

REMÉNYI ATTILA

# FEHÉRJEKINÁZOK

# ÚJ TUDOMÁNYOS ZSEBKÖNYVTÁR

ÉLETTUDOMÁNYOK

REMÉNYI ATTILA

# FEHÉRJEKINÁZOK

FUNKCIÓ ÉS SZERKEZET



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](http://www.typotex.hu)  
és a [facebook.com/typotexkiado](https://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

<b>ELŐSZÓ</b>	7
<b>1. BEVEZETÉS</b>	11
<b>2. A FEHÉRJEFOZFORILÁCIÓ JELENTŐSÉGE ÉS EVOLÚCIÓJA</b>	23
<b>3. A FEHÉRJEKINÁZOK ÉS -FOSZFATÁZOK SZEREPE A SEJTES JELÁTVITELI FOLYAMATOKBAN</b>	39
<b>4. A FEHÉRJEKINÁZOK SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE</b>	51
<b>5. A HUMÁN KINÓM</b>	63
<b>6. SZERIN-/TREONIN- ÉS TIROZINKINÁZOK</b>	71
<b>7. PSZEUDOKINÁZOK</b>	83
<b>8. A FEHÉRJEKINÁZOK KÖLCSÖNHATÁSAI MÁS FEHÉRJÉKKEL ÉS EGYMÁSSAL</b>	91
<b>9. FEHÉRJEKINÁZ ALAPÚ JELÁTVITELI KASZKÁDOK</b>	105
<b>10. A FEHÉRJEKINÁZOK PATOLÓGIÁS MŰKÖDÉSE</b>	119
<b>11. HATÓANYAG-TERVEZÉS</b>	131
<b>12. SZERKEZETALAPÚ RENDSZERBIOLÓGIA</b>	147
<b>IRODALOM</b>	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 humánélet-tani 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 bemutatassa 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 foszfopteomikai technikák érzékenységének fejlődésével folyamatosan növekszik. Egyes tanulmányok ma már 50-80% ilyen fehérjéről írnak – így ez a folyamat a sejtés 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, CKI, 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 funkcionálnak, 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 sejtjelátvitelben?

Miért nincs minden kináznak egy semlegesítő foszfatáza?

Hogyan működnek a fehérjekinázok mint molekuláris kapcsolók?

Hány fehérjekináza 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 sejtjelátvitel 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, transzkripciófaktorok) együttműködve tesszik. 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 éri 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 tudunk meg a fehérjekinázok különböző organizmusokban betöltött szerepéről (2. fejezet), felfedezték a fe-

hérjefoszfátázokat (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. fejezet). 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 szerkezeti 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 enzimatis 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 analizésén 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 teljeseedett 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-

héjkinázok 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.

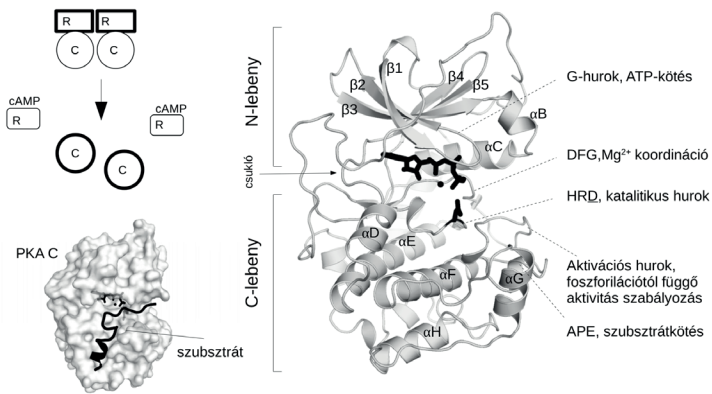
A következőkben három különböző fehérjekináz szerkezetének a részletesebb bemutatására kerül sor, ami szemlélteti ennek a jelátviteli enzimsopornak a működését. A proteinkináz A (PKA) a sejten belüli ciklikus adenosinmonofoszfát (cAMP) másodlagos hírvivő molekula érzékelésére szakosodott enzim. A PKA 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 inhibitorzakaszt (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  $\alpha$ -hélixekből álló kompakt C-terminális és  $\beta$ -lemezekből álló N-terminális lebenyből állnak, amelyeket a flexibilis csukló régió 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  $\gamma$ -foszfát-csoportjának a közelében helyezkednek el (*1. ábra*). Ez a kétlebenyes struktúra lehetővé teszi, hogy a foszfortranszfer-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 fehérjekinázok 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 kinázkaszád 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 ( $\alpha$ -hélixek és  $\beta$ -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 miatt 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