

Az első NDR/LATS kináz-koaktivátor komplex szerkezete

Gógl Gergő

TDK dolgozat



Témavezető:

Dr. Reményi Attila, tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

2013.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
0. Összefoglaló	4
1. Bevezetés	
1.1 Fehérje kinázok	5
1.2 NDR/LATS kinázok és koaktivátorai	6
2. Célkitűzés	7
3. Anyagok és módszerek	
3.1 Fehérje expresszió, tisztítás	8
3.2 Kristályosítás	9
3.3 Adatgyűjtés, szerkezetmeghatározás	10
3.4 Fluoreszcencia polarizáció	11
4. Eredmények	
4.1 Szubsztrát dokkoló motívum kvantitatív analízise és a kölcsönhatási régió minimalizálása	12
4.2 Cbk1-Mob2 szerkezetének meghatározása	13
4.3 Hidrofób motívum	16
4.4 Dokkoló felszín feltérképezése, ellenőrzése	17
5. Eredmények összefoglalása	18
6. Köszönetnyilvánítás	19
7. Hivatkozások	19
8. Nyilatkozat	20
9. Függelék	21

Rövidítésjegyzék

AMPPNP	5'-adenilil-béta, gamma-imidodifoszfát
Å	Ångström (10^{-10} m)
ADP	Adenozin-difoszfát
AGC	PKA, PKG, PKC szerű kinázok
ATP	adenozin-trifoszfát
BOG	Oktil-béta-D-glücopiranozid
β-ME	Béta-merkaptotanol
Cbk1	Cell wall biosynthesis kinase 1
CHAPS	3-[(3- Kolamidopropil)dimetilammonium]-1-propánszulfonát
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
FP	Fluoreszcencia polarizáció
HM	Hidrofób motívum
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozid
LATS	Large tumor suppressor homolog
LB (agarlemez/tápoldat)	Luria Bertani
Mob	Mps One Binder
NDR	Nuclear Dbf2 Related kinase
PBS	foszfát tartalmú só (phosphate buffered saline)
PDK	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PEG	polietilén-glikol
pep	peptid
ROCK	Rho-associated protein kinase 1
rpm	percenkénti fordulatszám (round per minute)
RSK	90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TCEP	tris(2-carboxietil)foszfin hidroklorid
TEV-proteáz	Tobacco etch vírus proteáz
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

0. Összefoglaló

Az NDR/LATS kinázok a sejtnövekedést szabályzó "Hippo" jelátviteli rendszer terminális elemei. Noha az utóbbi évek kutatásai sokat feltártak ennek a jelpályának a fontosságáról, szerkezeti oldalról nincs ismeretünk az itt működő fehérje kinázokról. Munkám során az élesztő NDR/LATS kináz koaktivátorával (Cbk1-Mob2) alkotott komplexének végeztem el szerkezeti-funkcionális karakterizálását röntgenkristallográfiai és klasszikus biokémiai módszerekkel. Ennek során meghatároztam a fehérjecsoport első szerkezeteit, amelyek mintaként szolgálhatnak a jövőben más organizmusból származó (pl. emlős) komplexekhez. A megoldott szerkezetek rámutattak a fehérje szerkezetében végbemenő allosztérikus folyamatokra és strukturális átrendeződésekre. A Cbk1 kináz szubsztrátjaihoz lineáris motívumokon keresztül kötődik és ez a fiziológiai szubsztrátok aktiválásának robosztusságát növeli. A Cbk1-Mob2 szerkezet lehetővé tette az itt működő szubsztrát dokkoló mechanizmus részletes analízisét is és in silico fehérje-peptid dokkoló számításokkal azonosítottam a dokkoló peptid kötő Cbk1 felszínt, melyet aztán fehérje-fehérje kölcsönhatás mérésére alkalmas módszerekkel bizonyítottam.

1. Bevezető

1.1 Fehérje kinázok

Az eukarióta szervezetek egyik legfontosabb poszttranszlációs módosítása a fehérje-foszforiláció, amelyet kinázok hajtanak végre főleg szerin vagy treonin illetve tirozin oldalláncokon. Fontosságukat jól jelzi, hogy a humán genom 2%-át a kinom, azaz különféle kinázok összessége teszi ki. A kinázok olyan katalitikus enzimek, amelyek egy ATP molekula γ -foszfát csoportját képesek más fehérjékre kapcsolni, ezáltal megváltoztatva azok biokémiai viselkedését. A kinázok prokarióta eredetű enzimek és magas szerkezeti és regulációs hasonlóságokkal rendelkeznek ¹. A kinázok két-lebenyes felépítésűek. A két lebeny egy mozgékony csuklón keresztül van összekötve, ami megengedi a lebenyek egymáshoz viszonyított mozgását a kináz inaktív állapotában. A mozgékonyabb N-terminális lebeny 5 β -redőt és egy a kinázok allosztérikus regulációjában fontos szerepet játszó (α C) hélixet tartalmaz, fő funkciója az ATP kötése, annak a foszfortranszfer reakcióhoz optimális konformációban való tartása, illetve az ADP gyors eleresztése. Előbbiekben közvetett, de létfontosságú szerepe van az α C hélixnek, utóbbiban pedig az első két β -redő által kialakított P-huroknak, ami az ATP β - és γ -foszfátját koordinálja. A nagyobb méretű C-terminális lebeny hét hélixből épül fel és a fő funkciója a (foszforilációs) szubsztrát motívum kötése. Ezen a lebenyen található meg az aktivációs hurok, amit két konzervált szekvencia motívum határol körbe: a Mg^{2+} kötésben szerepet játszó DFG és az α F hélixel stabil kötődést kialakító APE motívum. Általánosan elmondható, hogy ez a hurok alapállapotban flexibilis, így elfedi az aktív helyet a potenciális szubsztrátok elől. Foszforiláció hatására a hurok átrendeződik és az enzim szubsztrát kötőképes állapotba kerül, azaz aktívvá válik.

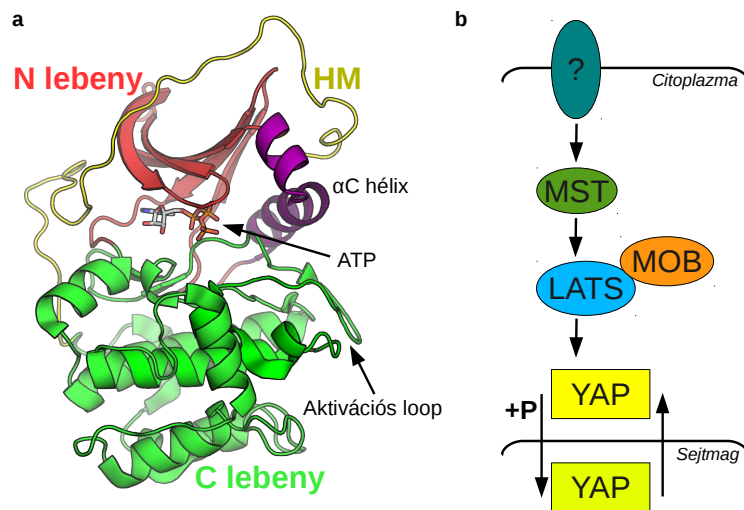
A kinázok egy jól körülhatárolható csoportja az AGC kinázok (**1. ábra**) ². Ezek allosztérikus módon szabályozott enzimek. Alapállapotukban rendezetlen, vagy kimozdult α C hélix-szel rendelkeznek, amely így nem tudja stabilizálni az ATP kötést. Az AGC kinázok egy jól karakterizált lefutású C-terminálissal rendelkeznek a klasszikus kináz domén kiegészítéseként. Ennek része az ún. hidrofób motívum (HM), amely képes visszakötődni az α C hélix mellé, stabilizálva ezzel annak kötött konformációját, ami pedig az aktív állapot létrejöttében fontos lépés ³. A jelenség általános az AGC kinázok között, azonban a mechanizmus igencsak változatos: Több kináz esetében (pl.: PKA) a visszakötődés csak foszforiláció hatására történik meg. Bizonyos kinázoknál a HM foszforilációja után nem intramolekulárisan köt be, hanem intermolekulárisan egy AGC mesterkinázhoz (PDK), ami a kötődés hatására fogja felaktiválni a kinázt (pl.: RSK). Egy harmadik típusú mechanizmus pedig az, ahol a HM foszforiláció függetlenül konstitutíven kötődik (pl.: ROCK).

1.2 NDR/LATS kinázok és koaktivátoraik

A Hippo jelátviteli útvonal egy konzervált eukarióta mechanizmus, amely szerepet játszik a sejtosztódás, a differenciáció és az apoptózis regulációjában, illetve a sejt morfológiájának kialakításában. E jelátviteli pálya terminális elemei az NDR/LATS kinázok, amelyeket Mst/Hippo kinázok aktiválnak (**F1 ábra**). A *Drosophila* Warts és az emlős ortológja (LATS) a sejtosztódást és a sejt túlélését tartja ellenőrzés alatt a Yorkie (*Drosophila*) és YAP/TAZ (emlős) transzkripciók koaktivátor foszforilációjával, amely megakadályozza a sejtmagba való bejutásukat (**1. ábra**)⁴. Az emlős NDR kinázok fontos szerepet játszhatnak a centroméra duplikációjában⁵. Az élesztő *Saccharomyces cerevisiae*-ben két jelátviteli útban játszanak szerepet NDR/LATS kinázok: a MEN (Mitotic Exit Network) az M fázisból G1 fázisba való átlépést koordinálja, a RAM hálózat pedig az utódsejt szeparációját szabályozza⁶.

Az NDR/LATS kinázokhoz stabilan kötődnek Mob koaktivátorok (Mps one binder), ami elengedhetetlen a kinázok aktivációjában^{7 8 9}. Noha a kötődés szerkezeti oldala, ill. hatásának mechanizmusa eddig tisztázatlan, klasszikus biokémiai módszerekkel sikerült meghatározni, hogy a kináz domén N-terminális kiterjesztéséhez kötődnek. Akárcsak más AGC kinázok, az NDR/LATS-ok részben a HM foszforilációja által is szabályozódnak. Az NDR/LATS kinázok egyedi aktivációs hurokkal rendelkeznek, amely a HM foszforilációját követően auto-foszforilálódik, ami a kináz aktiválódásának kulcsfontosságú lépése. Korábbi munkákból feltételezhető, hogy az aktivációs hurok kizárólag NDR/LATS kinázokra jellemző inszerciója auto-inhibítor funkcióval rendelkezik, ami foszforiláció hatására intramolekuláris átrendeződésen keresztül szabadul fel.

A kinázok megadott szekvencia motívummal rendelkező helyeket képesek foszforilálni. Ez azonban gyakran nem szolgáltat kellő szelektivitással egy hatékony jelátviteli rendszer kialakításához, ahhoz egyéb szelektivitást növelő faktorokra van szükség. Erre egy megoldás az ún. lineáris motívumok, vagy más néven dokkoló motívumok használata. Ezek olyan rövid interakciós elemek, amelyek fehérjék rendezetlen részeiben találhatóak és kölcsönhatásokat tudnak létrehozni a partnerfehérjének egy adott felszínével. Egy korábbi tanulmányban, naív bioinformatikai módszerekkel sikerült azonosítani az élesztő proteomban elterjedt, konzervált [FY]xFP motívumokat (ahol az első pozíció fenilalanin vagy tirozin, a második pozíció pedig tetszőleges aminosav), amelyekről utóbb sikerült bebizonyítani, hogy képesek az élesztő Cbk1-Mob2 fehérje komplexhez kötődni. Ezek olyan konzervált motívumok, amelyeket *in vitro* és *in vivo* mutálva is jelentős aktivitás (ill. fenotípus) csökkenés volt megfigyelhető. Ezekből arra következtetünk, hogy a Cbk1 dokkoló motívumok az enzim-szubsztrát reakció specifikitása mellett annak robusztusságát növeli.



1. ábra – Egy AGC kináz és az emlős LATS útvonal vázlatos felépítése. **a** Az AGC kinázok a hagyományos kétlebenyes kináz doménen túl tartalmaznak egy C-terminális inszerciót (sárga), amely a hidrofób motívumban végződik, amely az α C hélixet (lila) stabilizálva visszakötődik az N lebenyhez. **b** A membrán felől ismeretlen mechanizmuson keresztül érkező jel fogja aktiválni az MST kinázt, ami ezután foszforilálni fogja a LATS kinázt. Ez egy koaktivátor Mob kötése és további autofoszforiláció után foszforilálni fogja a YAP transzkripció koaktivátort, amely szükséges a magi lokalizációjához.

2. Célkitűzés

Az utóbbi években az NDR/LATS kinázok funkciójára rengeteg érdekes felfedezés született, azonban biokémiai szabályzásuk mögött rejlő szerkezeti sajátosságait eddig azonban még nem sikerült felderíteni. Céлом az élesztő Cbk1-Mob2 funkcionális komplex szerkezetének meghatározása röntgenkristallográfiás úton. Mivel az NDR/LATS kinázok és koaktivátoraikkal alkotott komplexeik evolúciósan konzerváltak élesztőtől emberig (mind szekvenciálisan, mind funkcionálisan), ezért a Cbk1-Mob2 komplex egyben szerkezeti mintaként szolgálhat majd további emlős NDR/LATS kinázokra és koaktivátorral alkotott komplexeihez is. További célom a korábban említett rövid ún. dokkoló motívumok Cbk1-Mob2 komplexhez való kötődésének feltárása szerkezeti oldalról.

A munkám az amerikai Northwestern University-n kutató Eric L. Weiss és az ELTE-n kutató Reményi Attila együttműködésének részeként valósult meg. A Weiss Labor a Cbk1 kináz jelátviteli szerepét vizsgáló in vivo és biokémiai kutatásokat végezte, míg a Reményi Labor a Cbk1 fehérje kölcsönhatásainak vizsgálataival kapcsolódó szerkezeti biokémia munkát vállalta. A bemutatott szerkezeti munka és biokémiai kötődésvizsgálatok teljes egészében az ELTE Biokémiai Tanszéken és az MTA TTK Molekuláris Farmakológiai Intézetben dr Reményi Attila témavezetésével valósultak meg. A munkám során használt expressziós DNS konstrukciókat Kyle Schneider PhD diák állította elő a Weiss Laborból. A fehérje termeléshez és tisztításhoz, biokémiai kötődési vizsgálatokhoz, illetve a röntgendiffrakciós szerkezet megoldáshoz kapcsolódó munkát egyedül végeztem a Reményi Laborban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Fehérje expresszió, tisztítás

A használt DNS konstrukciókat a Weiss laborban készítették. A Cbk1 ($\Delta 1-250$)-Mob2 (45-287) komplex egy bicisztronos (MG960) vektorba lett klónozva, ahol a Cbk1 N-terminális TEV hasítható His₆ címkével rendelkezik, a Mob2 pedig N-terminális TEV hasítható GST címkével termelhető. Mivel a komplex tagjai ortogonális címkékkel rendelkeznek, ezért lehetséges a komplex keresztbe tisztítása, amit a kölcsönhatás erőssége is megenged.

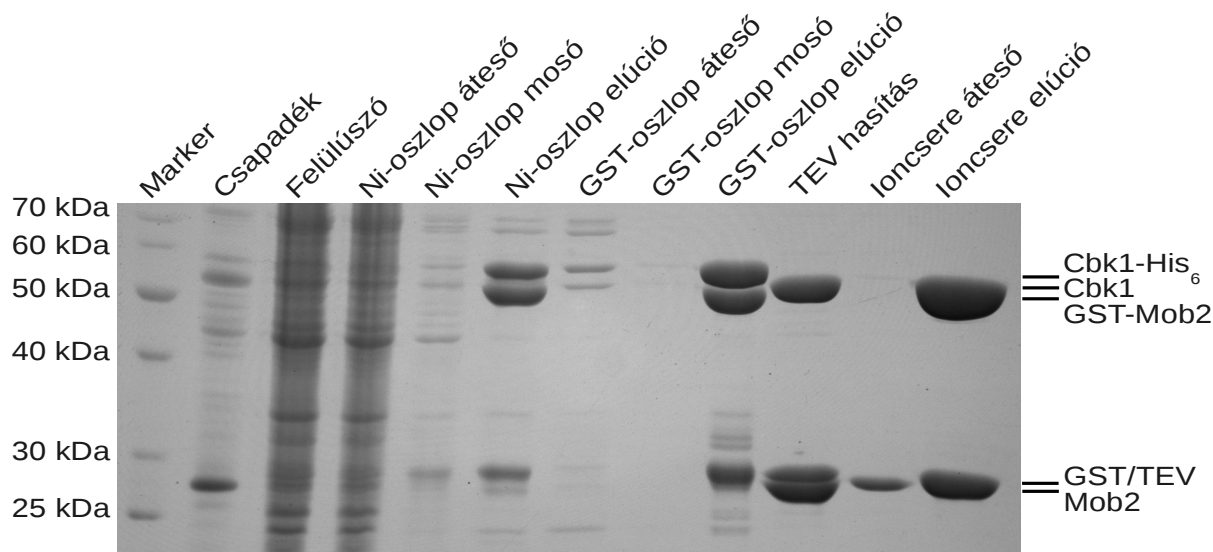
A fehérjék expressziójához *Escherichia Coli* Rosetta pLysS (DE3) sejteket használtam. A transzformált sejteket ampicillin és kloramphenicol antibiotikumok mellett egy éjszakán át LB médiumban növesztettem, majd a felnövesztett kultúrából 10ml-t adtam az 1l-es LB médiumba. A sejt-kultúrát (szintén ampicillin és kloramphenicol antibiotikumok mellett) OD=0.6-0.7-ig növesztettem 37°C-on, majd 0.5 mM IPTG hozzáadásával indítottam el a 3 órán át tartó expresziót 25°C-on.

Az expresszió végén a sejteket centrifugálással gyűjtöttem össze (Beckman Coulter Avanti J-26 XPI, 10', 5000rpm, 4°C), majd PBS-sel (Phosphate-Buffered Saline) történő mosás után lízis pufferben szuszpendáltam fel (50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 0.2% CHAPS, 2mM β -ME, pH=8). A sejt-szuszpenziót folyékony nitrogénben fagyasztottam, amit felolvadás után még kétszer megismételtem. A sejtek feltárását szonikálással fejeztem be (Brason SONIFER, minimum 3x1'), majd a lizátumhoz DNázt adva (~30 μ g/ml) centrifugálással választottam el az oldhatatlan részeket (Beckman Coulter Avanti J-26 XPI, 30', 20000rpm, 4°C). A fehérjét a felülúszóból nyertem ki Ni-gyanta hozzáadásával (ennek használt mennyisége nagyjából 40mg várható fehérje / 1 ml gyanta). A felülúszót a gyantával 30'-ig inkubáltam 4°C-on, kevertetve, majd kromatográfiás oszlopra töltöttem. A leülepedett gyantát 20 oszloptérfogat mosóI (50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 40mM imidazol, 2mM β -ME, pH=8), majd 20 oszloptérfogat mosóII (20mM TRIS, 1M NaCl, 20mM imidazol, 2mM β -ME, pH=8) pufferrel mostam, végül 5 oszloptérfogat elúciós pufferrel (20mM TRIS, 200mM NaCl, 400mM imidazol, 10% glicerín, 0.2% BOG, 2mM β -ME, pH=8) eluáltam le a fehérjét a gyantáról. Az így kinyert, affinitás tisztított fehérjék minőségét SDS-PAGE segítségével ellenőriztem, mennyiségét Bradford-reagens hozzáadásával, 595nm-es hullámhosszon történő fényelnyelés alapján határoztam meg. Az affinitás tisztított fehérjét 2mM TCEP hozzáadása után folyékony nitrogénben fagyasztottam.

Az eluátumot desztillált vízzel a duplájára hígítva GST gyantát adtam hozzá. A kötési reakció fél órára 4°C-on történő inkubáció alatt zajlott le. Ezután a gyantát 10 oszloptérfogat mosó pufferrel mostam (20mM TRIS, 100mM NaCl, 0.1% Igepal, 2mM β -ME, pH=8), majd egy oszloptérfogatnyi elúciós pufferrel eluáltam (20mM TRIS, 150mM NaCl, 10% glicerín, 0.1% Igepal, 2mM β -ME, 15mM

redukált glutation, pH=8). A dupla affinitás tisztított fehérjét 2mM TCEP hozzáadása után folyékony nitrogénben fagyasztottam.

Ioncserélés előtti napon a fehérjéhez tisztított TEV proteázt adtam, majd éjszakára 4°C-on hagytam dializálódni az ioncseréhez használt A pufferrel megegyező oldatban (20mM Hepes, 50mM NaCl, 10% glicerín, 2mM β -ME, pH=7). Az ioncserélést AKTA Explorer készülékkel, 1 ml-es GE Resource S oszlopon végeztem. Az oszlopra való felvitelt a leírt A pufferben végeztem, a fehérje eluálódását só gradienssel értem el (B puffer: 20mM Hepes, 1M NaCl, 10% glicerín, 2mM β -ME, pH=7). Az inocsere oszlopról egy csúcsban távozott a sztöchiometrikus komplex. A frakciókat egybegyűjtve, 2mM TCEP hozzáadása után 10 mg/ml koncentrációra koncentráltam (2. ábra).



2. ábra – A kristályosításra szánt fehérje komplex tisztításának lépései SDS gélen.

3.2 Kristályosítás

A Cbk1-Mob2 komplex szerkezetének meghatározásához a 4-6 mg/ml koncentrációjú sztöchiometrikus komplexhez hozzáadtam 2 mM AMPPNP-t (hasíthatatlan ATP analóg), 2 mM $MgCl_2$ -ot és 2mM TCEP-et. Minden kristályosításra szánt fehérje tartalmazott egy inaktiváló D475A mutációt és némelyik fehérjén egy további, HM foszforilációt utánozó mutáció is jelen volt (T743E). Az inaktiváló mutáció gátolja a fehérje autofoszforilációját, ezáltal foszforiláció szempontjából homogén fehérjével tudtam dolgozni. A HM foszforilációját utánozó mutáció ismerten megnöveli a kináz aktivitását, tehát ezzel a módosított fehérjével a kináz egy aktív konformációt szerettük volna megfogni. A kristályosítási kondíciók egy QIAGEN PEG SUITE I-re épülő saját screen alapján lettek kiválasztva, ahol a nagy ionerősségű és extrém pH-jú körülményeket elhagytuk, ill. módosítottuk. A kristályok kizárólag Microbatch lemezekon nőttek, 1:1 szilikon:paraffin olaj elegye alatt, 23°C-on. Minden kristályhoz 10% glicerín volt adva folyékony nitrogénben történő fagyasztás előtt.

Tetragonális kristályok nőttek a Cbk1(D475A/T743E)-Mob2 konstrukcióval 25% PEG20000, 0.1M Na-citrát (pH=5.5) mellett, amelyek 4.5 Å felbontásig diffraktáltak. A diffrakciós határ növelése érdekében négyszeres moláris feleslegű SSD1 dokkoló peptid (TTEQSDFKFP) jelenlétében is próbáltam kristályosítani. Lemezes kristályok nőttek mind a Cbk1(D475A/T743E)-Mob2, mind a Cbk1(D475A)-Mob2 konstrukcióval az előzővel identikus kondícióban. Ezek a kristályok 3.6 és 3.3 Å felbontásig diffraktáltak. Sajnos a peptidet nem sikerült az elektronsűrűség térképbe beépíteni.

3.3 Adatgyűjtés, szerkezetmeghatározás

Adatgyűjtést a svájci PSI-ben (Paul Scherrer Institut) található SLS (Swiss Light Source) szinkrotronon a PXI (normál és mikrodiffraktométer, PILATUS 6M detektor) és a PXIII (PILATUS 2M detektor) sugárforrásokon végeztem 100K-en, 1.00 Å hullámhosszú sugarat használva.

A diffrakciós képeket XDS program segítségével integráltam ki és skáláztam össze ¹⁰. A fázisproblémát molekuláris helyettesítés módszerrel oldottam meg a már ismert humán Mob1 homológ szerkezetet és a humán ROCKI kináz domént használva kereső modellnek ^{11 12}. Ehhez a Phaser programot használtam (CCP4/Phenix programcsomag) ¹³. A szerkezetfinomítás kezdeti szakaszában a Refmac5 (CCP4), végső szakaszában a Phenix, a modellépítéshez pedig minden esetben a Coot szoftvereket használtam (**1. táblázat**)^{14 15}.

A molekuláris helyettesítés során egy komplexet sikerült azonosítanom a 4.5 Å felbontású Cbk1(D475A/T743E)-Mob2 kristályban. Ezzel megegyező domén elrendeződésű komplexet sikerült azonosítanom a 3.3 Å felbontású Cbk1(D475A)-Mob2 kristály aszimmetrikus egységében és további két identikus heterodimert azonosítottam a 3.6 Å felbontású Cbk1(D475A/T743E)-Mob2 kristály aszimmetrikus egységében.

A dolgozatban szereplő kihagyásos elektronsűrűség térképek számításakor a vizsgált molekuláris részlet betöltöttségét 0-ra állítottam, majd szimulált hőkezelés (simulated annealing) módban futtattam egy modellfinomítást, ezáltal a bemutatott térképek modellhibától minimálisan terheltek csak. Az ábrákon feltüntetett térképek minden esetben 2F_o-F_c térképek, 1σ szinten ábrázolva. A dolgozatban szereplő ábrák generálásához Pymol-t használtam.

1. Táblázat Adatgyűjtések és a szerkezetfinomítások statisztikái

	Cbk1(D475A/T743E)– Mob2	Cbk1(D475A/T743E)– Mob2†	Cbk1(D475A)– Mob2†
Adatgyűjtés			
Térceport	P 4 ₁ 2 ₁ 2	C 1 2 1	C 1 2 1
Cella dimenziók			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	129.38, 129.38, 231.69	79.74, 139.06, 187.58	138.43, 79.98, 117.58
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90.1, 90	90, 117.6, 90
Felbontás (Å)	49.59–4.5 (4.66–4.5)*	46.49–3.6 (3.69–3.6)	47.34–3.3 (3.39–3.3)
<i>R</i> _{merge}	4.9 (67)	6.4 (45)	8.8 (68)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	23.26 (2.83)	14.60 (2.52)	13.86 (2.26)
Komplettség (%)	99.97 (100)	98.8 (91.5)	99.4 (99.8)
Redundancia	4.3 (4.3)	3.4 (3.0)	3.4 (3.1)
Finomítás			
Felbontás (Å)	49.59–4.5	46.49–3.6	47.34–3.3
Reflexiók	12260	23527	17276
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.2876/0.3104	0.2580/0.3194	0.2704/0.3068
Atomok száma			
Fehérje	4100	7467	4030
Ligandum	31	31	31
Víz	0	0	0
B-faktorok			
Fehérje	149.1	111.1	104.5
Ligandum	169.5	61.0	93.3
Víz	-	-	-
R.m.s eltérések			
Kötéshossz (Å)	0.007	0.011	0.011
Kötésszög (°)	1.73	1.87	1.86

Minden adat egyetlen egykristályról lett mérve.

†Ezek a kristályok az SSD1 peptid jelenlétében nőttek.

*A legmagasabb felbontású hélyra vonatkozó adatok zárójelben vannak feltüntetve.

3.4 Fluoreszcencia polarizáció (FP)

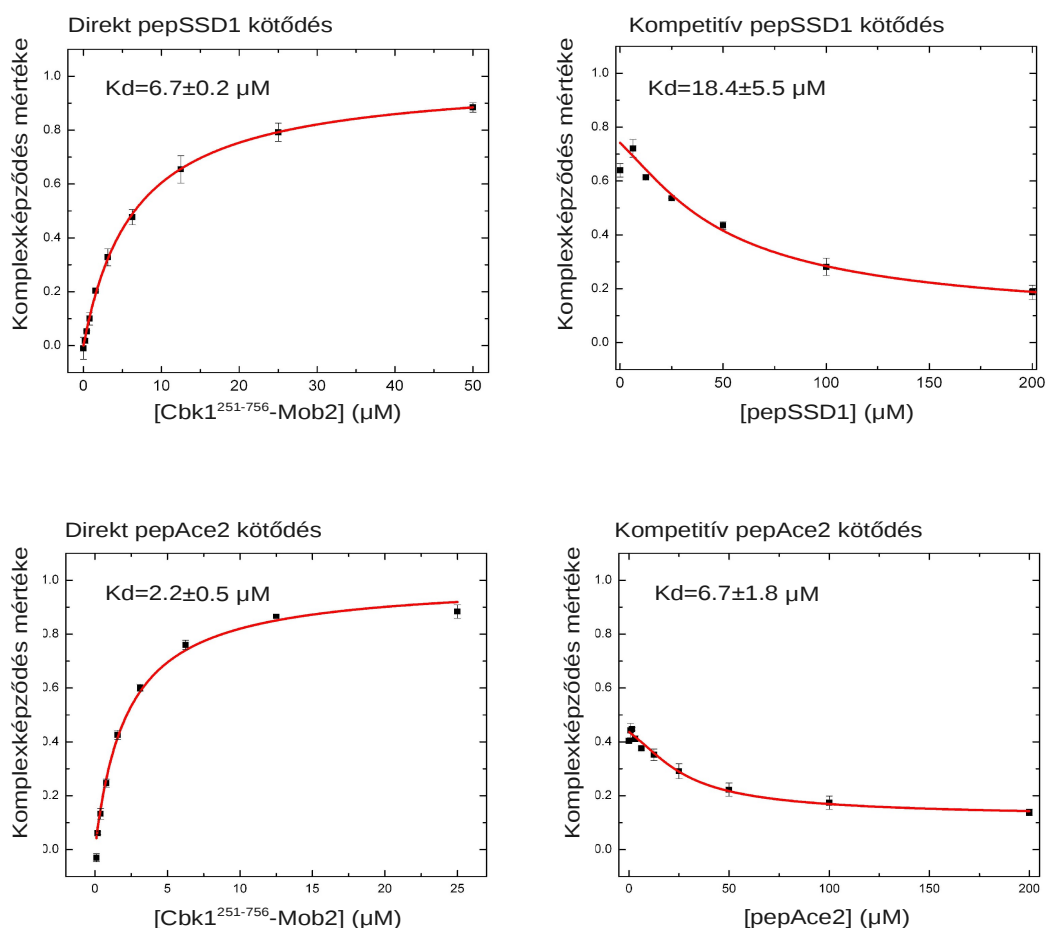
FP mérésekhez dupla affinitás tisztított fehérjéket használtam. Az alkalmazott szintetikus peptidek (pepAce2: GSGSIIVTTNSANGGYQFP, pepSSD1: TTEQSDFKFP, pepHM: IGYTYSRFDY, pepHM-P: IGYpTYSRFDY) N- (pepAce2 and pepSSD1) vagy C-terminálisan (pepHM and pepHM-P) voltak jelölve karboxifluorescein (CF) csoporttal. Az FP jelben végbemenő változásokat direkt mérések során növekvő fehérjekoncentráció mellett követtem nyomon a Synergy H4 (BioTek Instruments) plate reader segítségével. A jelölt peptidek 20nM koncentrációban voltak egységes pufferben feloldva (20 mM Tris pH=8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Brij35P, 2 mM DTT). A kapott görbékből illesztés alapján meghatározható a jelölt peptid disszociációs állandója. A jelöletlen peptid kötődési állandóját kompetitív titrálással határoztam meg: 20nM jelölt peptidhez annyi fehérjemintát adtam, hogy a rendszer >50% telítésbe kerüljön. Ezután növekvő koncentrációjú jelöletlen peptiddel szorítottam le a jelölt peptid kötődését, majd a kapott görbét illesztettem. Minden mérést triplikátumként mértem le, az illesztésekhez OriginPro7-et használtam.

4. Eredmények

4.1 Szubsztrát dokkoló motívum kvantitatív analízise és a kölcsönhatási régió minimalizálása

A dokkoló motívum kötődési erősségének kvantitatív meghatározása céljából rekombináns úton bakteriálisan expresszált fehérjéket állítottam elő ortogonális (His₆ és GST) tisztítási cimkékkal és a kettős affinitás tisztított fehérjéket fluoreszcencia polarizációs mérésekhez használtam.

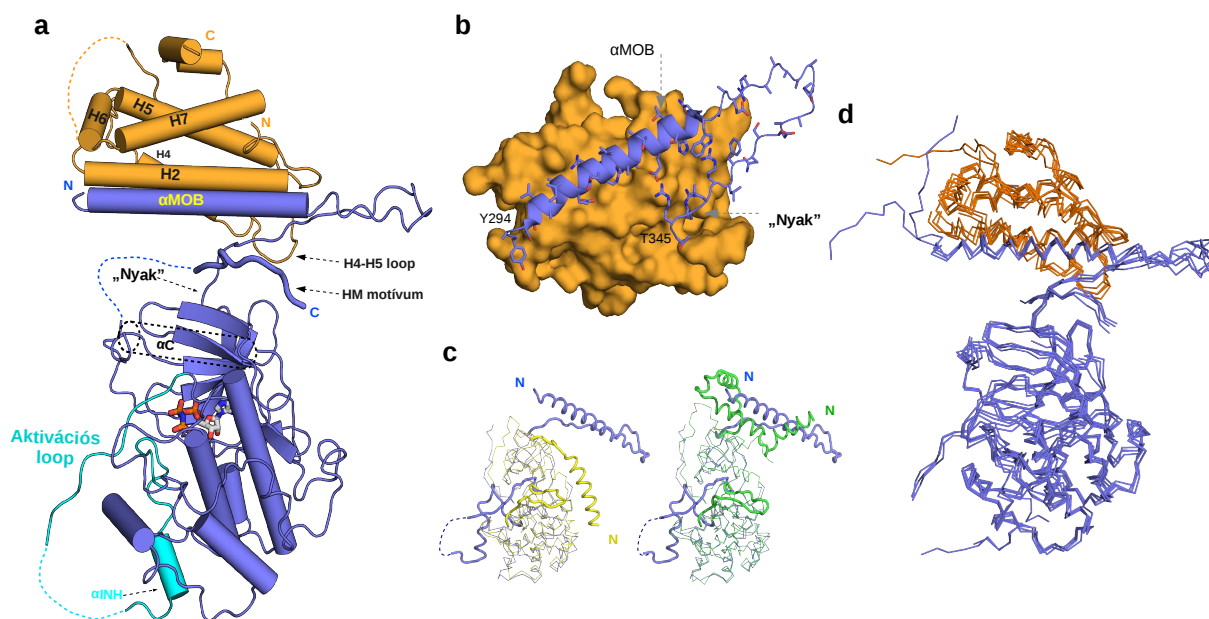
Két ismert szubsztrátból származó peptidet vizsgáltam: pepSSD1 és pepAce2. Előbbi szubsztrát egy mRNS kötő fehérje, utóbbi egy transzkripció faktor. Mindkét fehérjében a lineáris motívumuk mutálásának hatására in vivo fenotípus csökkenés volt megfigyelhető. A szintetikus úton előállított peptideket kötődési affinitását direkt és kompetitív mérési körülmények között mértem fluoreszcencia polarizációs technikával (**3. ábra**). Mindkét peptid esetén tapasztalható volt egy affinitásbeli növekedés a jelölt peptiddel történő mérésakor, ami valószínűleg arra vezethető vissza, hogy a motívum kifejezetten hidrofób, aminek a hidrofobicitását a fluoreszcens jelölőcsoport tovább növelte, ezáltal hozzájárult egy hidrofób felszínhez való kötődéshez.



3. Ábra – A pepSSD1 és a pepAce2 a Cbk1²⁵¹⁻⁷⁵⁶-Mob2 komplexhez való kötődésének FP görbéi.

A méréseket a Cbk1²⁵¹⁻⁷⁵⁶-Mob2 komplexszel végeztem. Hogy az interakciós régiót minimalizáljam két konstrukcióval végeztem további méréseket: Cbk1²⁵¹⁻⁷³⁰-Mob2 konstrukciónál az AGC specifikus C-terminális volt levágva a konstrukcióról (amibe bele tartozik a HM is) és a Cbk1³⁵¹⁻⁷⁵⁶ konstrukciónál a Mob2 kötésben részt vevő N-terminálist volt leahagyva a konstrukcióról. (A kináz domén önmagában nem bizonyult jól expresszálnak.) Mindkét konstrukcióval hasonló affinitás értékeket mértem, mint az eredeti konstrukcióval, ami igazolta, hogy a dokkoló motívum közvetlenül a kináz doménhez kötődik (**F2. ábra**).

4.2 Cbk1-Mob2 szerkezetének meghatározása



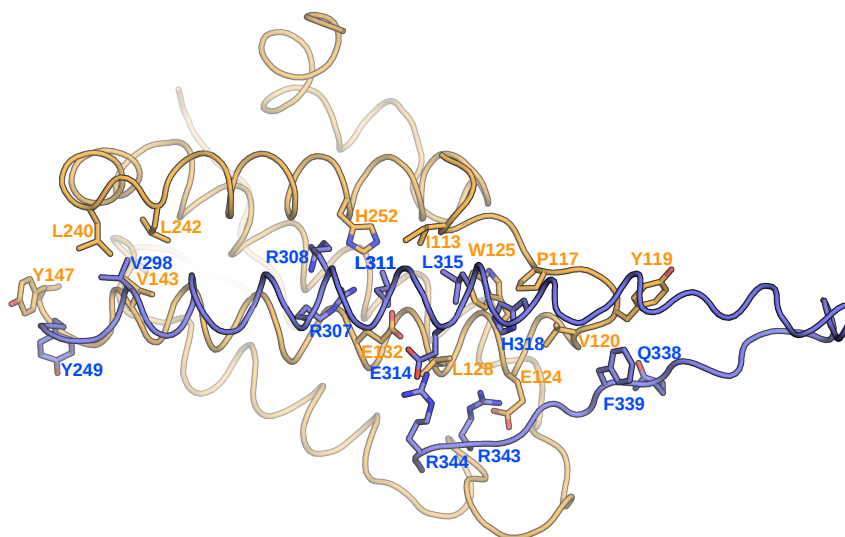
4. Ábra – A Cbk1-Mob2 kristályszerkezet. **a** Áttekintő ábra a Cbk1-Mob2 szerkezetéről. A Cbk1 kék, az aktivációs hurka cián, a Mob2 pedig narancs színnel van jelölve. Szaggatott vonallal a rendezetlen láncok lefutását jelöltem. **b** A Mob2 a kináz N-terminálisához kötődik egy kétpontos kölcsönható felszínen keresztül. **c** A kináz domén csak az aktivációs hurkában és az N-terminálisában tér el más AGC kinázoktól. (Sárga – PKA, zöld – ROCK.) **d** A megoldott szerkezetek szuperpozíciója. A különböző kristályformákból származó domén-orientációk megegyeznek, stabil negyedleges szerkezetet jelezve.

Röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározás céljából a kettős affinitás tisztítás után az affinitás címkéket lehasítottam, majd ioncsere kromatográfiás lépéssel izoláltam a címke mentes sztöchiometrikus komplexet. Kétféle konstrukcióval sikerült egykristályokat kapni: a Cbk1²⁵¹⁻⁷⁵⁶-Mob2 konstitutíven inaktív (D475A) fehérje komplexszel és ugyanezzel a fehérjével, amin egy további, a HM foszforilációját mimikáló, azaz aktiváló mutáció (T743E) is jelen volt. Csak a dupla mutáns fehérjével

sikerült apo (peptid jelenléte nélküli) kristályokat növesztenem, amik nagyon alacsony felbontáson diffraktáltak csak (4.5 Å). pepSSD1 hozzáadására sikerült más tércsoporttal rendelkező kristályokat növesztetni mindkét konstrukcióval, amik már jobban, ám még mindig alacsony felbontással diffraktáltak (3.6 és 3.3 Å) (**F1 és 4. ábra és 1. táblázat**).

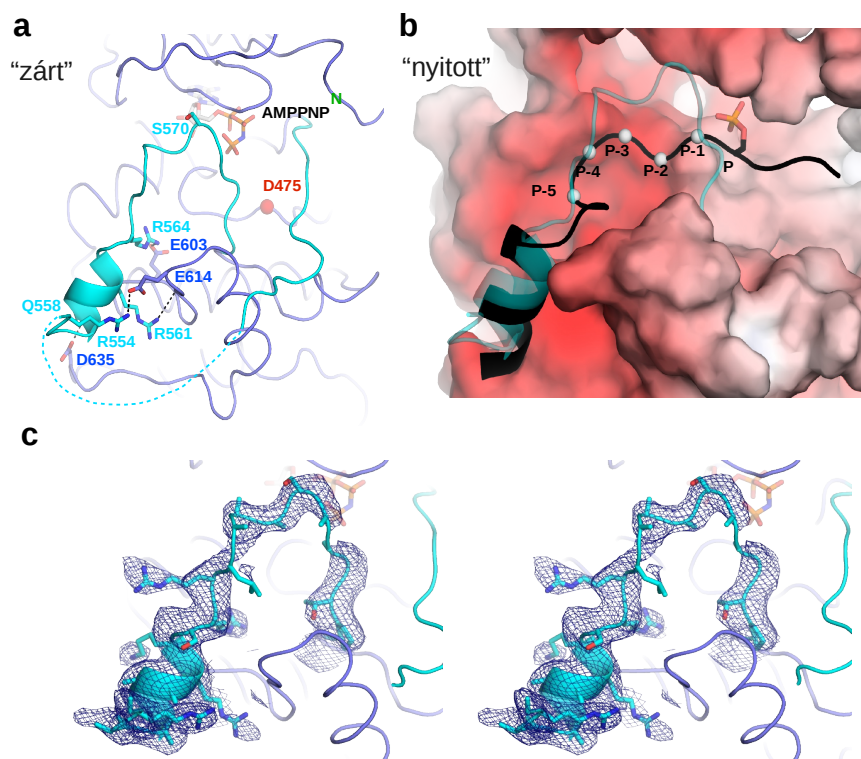
Az alacsony felbontású szerkezetek meghatározása ma még mindig technikai kihívásnak számít, kiváltképpen akkor, ha nem áll a rendelkezésünkre magas felbontású minta szerkezet. Ennek oka az, hogy kevés a mért adat (reflexió intenzitás) a számoltakhoz képest. Amíg egy ~2 Å felbontású szerkezet esetén egyedi oldallánc konformációkat látunk, 3 Å feletti felbontáson már csak az elektron gazdag és stabil konformációjú aminosavakat látjuk (tipikusan ilyenek az aromás aminosavak), 4 Å feletti felbontáson pedig már csak a másodlagos szerkezeti elemeket lehet megbízhatóan megépíteni. Ezen a felbontáson a bevett modellezési eljárás egy megbízható szerkezetből indul ki, azonban számomra ez nem volt adott és a teljes modellezést kézzel kellett elvégezni távoli homológ szerkezetekből kiindulva.

A meghatározott szerkezetek nagyon hasonló konformációval rendelkeztek (**4. ábra**). Sikerült közvetlenül rávilágítanom, hogy a Mob2 koaktivátor a kináz N-terminálisához kötődik, egy $>1100\text{\AA}^2$ felületű interakciós felszínt alkotva (**4. és 5. ábra**). A kötődésben fontos szerepet kap egy hosszú hélix (αMOB) és egy “nyak” régió, ami az NDR/LATS specifikus kiterjesztetést köti össze a kináz doménnel. Ezt a két motívumot egy flexibilis, éles kanyarral rendelkező lánc köti össze. A Mob2 kölcsönható felszíne a H2 és a H7 hélixből és a H4-H5 hurkokból áll, ami megegyezik korábbi NMR alapú megfigyelésekkel (ahol a kináz nyak régiójával vizsgálták a kölcsönható felszínt) (**5. ábra**)^{16 17}.



5. Ábra – A Mob2 és a Cbk1 közti dokkoló felszín. A felszínen található, interakcióban résztvevő aminosavakkal feltüntetve⁸.

A kináz aktivációs hurka autó-inhibitor funkciót tölt be, ahol az inaktív konformáció magába foglal egy hélixet (α INH), amely több poláris interakción keresztül kötődik a kináz szubsztrát kötő árkába (**6. ábra**). Maga a hélix nagy hasonlóságot mutat egy PKA szubsztrát inhibitorral. A hélix és a kináz közti szakaszon található az ismert Cbk1 autofoszforilációs hely (S570), amelynek meg kell foszforilálnia a kináz aktiválódása során. Az aktiváló mutációt tartalmazó konstrukcióval (T743E) nőtt egyik kristályformájában két komplex volt megtalálható az aszimmetrikus egységben. Érdekes módon ezekben eltért az aktivációs hurok konformációja illetve a szubsztrát kötőzseb telítettsége. Amíg az egyik a többi kristályszerkezethez hasonlatos inaktív “zárt” konformációban, addig a másik “nyitott” állapotban volt. Utóbbinál nem volt kivehető elektronsűrűség a szubsztrát kötőzsebben, ill. az aktivációs hurok helyén, ami röntgenkristallográfiában tipikusan rendezetlen régiókra jellemző. A két konformációs állapot és az aktiváló foszforilációs hely jelenléte azt a modellt támasztja alá, hogy a fehérje aktív helye két állapottal rendelkezik (nyitott és zárt), amit a foszforiláció a nyitott irányba tolhat el. Mivel csak az aktiváló mutációt tartalmazó konstrukcióval sikerült nyitott konformációjú kinázt kikristályosítani, ezért felvethető, hogy közvetetten a HM is befolyásolhatja az aktivációs hurok konformációját.

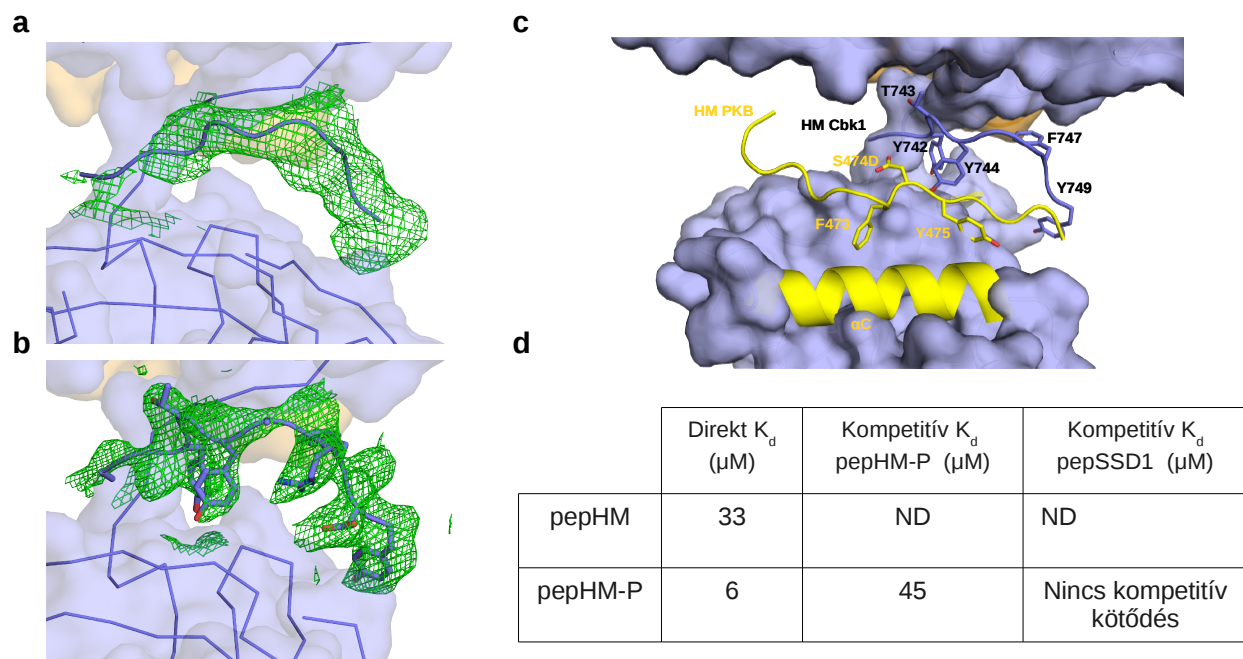


6. Ábra – A szubsztrát kötő árok zárt és nyitott állapota. **a** Zárt állapotban az aktivációs hurok elfoglalja a szubsztrát kötő árkot. Az inaktív konformáció egy helikális elemet és egy flexibilis hurkot tartalmaz ⁸. Ez utóbbin található meg az aktiválódást okozó autó-foszforilációs hely. **b** Nyitott állapotban az aktivációs loop rendezetlenné válik, szabaddá téve az árkot szubsztrát kötődéséhez. A szuperpozicionált PKA szubsztrát (fekete színnel) jó illeszkedést mutat az autó-inhibitor hélixszel. **c** Sztereo ábra az autó-inhibitor régióról a végleges elektronsűrűség térképpel ($2F_o - F_c$, 1 σ -n ábrázolva 3.3 Å felbontáson).

4.3 Hidrofób motívum

A legtöbb AGC kináznak a HM-a az N-lebeny ún. PIF kötőzsebébe kötődik be, ami az α C hélix és a β 4 redő által körülhatárolt kötőárok. Meglepetésünkre a megoldott szerkezetek mindegyikében kötött HM-et figyeltünk meg és rendezetlen α C hélixet. (Külön érdekesség, hogy a rendezetlen α C hélix mellett kötött ATP analóg volt megfigyelhető mindegyik szerkezetben.) A Cbk1 kötőárka némileg elmozdult a megszokott PIF zsebtől: az α C hiányában a kötőárok felcsúszott a nyakrégió és az α MOB felé, legalábbis a márt ismert AGC HM-kötőárkokhoz képest. Ezek több kérdést is felvetettek bennünk. Vajon a defoszforilált HM is képes kötődni? Mi a foszforiláció szerepe? A utolsó kérdésünk pedig krisztallográfiai okokból ered: Mivel az egyetlen megszakadt, a közvetlenül nem a kinázhoz csatlakozó, elektronsűrűségi szakasz a HM kötőzseb környékén volt megtalálható, felmerült bennünk, hogy nem e a kristályosításkor használt SSD1 dokkoló peptidet látjuk. Utóbbi kérdéshez mindenképp érdemes megemlíteni, hogy a legalacsonyabb felbontású, ám peptidmentes környezetben nőtt kristályoknál is egyértelműen látható volt a HM kötőárok betöltöttsége.

A kérdések megválaszolásához FP alapú megközelítést alkalmaztam. A korábbi mérésekhez használt, HM csonkolt Cbk1²⁵¹⁻⁷³⁰-Mob2 konstrukcióval végeztem méréseket (**F3 és 7. ábra**). Érdemes leszögezni, hogy a mért kötődési értékek alacsony volta abból a tényből következik, hogy transz-ban vizsgálunk egy amúgy cisz-ben történő kötődési eseményt. Mind a nemfoszforilált, mind a foszforilált peptid kötődést mutatott direkt mérési körülmények között és a mérések alapján megállapítható, hogy a foszforiláció kb. ötszörös erősítő jelleggel járul hozzá az interakcióhoz. Kompetitív méréssel sikerült továbbá igazolnom, hogy az SSD1 dokkoló peptid nem fed át a HM kötőárokba kötődő peptiddel, azaz a megfigyelt elektrondenzitás nem a dokkoló peptidtől származik, tehát egy független árokhoz kötődik (**F3 és 7. ábra**).



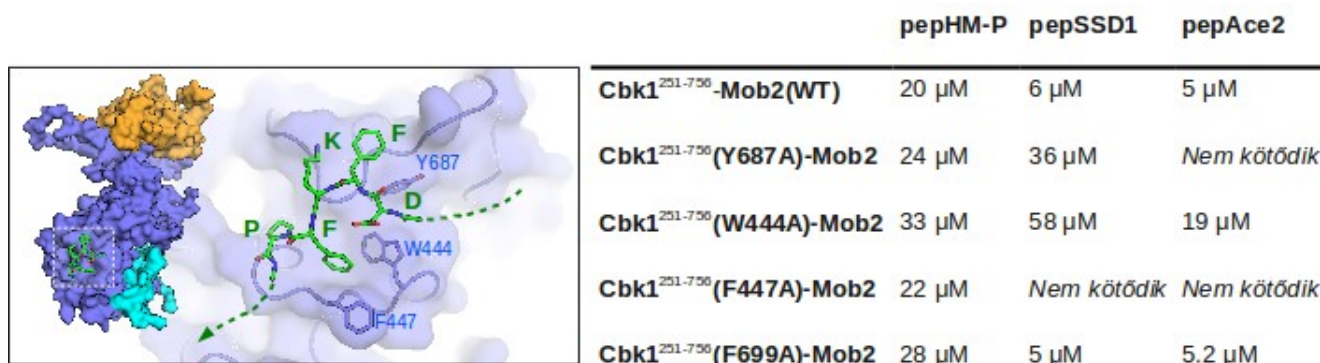
7. Ábra – A Cbk1 hidrofób motívumának kötődési sajátosságai. **a** Kihagyásos elektronsűrűség térkép a (peptid nélkül) 4.5 Å felbontású szerkezet hidrofób motívumáról. **b** Kihagyásos elektronsűrűség térkép a (peptid mellett) 3.3 Å felbontású szerkezet hidrofób motívumáról. **c** Cbk1 szuperpozíciója egy PKB szerkezettel¹⁸. A Cbk1 HM kötőárka feljebb van a kanonikus AGC kináz kötőároktól. **d** Az FP mérések összefoglalója. (ND-Nincs meghatározva.)

4.4 Dokkoló felszín feltérképezése, ellenőrzése

Habár a kristályszerkezettel közvetlenül nem sikerült meghatározni a dokkoló peptid kötődési konformációját, a meghatározott szerkezetek alapján mégis megpróbáltuk behatárolni a kötőfelszínt. Ehhez molekuláris dokkolásokat futtattunk (dr Hetényi Csaba segítségével) a megoldott Cbk1-Mob2 szerkezet felhasználásával (**8. ábra**). Ilyenkor a kináz domén teljes felszínére dokkoltuk a peptidet bármilyen külső kényszer nélkül. A kapott legalacsonyabb energiával rendelkező komplexnél a dokkoló árok része volt az αD - αE loop és az AGC kináz specifikus C-terminális eleje (CLT régió), aminek a része az ún PxxP motívum. A PxxP motívum egy feltételezhetően elterjedt allosztérius gócpont az AGC kinázok között.

A dokkoló árok ellenőrzéseként alanin mutánsokat állítottam elő a dokkoló árok környékén található hidrofób aminosavakra, amelyek között szerepelt az interakcióban közvetlenül szereplő (Y687A, W444A, F447A) és egy közeli, ám az interakcióban részt nem vevő aminosav is (F699A). Három peptid kötődését követtem nyomon direkt FP mérésekkel: a két korábban karakterizált dokkoló peptidet és a foszforilált HM peptidet (**F4 és 8. ábra**). Utóbbi független helyhez kötődik, ezáltal a mutációknak nem szabad befolyásolniuk a kötődését, azaz egy tulajdonképpeni fehérje-integritás kontrollként használható. A direkt mutációk egyértelműen rontották mindkét dokkoló peptid kötődését,

amíg a távolabbi (~néhány Å-re lévő) mutáció nem befolyásolta azt. A HM-P peptid kötődése egyik esetben se romlott jelentősen. Ezeket az eredményeket további biokémiai karakterizálással is megerősítették amerikai kollégáink, ami alapján erősen valószínűsíthető, hogy a tényleges lineáris motívumot kötő árkot találtuk meg az in silico dokkolás segítségével.



8. Ábra – A dokkoló árok azonosítása a Cbk1 felszínén. Az in silico dokkolás eredményeképpen sikerült azonosítani a dokkoló peptid kötőfelszínt, illetve egy peptid kötődési módot (A peptid zölddel van jelölve.). A felszínt nagyméretű, szabad hidrofób aminosavak alkotják. Az FP mérések a jobb oldali táblázatban vannak összefoglalva. Ahol *Nem kötődik* van feltüntetve, ott a K_d nagyobb, mint $\sim 100 \mu$ M.

5. Eredmények összefoglalása

Munkám során sikeresen meghatároztam a Cbk1-Mob2 élesztő fehérje komplex alacsony felbontású szerkezetét több különböző kristályformában. A megoldott szerkezetek bepillantást engedtek a koaktivátor kötési módjába és az aktivációs hurok auto-inhibítor funkciójára is fényt derítettem. Biokémiai mérésekkel sikerült feltárnom egy NDR/LATS kináz hidrofób motívumának kötődési sajátosságait, amely különbségeket mutat más AGC kinázokhoz képest.

A szerkezeti munka kiegészítéseként sikerült kvantitatíven analizálni egy élesztő specifikus dokkoló motívum kötődését. A megoldott szerkezeteket templátként használva sikerült in silico módszerekkel meghatározni a motívum kötőfelszínét, amit sikeresen bizonyítottam kvantitatív módszerekkel. Az azonosított felszín egy ismert AGC kináz allosztérikus hely, ami jól egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy a lineáris motívumokon keresztül zajló kötődés a Cbk1 közvetített jelátvitel robosztusságát teszi lehetővé in vivo, valószínűleg a szubsztrát fehérjék hatékonyabb foszforilálásán keresztül.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Reményi Attilának, aki lehetővé tette számomra a munkát és akinek szakértelme és iránymutatása nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozatom, illetve Eric Weissnek, akinek a megkeresése nélkül nem kezdtünk volna el dolgozni a témán.

Köszönettel tartozom még technikusunknak, Rakács Mariannának aki a fehérje-expressziók során nyújtott segítséget, Kyle Schneider-nek a DNS konstrukciók elkészítéséért és az egész Reményi-labornak a felszabadult, alkotói légkörért.

7. Hivatkozások

1. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275–82 (2002).
2. Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 9–22 (2010).
3. Yang, J. *et al.* Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular cell* **9**, 1227–40 (2002).
4. Bothos, J., Tuttle, R. L., Ottey, M., Luca, F. C. & Halazonetis, T. D. Human LATS1 is a mitotic exit network kinase. *Cancer research* **65**, 6568–75 (2005).
5. Hergovich, A. *et al.* The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Current biology : CB* **19**, 1692–702 (2009).
6. Brace, J., Hsu, J. & Weiss, E. L. Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis. *Molecular and cellular biology* **31**, 721–35 (2011).
7. Hergovich, A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cellular signalling* **23**, 1433–40 (2011).
8. Bichsel, S. J., Tamaskovic, R., Stegert, M. R. & Hemmings, B. a. Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35228–35 (2004).
9. Kohler, R. S., Schmitz, D., Cornils, H., Hemmings, B. a & Hergovich, A. Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases. *Molecular and cellular biology* **30**, 4507–20 (2010).
10. Kabsch, W. Xds. *Acta Cryst. D* **66**, 125–32 (2010).
11. Stavridi, E. S. *et al.* Crystal Structure of a Human Mob1 Protein. *Structure* **11**, 1163–1170 (2003).
12. Jacobs, M. *et al.* The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *The Journal of biological chemistry* **281**, 260–8 (2006).
13. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658–674 (2007).
14. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure

- solution. *Acta Cryst. D* **66**, 213–21 (2010).
15. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Cryst. D* **66**, 486–501 (2010).
 16. Mrkobrada, S., Boucher, L., Ceccarelli, D. F. J., Tyers, M. & Sicheri, F. Structural and functional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Mob1. *Journal of molecular biology* **362**, 430–40 (2006).
 17. Ponchon, L., Dumas, C., Kajava, A. V, Fesquet, D. & Padilla, A. NMR solution structure of Mob1, a mitotic exit network protein and its interaction with an NDR kinase peptide. *Journal of molecular biology* **337**, 167–82 (2004).
 18. Yang, J. *et al.* Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature structural biology* **9**, 940–4 (2002).

8. Nyilatkozat

Név: Gógl Gergő

ELTE Természettudományi Kar, szak: Vegyész MSc

Neptun azonosító: QB7AKX

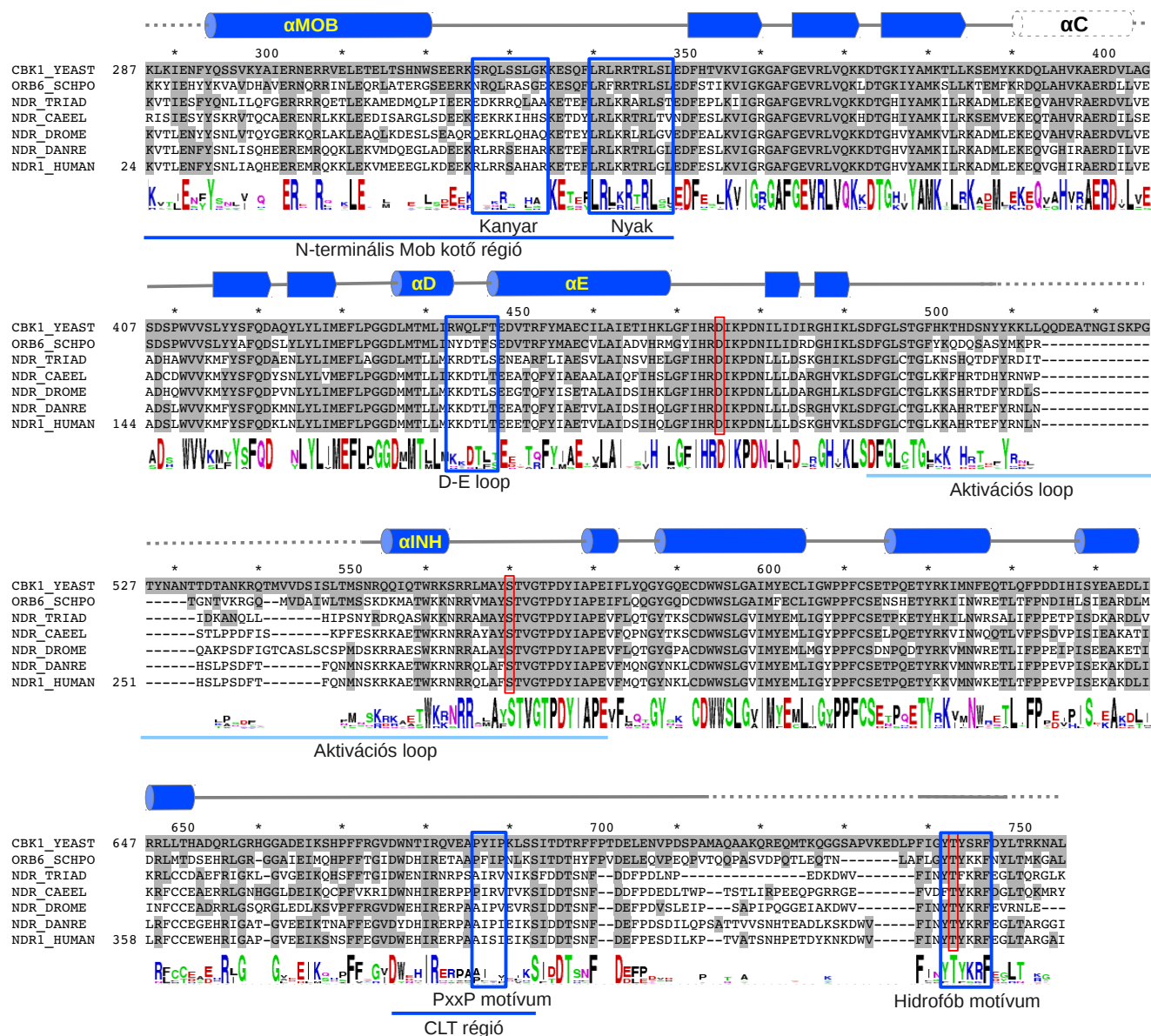
TDK dolgozat címe: „Az első NDR/LATS kináz-koaktivátor komplex szerkezete”

A **TDK dolgozat** szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

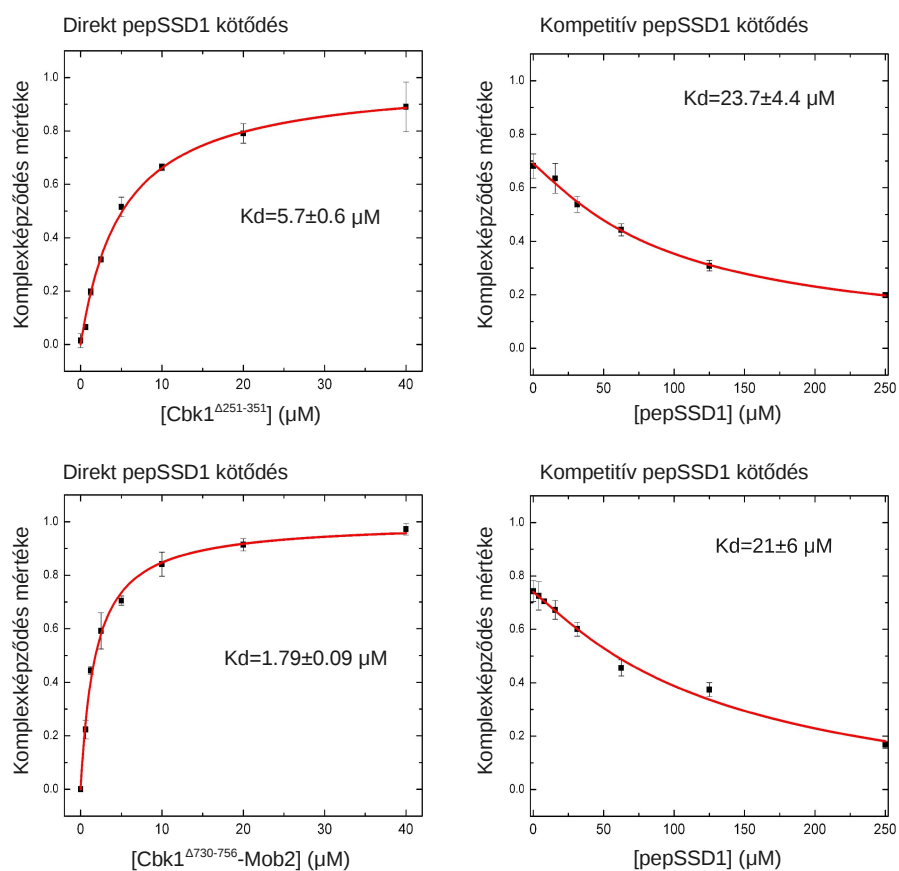
Budapest, 2013. 10. 22.

a hallgató aláírása

Függelék ábrák

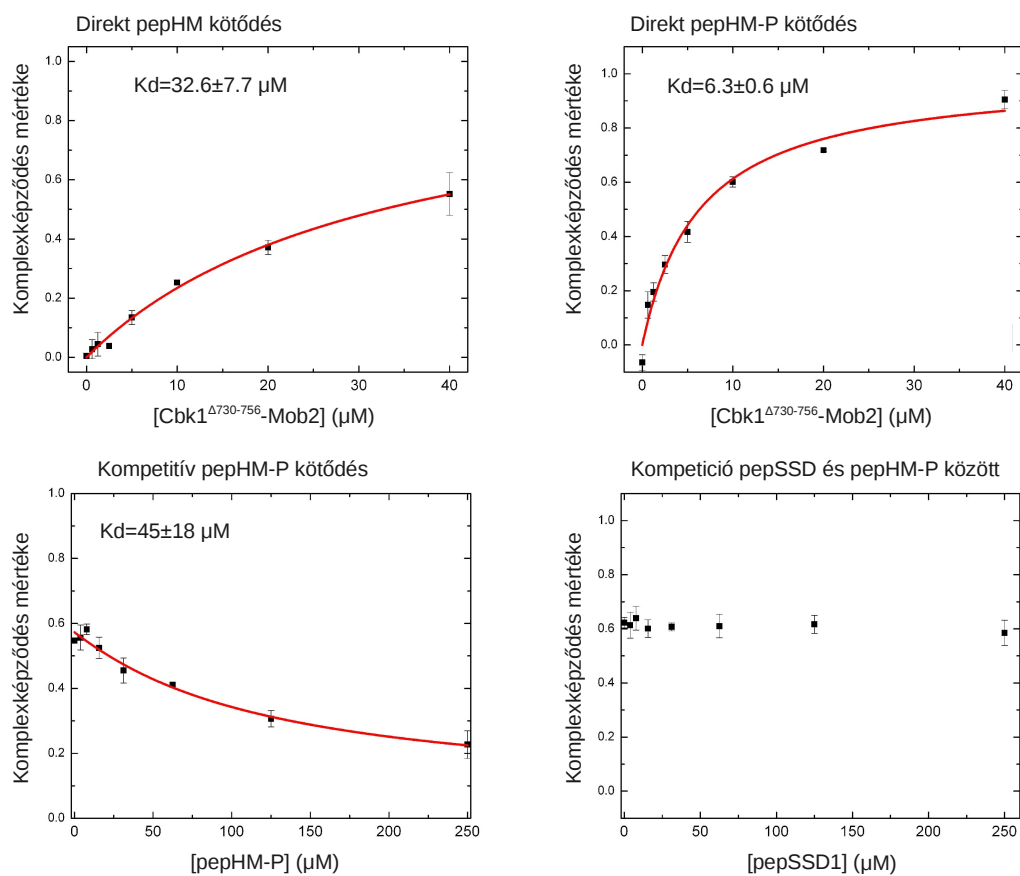


F1. Ábra. - Szekvenciaillesztés különböző NDR kinázok között. A szekvenciák színezése a Cbk1-hez való identitás alapján történt. A meghatározott szerkezeti elemek jelölve vannak. (Szaggatottal a rendezetlen részeket emeltem ki.) A fontosabb motívumok dobozzal vannak kiemelve, a konszenzus szekvencia LOGO formában van ábrázolva.

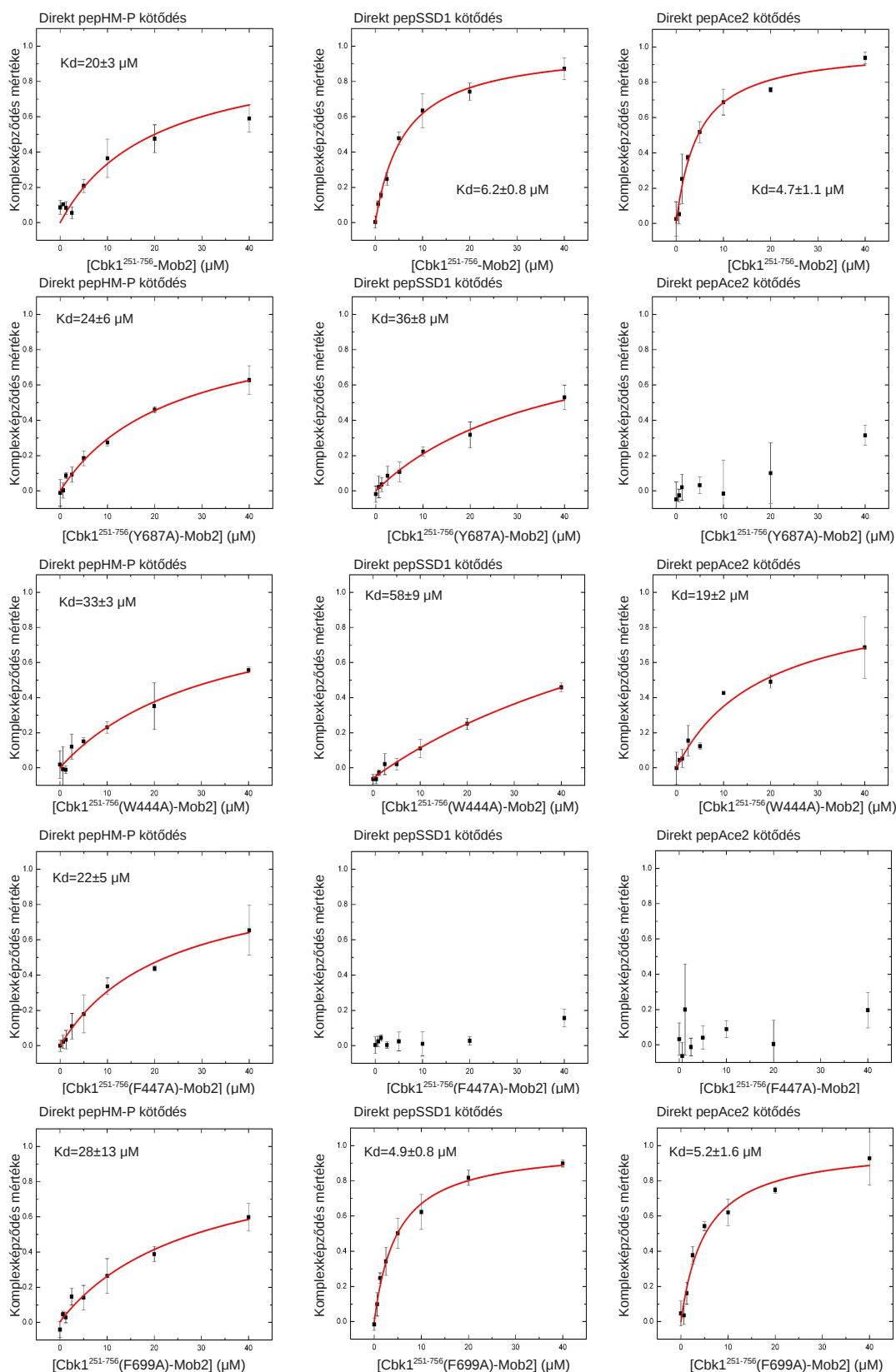


	Direkt Kd (μM)	Kompetitív Kd (μM)
Cbk1 ²⁵¹⁻⁷⁵⁶ -Mob2	6.7	18
Cbk1 ^{Δ251-351}	5.7	24
Cbk1 ^{Δ730-756} -Mob2	1.8	21

F2. Ábra. - A lineáris motívum kötőrégió minimalizálása a kináz doménre. (A dolgozatban említett mérési eredmények nyers adatai.)



F3. Ábra. - A hidrofób motívummal történő FP mérések kiértékelései. (A dolgozatban táblázatos adatként feltüntetett mérések nyers adatai.)



F4. Ábra. - Az azonosított dokkoló felszín mutációs analízise. (A dolgozatban táblázatos adatként feltüntetett mérések nyers adatai.)