többlépcsős jelátviteli útvonal (pl. protein-kináz „kaszád”) teremti meg. A jelátviteli útvonalak komplex, de jól jellemezhető hálózatot alkotnak, ahol az egyes komponensek az evolúció során kialakult jelátviteli logika mentén kapcsolódnak egymáshoz. Ezeknek a hálózatoknak a protein-kinázokon kívül komponensei lehetnek ún. másodlagos hírvívó kis-molekulák vagy ionok, adapterfehérjék (amelyek a receptorokat kapcsolják össze alsóbb szintű komponensekkel), a molekuláris kapcsolóként működő G-fehérjék (amelyek GTP-t kötött állapotban aktívak, GDP kötött állapotban inaktívak), az utóbbiakat szabályozó fehérjék (pl. GEF-ek) vagy a protein-kinázokkal ellentétes működésű (a foszfátcsoportot eltávolító) protein-foszfátázok



2. ábra. Jelátviteli hálózatok. A sejteket folyamatosan bemenetek (ingerek) érik, amire jelátvitel révén kimeneteket (biológiai válaszokat) generálnak. A bemeneteket és kimeneteket összekapcsoló jelátviteli pályák közös komponenseken is osztoznak, sőt sokszor pozitív vagy negatív (piros) visszacsatolásokat is tartalmaznak, tehát sokszor komplex hálózatos felépítést mutatnak

re hajlamos melanómákban vagy a herpeszvírus-fertőzés hatására kialakuló szarkómákban „túlhajtott” sejtnövekedés megállítására alkalmas gyógyszerek előállítására irányulnak.

Sejtjeink a környezetükből érkező jelekre folyamatosan válaszolnak. A sejt számára ingerek lehetnek olyan kémia vagy fizikai természetű hatások, melyek a sejtek vagy a belőlük felépülő organizmusok szempontjából fontosak. Kémiai hatás lehet például egy hormon jelenléte a véráramban. Az ingerek jelátviteli pályák bemeneteinek tekinthetők, és érzékelésük fehérjereceptorokon keresztül zajlik, az ingerre adott biológiai válasz pedig olyan sejten belül lejátszódó biokémiai és sejtbiológiai folyamatok összességeként írható le, melyek egy adott inger hatására váltódnak ki. Biológiai válasz például a hámsejtek osztódása növekedési faktorok (kisebb fehérjék) hatására. Sok esetben a külvilágból érkező ingerek a sejtmagban gének átírását indítják el. Biológiai válaszok tehát a jelátviteli pályák kimenetei (1. ábra).

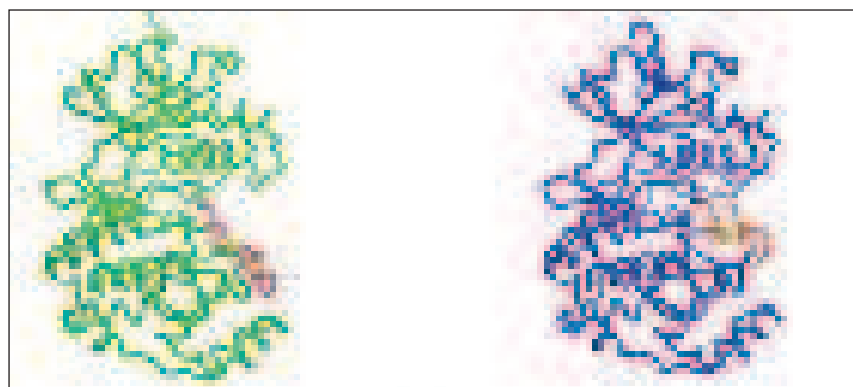
Klasszikus értelemben a jelátviteli pálya olyan fehérjékből és másodlagos hírvívó molekulákból vagy ionokból (pl. ciklikus-AMP, kalciumion) álló többkomponensű „kaszád”, amely egy bemenetet egy kimenettel kapcsol össze. Például a vérben az inzulin koncentráció növekedéséért és a vércukorszint csökkentéséért felelős glükóz-transzporter fehérje működése között kapcsolatot teremtő jelátviteli molekulákat nevezhetjük a *glükóz felhasználást serkentő jelpályának*. Ennek egymást követő elemei a következők: inzulin → inzulinreceptor → IRS adapterfehérje → PI3-kináz enzim → PIP3 (egy foszfolipid másodlagos hírvívó) → Akt protein-kináz → egy GEF fehérje → Rab G-protein → GLUT4 (glükóz-transzporter). Ez a példa jól szemlélteti, hogy az inzulin és a GLUT4 nevű, a glükóz felvételét elősegítő membrántranszporter fehérje aktivációja kö-

zött sok köztes lépés van. Ezek összessége szükséges ahhoz, hogy a GLUT4-et tartalmazó intracelluláris vezikulumok (membránnal határolt „zsákocskák”) fúziója a sejtmembránnal megtörténjen: ennek hatására pl. a máj- vagy az izomsejtek képessé válnak a szőlőcukor vérből történő felvételére.

Az előző példától eltérően, a jelátviteli pályák nagyon sokszor sejtmagi válasszal végződnek. Ilyen például a növekedési faktorok (vagy a növekedési hormon) hatása a sejtszaporodást szabályozó ún. korai növekedést stimuláló gének átírására (pl. c-Fos, c-Jun transzkripció faktorok), amelyek az-

tán további, a sejtosztódást serkentő gének átírását (pl. ciklin-D) serkentik. Egy konkrét növekedési faktor, az EGF (epidermális növekedési faktor) hatására aktiválódó jelátviteli molekulák csoportját nevezhetjük az *EGF sejtosztódást serkentő jelpályának*. Ennek egymást követő elemei a következők: EGF → EGF receptor → Grb2 adapter → Sos GEF → Ras G-protein → B-RAF → MEK1 → ERK2 protein-kinázok (az utóbbi három enzim a jelpálya protein-kináz kaszkád három, egymást aktiváló szintjének egy-egy képviselője; az ERK2 egy ún. MAP-kináz, s ezt az elnevezést a teljes jelpályára is használják). Fontos megjegyeznünk, hogy a humán tumorok nagy hányadában ez a jelpálya túlműködik. Ennek oka az lehet, hogy vagy az EGF receptor túltermelődik, vagy a Ras fehérje vagy valamelyik protein-kináz enzim génjében olyan mutáció történik, ami a külső jeltől függetlenül „bekapcsolt” állapotban tartja a jelpálya adott komponensét, amire a sejt kontroll nélküli sejtburjánzással válaszol.

A sejtek jelfeldolgozása során a bemenet és kimenet társítását nem lineáris módon szerveződött jelpályák összességeként kell elképzelnünk (2. ábra). A jelátvitel inkább olyan folyamat, melynek során a sejt a környezetből érkező ingerek hatására egy erre specializálódott fehérjékből felépülő komplex hálózat segítségével a beérkező ingerek összességétől függő biológia választ ad. Az emberi gondolkodás számára könnyebben kezelhető lineáris felépítésű jelátviteli pályák tehát „áthallanak”, „átbeszélnek” egymásba, és inkább *hálózatos felépítést* mutatnak: az egyes jelátviteli fehérjéken tehát több jelpálya



3. ábra. Az ERK2 protein-kináz szerkezeti modellje. Az inaktív (zöld) és az aktív (kék) állapot közötti lényeges különbség az aktivációs hurok (bíbor; a foszforilálódó treonin és tirozin aminosavak pedig sárgák) szerkezetében van, amely foszforiláció hatására más szerkezetet vesz fel. Az aktív állapotban ugyanis a foszforilált állapotú aktivációs hurok szerkezete teszi lehetővé, hogy az enzim más fehérjéket szubsztrátként megkössön és azokat foszforiláció révén a megfelelő aminosavakon módosítsa. Az ERK2 kinázt a MEK1 kináz foszforilálta, a foszforilált ERK2 pedig a jeltovábbítás következő lépésében az RSK1 nevű kinázt lesz képes foszforilálni. Az RSK1 pedig a sejt növekedési szempontból már egy „végrehajtó” protein-kináz, ugyanis a riboszómális (és más) fehérjék foszforilációján keresztül fokozott riboszóma-aktivitást, fehérjeszintézist indít be, ami elengedhetetlen a sejt növekedéshez



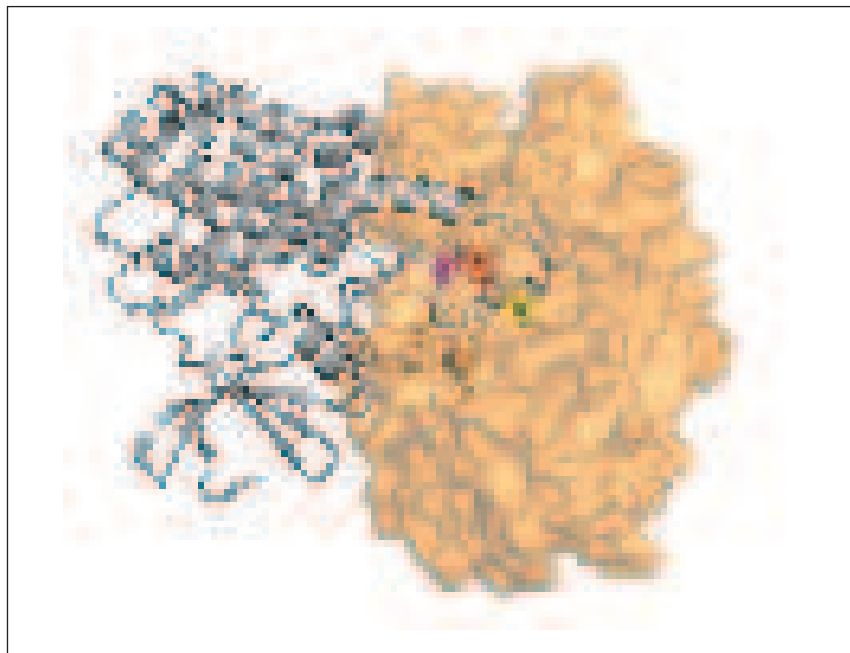
4. ábra. Egy fehérje térszerkezetének meghatározása röntgendiffrakciós eljárással. A bal oldali panel egy gélelektroforézis eredményét mutatja, ahol a sötét sávok egy-egy fehérjeláncot jeleznek. A jobb szélső sávban látható minta a kromatográfiás módszerekkel tisztított, vizsgálni kívánt fehérjét tartalmazza, amelyet rekombináns DNS-módszerekkel baktériumsejtekben hoztunk létre (a középső sávban a sejtől kivont összes fehérje látható). A tiszta fehérjemintából növesztett fehérjekristályokban elhelyezkedő molekulák röntgensugárforrásba helyezve szórják azokat. Ha ezt a diffrakciós mintázatot egy detektor segítségével rögzítjük, akkor egy „matematikai lencse” segítségével a fehérje-térszerkezet visszaszámolható, s így egy háromdimenziós szerkezeti modellt kapunk. A jobb oldali panel egy protein-kináz molekuláris grafikai, ún. szalagmodelljét mutatja, ahol a polipeptidlánc gerincének lefutását (ez a fehérje másodlagos szerkezete) spirális szalag (α -helikális régió), nyíllal ellátott lapos szalag (β -lemez) vagy az ezeket összekötő egyszerű vonalas ábrázolással tüntettük fel; az ATP-t az aktív hely közelében bordó színű pálcikamodell jelzi

is oszthat egyszerre. Például a korábban említett glükózfelhasználást serkentő pálya nem független az EGF sejtosztódást serkentő pályájától. Az inzulin például a MAP-kináz jelpályán keresztül be tudja kapcsolni a korai sejtosztódást fokozó gének átíródását, így sejtszaporodást is tud serkenteni.

Jelátviteli pályák felépítését vizsgálva felmerül a kérdés, hogy az egyes komponensek hogyan hatnak egymásra, hogyan „kommunikálnak” egymással. A kommunikáció jelátviteli fehérjék esetében nagyon sokszor a már korábban említett reverzibilis foszforiláció révén megy végbe. Ilyenkor egy erősen negatívan töltött kémiai csoport kerül a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncaira és ez alapvetően megváltoztathatja az erre érzékeny fehérjék működését. Foszforiláció hatására megváltozik a fehérje szerkezete, ezért megváltoznak a jelátviteli hálózatok komponensei közötti kölcsönhatások és a komponensek enzimatisz aktivitása is. A jelátviteli fehérjék szerkezete „plasztikus”, könnyen megváltozik, ezért egyfajta *molekuláris kapcsolóként* működhetnek. Ezekre a kapcsolókra jó példák a protein-kinázok és azon belül is a mitogén-aktivált protein-kinázok (MAPK) csoportja (3. ábra).

Az ERK2 nevű protein-kináz az EGF jelpálya egyik legfontosabb kapcsoló állomása. EGF nélkül, amit egyébként a sejtek egy dedikált sejtfelszíni receptoron (EGF receptor) keresztül érzékelnek és „fognak be” a külvilágból, a sejtekben az ERK2 nem-foszforilált (defoszforilált) állapotban van. EGF hatására azonban a receptortól a már említett jelátviteli komponenseken át beindul a protein-kináz kaszkád, amely az ERK2 ún.

aktivációs hurok régiójának foszforilációján keresztül bekapcsolja az enzimet. Szerkezeti biokémiai módszerekkel meghatározhatjuk a nem-foszforilált és foszforilált ERK2 térszerkezetét. Ha a fehérjét sikerül a kétféle

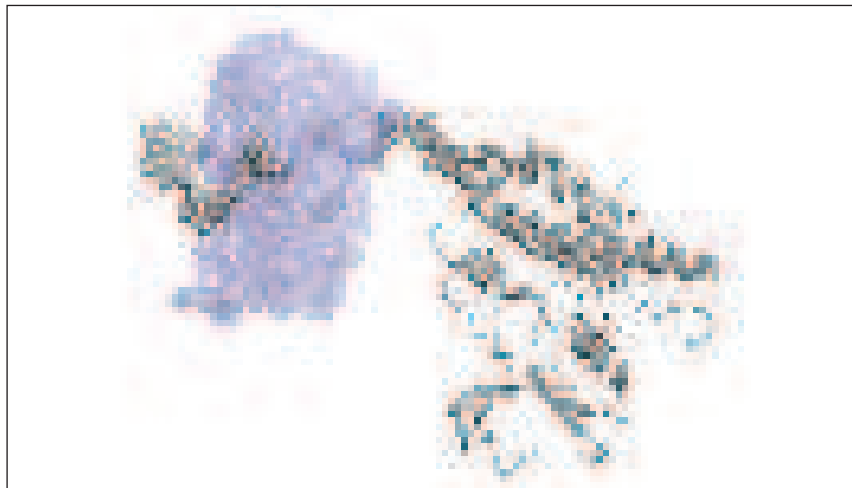


5. ábra. A sejt növekedés egyik irányító központjának szerkezete. Az ábra az ERK2-RSK1 protein-kinázok (narancs és szürke) kölcsönhatásának molekuláris felvételét mutatja. A sárga színnel jelzett fehérjeszakasz egy molekuláris kapcsoló elvén működik, a narancssárga fehérje ezt a részt módosítja, ezáltal a szürkét aktív állapotba löki, s ez végül sejtosztódást indít be. Fenti háromdimenziós, atomi felbontású térkép segítségével olyan hatóanyagot tervezhetünk, ami a kapcsolót folyamatosan „kikapcsol” állapotban tartja, s így rákos folyamatok ellenében képes hatni

állapotban előállítanunk és kristályosodásra bími, akkor egy röntgendiffrakción alapuló módszerrel visszafejthetjük az atomok egymáshoz való térbeli viszonyát, azaz meghatározhatjuk a fehérje atomi felbontású szerkezetét (4. ábra).

A röntgendiffrakciós módszer alkalmas fehérjekomplexek, tehát akár a jelátviteli kaszkád több komponensét tartalmazó „irányítóközpont” térszerkezeti modelljének a létrehozására is. Ezekkel az atomi felbontású térbeli térképekkel felszerelve aztán vizsgálhatjuk azokat a molekuláris erőket, amelyek a komplexek komponenseit összetartják, amelyek a két fehérje közötti molekuláris felismerésért felelősek. A tavalyi év során elsőként nekünk sikerült az ERK2-RSK1 komplex térbeli szerkezetét és részletes működési mechanizmusát feltárni (Alexa és mtsai, 2015, 5. ábra).

Ahogy már említettük, a legtöbb rákos betegségben az EGF jelpálya „túlpörög”: a sejtek fokozottan érzékenyek lesznek bármilyen növekedést serkentő hormonra, sőt attól teljesen függetlenehetnek. Ez az ERK2 fokozott foszforilációjához és ezen keresztül fokozott aktivitásához vezet. A kapcsoló tehát folyamatosan bekapcsolt állapotba kerül, ami végül a sejtosztódás-sejthalál közötti egyensúly megbomlását, s így patológiás sejtosztódást eredményez.



6. ábra. Melanoma specifikus „hibás” irányítóközpont szerkezete. Az ábrán az ERK2-RSK1 sejtnövekedést szabályzó irányítóközpont egyik tagja (RSK1, szürke szalagmodell ábrázolással) és a melanomára jellemző S100B (kék felszínnel) között kialakuló „hibás” központ felvételét mutatja. Itt nem egy klasszikus „statikus”, hanem egy dinamikus, időben változó szerkezetű komplexet láthatunk (a szakirodalom „bolyhos” komplexnek nevezi ezeket), s ezért az RSK1 egyik végén elhelyezkedő S100B kötőrégióját nem pontos atomi térképpel (szalagábrázolással) jelezzük, hanem csak aminosavszinten ábrázoljuk gömbökkel

Ezért a gyógyszerfejlesztők olyan hatóanyagokat kerestek, amelyek az ERK2 foszforilációt valamilyen módon gátolják. Így születtek a rák kezelésére használt EGF-receptor, Ras és B-RAF inhibitorok. Ezek általában nagyon hatékonyak, mert az EGF jelpálya enzimeinek az aktivitását közvetlenül gátolják. Hosszabb távon azonban a célfehérjékben olyan mutációk halmozódnak fel, amelyek a hatóanyagok hatását semlegesítik, gyógyszer-rezisztencia lép fel. A jelpálya működését azonban nemcsak a közties enzimek aktivitásán keresztül lehet gátolni, hanem a komponensek kölcsönhatásainak gátlásán keresztül is, ami egy új gyógyszerfejlesztési irányzat. Ez ma még kiaknázatlan terület, egyrészt mert a jelátviteli szempontból aktív protein-kináz alapú komplexekkel technikailag nehéz dolgozni, másrészt nagyobb kihívás a fehérje-fehérje kölcsönható felszínéhez kötődő fajlagos hatóanyagot találni, illetve tervezni.

Érdekes módon, léteznek olyan természetes mechanizmusok is, amelyek például az ERK2-RSK1 irányító központ működésének megváltoztatásán keresztül működnek. A Kaposi szarkómát okozó humán herpeszvírus 8 (HHV8) egyik fehérjeje – talán a sejtostódásban játszott központi szerepe miatt – épp az ERK-RSK komplex aktivitásának a modulátora (Avey és mtsai, 2015). A vírusfehérje az ERK-RSK komplexhez kötődve valahogyan eléri, hogy a protein-kinázok nagyobb aktivitást mutatnak a vírussal fertőzött sejtekben.

A fenti irányító központot a metasztázisra hajlamos melanómasejtekben viszont egy

kalciumkötő fehérje, a kizárólag gerinces állatokban előforduló S100 fehérjecsald egyik tagja, az S100B tudja szabályozni (Hartmann és mtsai, 2014). Jól ismert, hogy az intracelluláris kalciumion-koncentráció megemelkedése fokozza a sejtszaporodást, méghozzá egy olyan jeltovábbítási úton, amelyet többféle sejtnövekedési jel is be tud indítani. Az útvonal kulcsenzime a foszfolipáz-C, amely az inozitol-triszfoszfát (IP₃) nevű másodlagos hírvivő szintéziséért felelős, az IP₃ pedig a kalciumion-raktárként is funkcionáló endoplazmatikus retikulum membránjában található specifikus csatornaféhrjéket nyit meg. A megemelkedett kalciumionszint a kétértékű kationt specifikusan kötő szabályozófehérjéket aktivál, amelyek felelősek a biológiai válaszreakció beindításáért. A simaizomsejtekben például a Ca²⁺ a kalmódulin nevű fehérjéhez kötődik, az utóbbi aktivál egy protein-kinázt, az pedig bekapcsolja az izomkontrakcióért felelős miozin motorfehérjét. A melanómasejtekben a kalciumionok az S100B fehérjéhez kötődve váltják ki a rosszindulatú sejtszaporodást. Az S100B a vérszérumban a melanómák előrehaladott állapotát jelző diagnosztikai markerfehérje, azonban a sejtburjánzásban betöltött szerepét eddig pontosan nem ismerték. Egy 2014-ben megjelent kutatási eredményből kiindulva – amely az RSK1 protein-kináz és az S100B közötti kölcsönhatást kimutatta – sikerült meghatározni az RSK1-S100B komplex térszerkezetét, ami molekuláris szintű magyarázatot ad arra, hogy az S100B

hogyan hat az ERK2-RSK1 komplex aktivitására (Gógl és mtsai, 2016, **6. ábra**). Eredményünk fontosságát kiemeli, hogy korábban már klinikai kísérleteket végeztek olyan kismolekula-hatóanyagokkal, ami az S100B fehérjét gátolja, de „rossz felszín” megcélözva, a kísérletek nem vezettek eredményre. A mi szerkezeti vizsgálatunk azonban egy olyan, korábban nem ismert kölcsönhatási felszínre tárt fel, ami a jövőben célpontul szolgálhat az eddigieknél hatékonyabb gyógyszerfejlesztési kutatások számára.

Kutatócsoportjainkban jelenleg azokat a szintén irányító központoknak tekinthető protein-kináz komplexeket tanulmányozzuk, amelyek a sejtszaporodással ellentétben a sejthalál (apoptózis) beindításában játszanak fontos szerepet. Talán meglepő, de ezek szerkezetükben akár hasonlóak is lehetnek az ERK2-RSK1 sejtnövekedést stimuláló komplexhez, azonban a jelátviteli hálózatok evolúciója során teljesen más sejtleletani folyamat szabályozása lett a feladatuk. Továbbá vizsgáljuk a MAP-kináz és a kalciumion közvetített jelpályák további lehetséges „át-hallásait”, amelyek szintén fontos sejtleletani folyamatokban tölthetnek be eddig fel nem ismert szabályozó működéseket.

Összefoglalóan, ma úgy gondoljuk, hogy az ismertetett és hasonló szerkezetbiológiai tanulmányok vezethetnek el a sejtet élet és halál egyensúlyát szabályozó protein-kináz komplexek és kalciumkötő fehérjék működésének olyan szintű megértéséhez, amiből kiindulva eséllyel vehetjük fel a harcot az egyensúly kibillenéséből eredő betegségek gyógyításáért. ♦

Irodalom

- Alexa, A. et al., 2015. Structural assembly of the signaling competent ERK2-RSK1 heterodimeric protein kinase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), pp.2711–6.
- Gógl, G. et al., 2016. Structural basis of ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) inhibition by S100B Protein: modulation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling cascade in a calcium-dependent way. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(1), pp.11–27.
- Avey, D. et al., 2015. Phosphoproteomic analysis of KSHV-infected cells reveals roles of ORF45-activated RSK during lytic Replication. *PLoS pathogens*, 11(7), p.e1004993.
- Hartman et al., 2014. Complex formation between S100B protein and the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) in malignant melanoma is calcium-dependent and inhibits extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mediated phosphorylation of RSK. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(18):12886–95.