

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Miroslav Příbyl

ERK1/2 MAP kináza – její strukturní charakteristika a interakční partneři

ERK1/2 MAP kinase – structure and interaction partners

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D., za jeho trpělivost, neocenitelné rady a zkušenosti, které mi předal během mé laboratorní praxe a během psaní této práce. Dále bych rád poděkoval všem, kteří mě podporovali, zejména rodině a členům Laboratoře biochemie RNA.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.5.2014

Podpis

Abstrakt

Mimobuněčné signální molekuly jsou rozpoznávány membránovými receptory na povrchu eukaryotických buněk. Receptory přenáší signál do vnitrobuněčného prostoru, kde dochází k aktivaci příslušných enzymů. Aktivovanými enzymy mohou být proteinkinázy, které fosforylují substrátové proteiny odpovídající potřebám pro specifické rozpoznání proteinkinázou. Substrátovými proteiny mohou být strukturní proteiny a enzymy, které dále přenáší signál nebo přímo ovlivňují fyziologické procesy buňky. Mezi proteinkinázy patří i ERK1 a ERK2 (Kináza regulovaná mimobuněčným signálem 1 a 2), enzymy které mají vliv na buněčný růst, buněčný cyklus a další řadu fyziologických procesů buňky. Proteinkináza je dynamická molekula, která během katalytického cyklu podstupuje řadu konformačních změn. Konformační změny mají vliv na stabilitu a funkci molekuly. Konzervované aminokyselinové zbytky naplňují funkci proteinkináz. Tyto faktory se zároveň podílí na interakci s proteinovými substráty a regulačními proteiny a jsou tak zodpovědné za specifickou funkci proteinkinázy.

Klíčová slova: ERK1/2, proteinkináza, struktura, interakční partneři, konformace, vazebné motivy.

Abstract

Extracellular signal molecules are recognized by membrane receptors on the surface of eukaryotic cells. Receptors transmit the signal into the intracellular space where activation of the concrete enzymes occurs. Activated enzymes may be protein kinases that phosphorylate the substrate proteins corresponding to the requirements for specific recognition by a protein kinase. Substrate proteins may be structural proteins and enzymes, which in turn transmit the signal or directly affect the physiological processes of the cell. The protein kinase family accounts for ERK1 and ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2), enzymes which affect cell growth, cell cycle and numerous other physiological processes of the cell. Protein kinases are dynamic molecules, which undergo a series of conformational changes during their catalytic cycle and whose stability and function are affected by conformational changes. Conserved amino acid residues carry out the function of protein kinases. These factors are also involved in interactions with protein substrates and regulatory proteins, and are responsible for specific function of protein kinase.

Key words: ERK1/2, protein kinase, structure, interaction partners, conformation, docking motifs.

Seznam použitý zkratek

List of used abbreviations

ATP	Adenosine triphosphate	Adenosin trifosfát
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA
DNA	Deoxyribonucleotide acid	Deoxyribonukleotidová kyselina
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor růstového faktoru
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Kináza regulovaná mimobuněčným signálem
GAP	GTPase activating protein	Protein aktivující GTPázu
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosin difosfát
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosin trifosfát
IEG	Immediate early genes	Velmi časný geny
kDa	Kilodalton $1,66 \times 10^{-24}$ kg	Kilodalton $1,66 \times 10^{-24}$ kg
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Proteinkináza aktivovaná mitogenem
MAPKAP	Mitogen-activated protein kinase activating protein	Protein aktivovaný proteinkinázou aktivovanou mitogenem
MAPKAPK	Mitogen-activated protein kinase activating protein kinase	Proteinkináza aktivovaná proteinkinázou aktivovanou mitogenem
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase	Kináza proteinkinázy aktivované mitogenem
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	Kináza kinázy proteinkinázy aktivované mitogenem
NGF	Nerve growth factor	Nervový růstový faktor
PC12	Rat adrenal <i>pheochromocytoma cell</i> line	Buněčná linie odvozená z feochromocytomu krysích nadledvin
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	Receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček
RBD	Ras binding domain	Doména vazající Ras
RTK	Receptor tyrosine kinase	Tyrosinkinázový receptor
SH2	SRC homology 2	SRC homologie 2
SH3	SRC homology 3	SRC homologie 3

Základní aminokyseliny a jednopísmenné zkratky

A	Alanine	Alanin
C	Cysteine	Cystein
D	Aspartic acid	Kyselina asparagová
E	Glutamic acid	Kyselina glutamová
F	Phenylalanine	Fenylalanin
G	Glycine	Glycin
H	Histidine	Histidin
I	Isoleucine	Isoleucin
K	Lysine	Lysin
L	Leucine	Leucin
M	Methionine	Metionin
N	Asparagine	Asparagin
P	Proline	Prolin
Q	Glutamine	Glutamin
R	Arginine	Arginin
S	Serine	Serin
T	Threonine	Treonin
V	Valine	Valin
W	Tryptophan	Tryptofan
Y	Tyrosine	Tyrosin

Obsah

1. ÚVOD	7
1.1. CÍLE TÉTO PRÁCE	7
2. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MAPK/ERK SIGNÁLNÍ KASKÁDY.....	8
2.1. ZÁKLADNÍ KOMPONENTY MAPK/ERK SIGNÁLNÍ KASKÁDY, VZÁJEMNÉ INTERAKCE A FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM.....	8
2.2. VLIV HOMOLOGŮ ERK NA BUNĚČNÝ CYKLUS A DIFERENCIACI.....	12
3. STRUKTURA ERK1/2	13
3.1. PRIMÁRNÍ STRUKTURA ERK1/2	13
3.2. KONZERVOVANOST PROTEINKINÁZ.....	14
3.3. OBECNÁ STRUKTURA ERK1/2 V KONTEXTU DALŠÍCH PROTEINKINÁZ.....	15
4. VÝZNAMNÉ ZNAKY PRIMÁRNÍ STRUKTURY V KONTEXTU SEKUNDÁRNÍ A TERCIÁRNÍ STRUKTURY.....	16
4.1. AKTIVAČNÍ SEGMENT A AKTIVAČNÍ PYSK	16
4.2. VLIV FOSFORYLOVANÉHO T202/185 NA SEKUNDÁRNÍ A TERCIÁRNÍ STRUKTURU PROTEINU ERK1/2	17
4.3. VAZBA ATP NA SMYČKU BOHATOU NA GLYCIN	17
4.4. AXK MOTIV A C ₂ HELIX.....	18
4.5. AMINOKYSELINOVÉ ZBYTKY ZPROSTŘEDKOVÁVAJÍCÍ KATALÝZU	19
4.6. DFG MOTIV SMYČKY VÁZAJÍCÍ HOŘČÍK	20
4.7. REGULAČNÍ A KATALYTICKÝ HŘBET	21
4.8. FOSFORYLAČNÍ MOTIV A MOTIV VÁZAJÍCÍ P+1 AMINOKYSELINOVÝ ZBYTEK	23
5. INTERAKČNÍ MOTIVY A VAZEBNÁ MÍSTA.....	23
5.1. LXL MOTIV	24
5.2. VAZEBNÉ MÍSTO LXL MOTIVU.....	25
5.3. FXFP MOTIV	26
5.4. VAZEBNÉ MÍSTO FXFP MOTIVU	27
6. INTERAKČNÍ PARTNEŘI	28
6.1. C-FOS A C-JUN JAKO PROTEINOVÉ SUBSTRÁTY ERK1/2.....	28
6.2. INTERAKCE S PROTEINY JADERNÉHO PÓRU	29
6.3. ERK1/2 JAKO SUBSTRÁT PROTEINKINÁZY CK2.....	29
7. DIMERIZACE PROTEINŮ ERK	29
8. ZÁVĚR.....	32
9. POUŽITÁ LITERATURA	33

1. Úvod

Proteinkinázy jsou enzymy specificky fosforylující proteinové substráty na hydroxylové skupině aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci. Kináza regulovaná mimobuněčným signálem 1/2 (z ang. Extracellular-regulated protein kinase 1/2, ERK1/2) patří mezi protein kinázy specificky fosforylující proteinové substráty na serinu nebo treoninu. Jedná se tedy o tzv. serin/treonin specifické proteinkinázy (Sturgill & Ray 1986).

Samotné označení ERK1/2 poukazuje na 2 enzymy – ERK1 a ERK2. Toto označení se preferuje z několika důvodů. Známé signály indukující aktivaci kaskády vedoucí k aktivaci ERK1 aktivují i ERK2 a *vice versa* (Lefloch *et al.* 2009). Vysoká sekvenční identita vypovídá o pravděpodobné funkční zaměnitelnosti těchto enzymů v přenosu signálu (Boulton *et al.* 1991).

Podle původního rozdělení lidského kinomu a schématu standardní klasifikace kináz patří ERK1/2, do skupiny CMGC (zkratka zahrnující názvy původních rodin této skupiny: cyklin-dependentní kinázy, mitogenem-aktivované protein kinázy, kinázy glykogen syntáz a kinázy podobné cyklin dependentním kinázám); do rodiny MAPK (z ang. mitogen-activated protein kinase) a do podrodiny ERK (Hanks & Hunter 1995; Manning *et al.* 2002).

Název ERK získaly tyto kinázy díky velkému množství extracelulárních signálů, které mohou aktivovat kaskádu směřující k fosforylaci ERK1/2 a tím je aktivovat (Boulton *et al.* 1990). V literatuře se můžeme setkat i s jinými označeními pro ERK kinázy, která vznikala v průběhu historie. Například MAP-2 kináza (z ang. Microtubule-associated protein 2 kinase), která fosforyluje protein MAP-2, jeden z prvních popsaných substrátů ERK1 (Sturgill & Ray 1986). Kinázy ERK1/2 jsou také označovány jako MAPK3 respektive MAPK1 (z ang. Mitogen-activated protein kinase 3/1). Toto označení poukazuje na pozici v MAP kinázové kaskádě, což je vícestupňová struktura zahrnující množství kináz vedoucí k aktivaci MAPK. MAPK je poslední kinázou této kaskády z hlediska přímého přenosu fosforylační informace. Je to enzym, který může fosforylovat velké množství různých proteinových substrátů. V tomto případě mluvíme o tzv. MAPKAP nebo MAPKAPK (z ang. Mitogen-activated protein kinase activating protein respektive mitogen-activated protein kinase activating protein kinase). MAP kinázové kaskády bývají často označovány podle MAP kinázy, kterou obsahují. V případě ERK mluvíme o MAPK/ERK kaskádě (Seger & Krebs 1995).

1.1. Cíle této práce

Cíle této práce jsou:

- Zasadit ERK1/2 do kontextu signální kaskády a jejího vlivu na fyziologii buňky.
- Popsat významné aminokyselinové zbytky, motivy a sekundární struktury, které se podílejí na funkci a struktuře proteinkinázy ERK1/2.
- V celkovém obsahu práce popsat vybrané interakční partnery proteinkinázy ERK1/2.

2. Obecná charakteristika MAPK/ERK signální kaskády

2.1. Základní komponenty MAPK/ERK signální kaskády, vzájemné interakce a fyziologický význam

Základní model MAPK/ERK kaskády zahrnuje 3 kinázy, přičemž MAPK je jednou z nich. Kináza fosforylující MAPK je v MAPK kaskádách obecně označována jako MAPKK (Kináza regulovaná mimobuněčným signálem). V konkrétním případě MAPK/ERK kaskády mluvíme o MEK1/2 (z ang. Mitogen-activated/ERK kinase 1/2) (viz Obrázek 1, str. 11). MEK1/2 jsou schopny zajistit fosforylaci konkrétního treoninu a tyrosinu na ERK1/2. Jedná se o aminokyselinové zbytky v tzv. aktivačním pysku. V případě lidského ERK1 se jedná o treonin na pozici 202 a tyrosin na pozici 204. V případě lidského ERK2 se jedná o treonin na pozici 185 a tyrosin na pozici 187. Fosforylace obou těchto aminokyselinových zbytků vede k plné aktivaci ERK1/2 (Ray & Sturgill 1988; Anderson *et al.* 1990; Payne *et al.* 1991; Gómez & Cohen 1991).

Proteinkinázy MEK1/2 byly označovány jako aktivátory MBP kináz 1 a 2; MBP kináza je jedno z prvních označení pro ERK, odvozené ze substrátového proteinu MBP. Enzymy MEK1/2 byly nazývány aktivátory kináz. Toto bylo označení proteinů, které fosforylují jiné proteiny po aktivaci membránových receptorů stimulem (Ahn *et al.* 1991). Enzymy MEK1/2 vykazují vysokou specifitu k ERK1/2. Experimenty prokázaly, že fosforylace uskutečněná proteinkinázou MEK1/2 na enzymu ERK2 není podmíněna pouze sekvencí aktivačního pysku, kde dochází k fosforylaci treoninu a tyrosinu nezbytných pro aktivaci enzymu ERK2, avšak je potřeba celého proteinu, navíc v nativní konformaci (Seger *et al.* 1992), aby proteiny mohly vzájemně působit skrze vazebné motivy a domény (Rubinfeld *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2000). Skupině Matsuda *et al.* se podařilo schopnost aktivátoru fosforylovat MAP kinázu prokázat *in vivo* (Matsuda *et al.* 1992).

Proteiny MEK1/2 jsou duálně specifické proteinkinázy, zároveň se jedná o fosfoproteiny, přičemž fosforylace je nutná pro aktivaci MEK1/2 (Seger *et al.* 1992). O tuto aktivaci se stará rodina serin/treonin specifických proteinkináz nazývaných Raf (Kyriakis *et al.* 1992), která se skládá z 3 zástupců a jejich isoform: A-Raf, B-Raf, C-Raf (také znám jako Raf-1).

Za využití kvasinkového dvouhybridního systému s cDNA připravenou z myšního embrya, se podařilo identifikovat homology A-Raf a C-Raf. Tyto proteiny jsou schopné interakce se savčím homologem proteinu H-Ras. Navíc byla jejich interakce prokázána i s lidským homologem C-Raf, který byl původně identifikován jako lidský a myší homolog virového onkogenu *v-raf* (Rapp *et al.* 1983). Při použití mutantní formy proteinu H-Ras, která nebyla schopna vázat GTP (Powers *et al.* 1989) a následně ani již známé vazebné partnery, bylo prokázáno, že právě vazba molekuly GTP na protein H-Ras je nezbytná pro účinnou vazbu efektorů. Pro účinnou vazbu proteinu Ras s proteinem Raf je zároveň potřeba efektorové domény lokalizované na proteinu Ras. Navíc je nezbytná vysoce konzervovaná sekvence na N-koncové doméně proteinu Raf. Jde o tzv. doménu vázající protein Ras

(RBD, z ang. Ras binding domain) (Vojtek *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1993). Na N-konci proteinů Raf se vyskytuje i další důležitá doména, umožňující vazbu proteinů rodiny Ras. Tato doména je označována jako doména bohatá na cystein, a stejně jako RBD, je nezbytná pro signalizaci přes Raf-1 (Brtva *et al.* 1995; Drugan *et al.* 1996). Vzhledem k tomu, že je Raf rodina proteinů vysoce konzervovaná, se výše uvedené poznatky dají vztáhnout na všechny členy Raf proteinové rodiny (Wellbrock *et al.* 2004).

Dvouhybridní kvasinkové systémy přispěly i k prokázání vzájemné interakce lidských homologů H-Ras a Raf. Zároveň byla detekována interakce proteinů MEK a Raf (Aelst *et al.* 1993).

Protein Raf váže protein 14-3-3. Tato interakce funguje jako negativní regulátor aktivity enzymu Raf a je narušena vazbou proteinu Ras, který vyvazuje protein 14-3-3 z domény bohaté na cystein proteinu Raf. Tím je zajištěna zvýšená aktivita proteinu Raf (Fu *et al.* 1994; Clark *et al.* 1997). U proteinu A-Raf byla detekována vazba dalšího proteinu 14-3-3, která by mohla mít efekt zvýšení aktivity enzymu. Interakce se stejnými proteiny na různých místech tak má různé efekty na aktivitu proteinu (Baljuls *et al.* 2008).

Protein Raf je asociován s cytoplazmatickou membránou přes protein Ras s navázaným GTP (viz Obrázek 1, str. 11). Pro aktivaci proteinu Raf je potřeba dalších signálů (Leervers *et al.* 1994). Zástupci rodiny proteinů Raf podstupují posttranslační modifikace, definované aminokyselinové zbytky jsou fosforylovány, což je nezbytné pro správnou funkci proteinu, jejich regulaci nebo zvýšení jejich aktivity. Někteří zástupci proteinů rodiny Raf obsahují místo některých konzervovaných fosforylovatelných aminokyselinových zbytků jiné aminokyselinové zbytky s negativně nabitou postranní skupinou, které se objevují na ekvivalentních pozicích fosforylovaných aminokyselinových zbytků jiných zástupců této rodiny. Například fosforylace tyrosin specifickou proteinkinázou Src vyžaduje lokalizaci proteinu C-Raf u cytoplazmatické membrány přes protein Ras. Modifikace tohoto typu jsou uskutečněny i jinými kinázami, jako například proteinkinázou C, což částečně poskytuje alternativní způsoby aktivace MAPK/ERK signální kaskády (Stephens *et al.* 1992; Morrison *et al.* 1993; Marais *et al.* 1995).

Přestože jsou zástupci rodiny proteinů Raf bohatě fosforylováni, jen některé z těchto fosforylací mají známý fyziologický význam. Jako jedny z nejdůležitějších fosforylovaných aminokyselinových zbytků pro funkci byly identifikovány S471 na proteinu C-Raf. Tento aminokyselinový zbytek je naprosto nezbytný pro kinázovou aktivitu enzymu C-Raf a přenos signálu. Po stimulaci růstovými faktory je stejně jako S471 u C-Raf, fosforylován i ekvivalentní aminokyselinový zbytek proteinu B-Raf (S579) (Zhu *et al.* 2005) a také u A-Raf (S432) (Baljuls *et al.* 2008).

Mutace V600E v proteinu B-Raf se vyskytuje v některých typech rakovinných bujení, jakými je například melanom. Tato mutace vedoucí k přeměně protoonkogenu *BRAF* na onkogen naznačuje význam fosforylace na proteinovém produktu genu *BRAF*. Sekvence obklopující S579 hraje

významnou roli v aktivaci enzymu B-Raf. Navíc je tato mutace nezávislá na mutacích genů pro proteiny Ras, které mohou také způsobit transformaci buněk. Některé mutantní formy proteinů B-Raf, mezi které patří mutantní forma V600E, mají dostatečnou aktivitu pro dlouhodobou aktivaci MAPK/ERK kaskády a to bez potřeby fosforylace serinového zbytku na pozici 579 (Davies *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2005).

Proteiny Raf, fungují nejučinněji v hetero-, či homodimerech. Experimenty prokazující výskyt těchto komplexů byly uskutečněny převážně u proteinů B- a C-Raf. Proteinové komplexy se však vyskytují v buňkách jen ve velmi nízkých koncentracích. Formování aktivních dimerů je regulováno enzymem ERK1/2, který fosforyluje B-Raf na interakční doméně. Tato doména slouží k vazbě druhého monomeru, avšak po její fosforylaci dojde k destabilizaci komplexu a oddělení podjednotek. Zabraňuje se tak dlouhodobé aktivaci MAPK/ERK signální dráhy samotnými komponenty této kaskády (Rushworth *et al.* 2006).

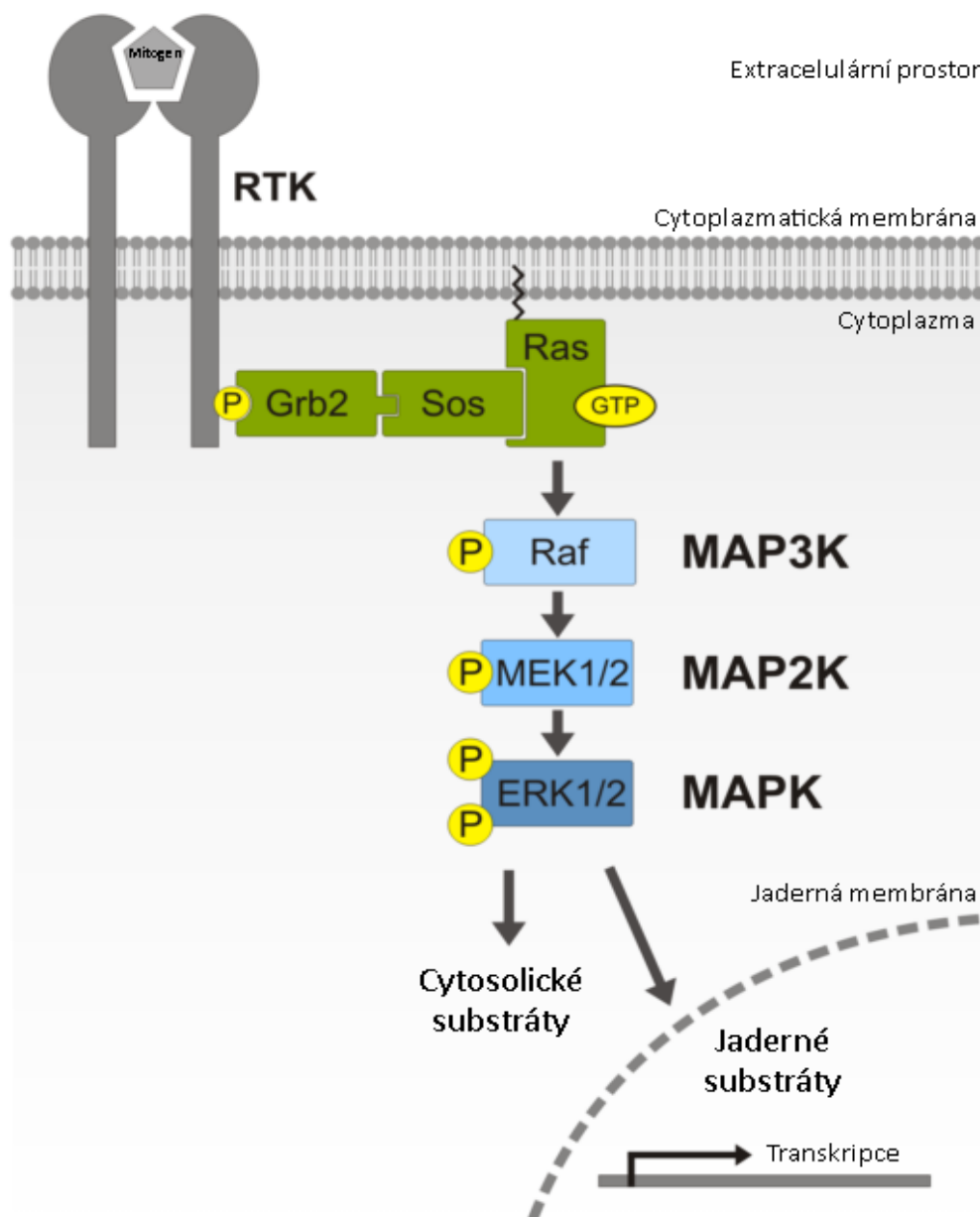
Proteiny Ras (N-, K- a H-Ras) patří do podrodiny proteinů Ras. Jedná se o malé G proteiny vyskytující se v inaktivní formě s navázaným GDP nebo aktivní formě s navázaným GTP. C-konec těchto proteinů je posttranslačně modifikován farnesylací posledního cysteinu. Díky této izoprenoidní kotvě je protein držen u cytoplazmatické membrány na její cytosolické vrstvě (Casey *et al.* 1989). Podařilo se identifikovat i palmytoilaci, která byla ovšem detekovaná jen u některých zástupců této podrodiny (Hancock *et al.* 1989).

Proteiny Ras byly objeveny jakožto virové onkogeny způsobující nádorové transformace myších fibroblastů. Za použití DNA hybridizačních technik byly objeveny lidské homology těchto proteinů. Mutované formy Ras homologů mohou způsobovat rakovinné bujení. Vedle mutací v proteinech Raf jsou jednou z hlavních příčin nádorové transformace buněk způsobené deregulovanou aktivitou MAPK/ERK signální kaskády, což má za následek dlouhodobou aktivaci signálních kaskád (Shih *et al.* 1979; Der *et al.* 1982; Chang *et al.* 1982; Shimizu & Goldfarb 1983).

Proteiny Ras jsou nepřímo asociovány s tyrosinkinázovými receptory (RTK, z ang. Receptor tyrosine kinase) přes sérii proteinů (viz níže), které mají za úkol rozeznání aktivovaného receptoru a aktivaci proteinů podrodiny Ras (viz Obrázek 1, str. 11). Protein přímo asociován s proteinem Ras je faktor nahrazující guanodin (GEF, z ang. guanine nucleotide exchange factor). Může to být například protein SOS1 (son of sevenless homolog 1), který ovlivňuje disociaci GDP z proteinu Ras, a tím i následnou aktivaci proteinu Ras po vazbě GTP. O deaktivaci signálu se starají proteinové aktivátory GTPázové aktivity (GAP, z ang. GTPase activating proteins), které napomáhají přirozené GTPázové aktivitě malých G proteinů. Mutace konkrétního GAP, který se stará o vypnutí signalizace zprostředkovanou proteinem Ras, může také být jednou z příčin rakovinné transformace (Trahey & McCormick 1987; Vogel *et al.* 1988; Bourne *et al.* 1990; DeClue *et al.* 1992; Buday & Downward 1993).

Aby GEF mohl aktivovat protein Ras, musí být asociován s membránou. To je umožněno díky proteinům s SH3 doménou, vážící polyprolinové motivy, vyskytující se na proteinu SOS1. Jedná se například o protein Grb2 (Rozakis-Adcock *et al.* 1993; Chardin *et al.* 1993).

Obrázek 1: Základní zobrazení MAPK/ERK signální kaskády. RTK (tyrosinkinázové receptory) po navázání mitogenu dimerizují, následkem je fosforylace na specifických tyrosinových zbytcích. Takto modifikované aminokyselinové zbytky jsou rozpoznány proteinem Grb2, který je váže. Na protein Grb2 se váže GEF (faktor nahrazující guanodin) protein Sos, který aktivuje protein Ras vázaný na cytosolické vrstvě cytoplazmatické membrány. Protein Ras aktivuje proteiny podrodiny Raf, které přenáší signál na MAP2K (proteiny MEK1/2). Protein MEK1/2 fosforylací aktivují MAPK (proteiny ERK1/2). Protein ERK1/2 fosforyluje substráty v cytosolu, a po translokaci skrz jadernou membránu i v jádře. Upraveno podle (Meister *et al.* 2013).



Protein Grb2 asociuje například s membránovými tyrosinkinázovými receptory EGFR či PDGFR přes SH2 doménu, která rozeznává fosforylované tyrosinové aminokyselinové zbytky. Protein Grb2 se váže pouze k aktivovaným a skrze ligand oligomerovaným receptorům, které signalizují asociaci s růstovým faktorem (viz Obrázek 1, str. 11). Růstové faktory mají po delší stimulaci buňky za následek buněčný růst a proliferaci, ale i diferenciaci v případě některých růstových faktorů, například NGF u některých typů buněk, nebo buněčných linií (Greene & Tischler 1976; Schlessinger 1988; Moran *et al.* 1990; Lowenstein *et al.* 1992; Kao *et al.* 2001)

Základní model MAPK/ERK kaskády se dá rozšířit o proteinové lešení, což jsou proteiny vážící větší množství komponentů signální kaskády nebo kaskád. Proteiny lešení urychlují přenos signálu a dovolují vnitrobuněčnou lokalizaci signálu. S MAPK/ERK signální kaskádou kooperuje celá řada proteinových lešení. Bližší přehled o proteinových lešeních MAPK/ERK nabízí přehledný článek skupiny Meister *et al.* (Meister *et al.* 2013).

2.2. Vliv homologů ERK na buněčný cyklus a diferenciaci

V nekompletní krysí cDNA izolované z různých tkání a buněčných linií byla zjištěna vysoká sekvenční identita ERK1 s dvěma kinázami modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae*, a to sice KSS1 (51% sekvenční identita) a FUS3 (52% sekvenční identita). Největší rozdíly mezi ERK1 a KSS1 či FUS3 se vyskytují na C-konci molekul a v aktivačním segmentu (viz kapitola 4.1. Aktivační segment a aktivační pysk), kde dochází k fosforylaci nezbytné pro aktivaci ERK1/2. Enzymy KSS1 a FUS3 se podílí na vstupu buňky do buněčného cyklu a na konjugaci kvasinek. Z tohoto důvodu se soudí, že se i savčí ERK1 podílí na regulaci buněčného cyklu (Boulton *et al.* 1990).

Předpoklady o vlivu ERK1/2 na buněčný cyklus byly potvrzeny s využitím molekulárně biologických metod. Neaktivovatelné formy homologů ERK1/2 byly produkovány v modelových buněčných liniích plicních fibroblastů čínského křečka. Tato produkce měla negativní efekt na proliferaci buněk, přesněji řečeno, fibroblasty nebyly schopny opustit G0 fázi buněčného cyklu. Byla také detekována snížená transkripce indukovaná růstovými faktory. Výzkumníci si tyto výsledky vysvětlují inhibicí MAPK/ERK kaskády. Podobných výsledků bylo dosaženo i za použití vektorů produkujících RNA protismyslnou k ERK1 (Pagès *et al.* 1993).

Vliv MAPK/ERK signální kaskády na diferenciaci byl postulován u buněčné linie PC12. Tato buněčná linie vychází z feochromocytomu krysích nadledvin a při dlouhodobému vystavení NGF podstupuje diferenciaci v buňky fenotypem připomínající buňky nervové (Greene & Tischler 1976). Model mechanismu, jakým dochází k aktivaci MAPK/ERK signální kaskády po vystavení buněčné linie PC12 mitogenu NGF, zahrnuje aktivaci MEK1/2 přes Rab1/B-Raf dráhu, která je dlouhodobě aktivovaná po stimulaci NGF, na rozdíl od dočasné krátkodobé aktivace, ke které dochází po stimulaci EGF (Kao *et al.* 2001).

3. Struktura ERK1/2

3.1. Primární struktura ERK1/2

Proteinkináza ERK2 byla popsána v modelovém organismu krysy, kde byla zároveň zjištěna vysoká sekvenční identita s krysím enzymem ERK1. Navíc byla zjištěna i vysoká konzervovanost těchto enzymů ke kvasinkovým homologům KSS1 a FUS3 (viz výše, kapitola 2.2. Vliv homologů ERK na buněčný cyklus a diferenciaci) (Boulton *et al.* 1990, 1991).

Pomocí sond připravených z cDNA krysích proteinů ERK1/2 byly identifikovány jejich lidské homology. Podařilo se připravit částečnou cDNA lidského ERK1 a kompletní cDNA odpovídající lidskému ERK2 (viz Obrázek 2, str. 14). Lidský protein ERK2 má délku 360 aminokyselinových zbytků a předpokládanou molekulovou hmotnost 41 kDa. Sekvenční srovnání primárních sekvencí lidského ERK2 s krysím ERK2 odhalil velmi vysokou sekvenční identitu (92%). Podobný výsledek byl publikován i při porovnání lidského homologu ERK2 k homologu ERK2 modelového organismu *Xenopus laevis*, kde se jednalo o 95% sekvenční identitu (Boulton *et al.* 1991; Owaki *et al.* 1992).

Kompletní aminokyselinová sekvence lidského homologu ERK1 byla identifikována skupinou Charest *et al.* v roce 1993 (viz Obrázek 2, str. 14). Identifikovali protein o délce 379 aminokyselinových zbytků s molekulovou hmotností 43,1 kDa. Součástí studie bylo porovnání s myším homologem proteinu ERK1. Byla zjištěna 96% sekvenční identita na úrovni primární sekvence, což jen potvrzuje vysokou konzervovanost toho enzymu (Boulton *et al.* 1991; Charest *et al.* 1993).

Skupina Charest *et al.* poukázala také na několik aminokyselinových repetič, které nebyly popsány v předchozích experimentech (Boulton *et al.* 1990). Jedná se o N-koncový úsek MAAAAA a následující úsek opakujících se pěti glycinů. Zda tyto aminokyselinové úseky mají nějakou specifickou funkci se nepodařilo objasnit (Charest *et al.* 1993).

V celé této bakalářské práci se autor odkazuje převážně na lidské homology proteinkináz ERK1 a ERK2. Číselné označení aminokyselinových zbytků poukazuje na dvě pozice. První hodnota se týká pozice aminokyselinového zbytku v primární sekvenci lidského enzymu ERK1, druhá hodnota odkazuje na ekvivalentní pozici na lidském enzymu ERK2. Primární sekvence lidských enzymů ERK1/2 vychází z databáze UniProt, která obsahuje primární sekvence identifikované skupinami Owaki *et al.* a Charest *et al.* 1993 (viz výše) (Owaki *et al.* 1992; Charest *et al.* 1993).

MK03_HUMAN	1	MAAAAAQGGGGGEP RRT EGVGPGV PGEVEMVKGQPF	FDVGP RYTQLQYIGEGAYGM
MK01_HUMAN	1	MAAAAAAGAG-----P	EMVVRGQVFDVGP RYT NLSYIGEGAYGM
MK03_HUMAN	56	VSSAYDHWKTRVAIKKISPF	EHQTYCQRTLREIQILLRFRHENVIGIRDILRAS
MK01_HUMAN	39	VCSAYDNVNVKVRVAIKKISPF	EHQTYCQRTLREIKILLRFRHENIIGINDIIRAP
MK03_HUMAN	111	TLEAMRDVYIVQDLMETDLYKLLK	SQQLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHR
MK01_HUMAN	94	TIEQMKDVYIVQDLMETDLYKLLK	IQHLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHR
MK03_HUMAN	166	DLKPSNLLINTTCDLKICDFGLAR	IADPEHDHTGFLTEYVATRWYRAPEIMLNSK
MK01_HUMAN	149	DLKPSNLLINTTCDLKICDFGLAR	VADPDHDHTGFLTEYVATRWYRAPEIMLNSK
MK03_HUMAN	221	GYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPI	FPGKH YLDQLNHILGILGSPSQEDLNCIINM
MK01_HUMAN	204	GYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPI	FPGKH YLDQLNHILGILGSPSQEDLNCIINL
MK03_HUMAN	276	KARNYLQSLPSKTKVAWAKLFPKS	DSKALD LLD RMLTFNPNKRI TVEEALAHPYL
MK01_HUMAN	259	KARNYLLSLPHKNKVPWNR LFPNA	DSKALD LLD KMLTFNPHKRI EVEQALAHPYL
MK03_HUMAN	331	EQYYDPTDEPVAEEPFTFAMEL	DDLPKERLKE LIFQETARFQPGVLEAP
MK01_HUMAN	314	EQYYDPSDEPIAEAPKFDME	LDDLPKEK LKE LIF EETARFQPGY--RS

Obrázek 2: Sekvenční srovnání lidského proteinu ERK1 (ID: MK03_HUMAN, AC: P27361-1) s lidským proteinem ERK2 (ID: MK01_HUMAN, AC: P28482-1). Tmavé pozice označují plnou identitu porovnaných aminokyselinových zbytků nebo unikátní aminokyselinový zbytek. Šedé pozice označují neidentické aminokyselinové zbytky s podobnými chemickými vlastnostmi postranních skupin. Bílé pozice označují neidentitu. Lidské proteiny ERK1 a ERK2 vykazují 87% sekvenční identitu (Notredame *et al.* 2000; Tommaso *et al.* 2011; Consortium 2014).

3.2. Konzervovanost proteinkináz

Zařazení některých enzymů jakožto členů do určité proteinkinázové rodiny bylo uskutečněno díky bioinformatickým metodám. Na proteinových sekvencích známých proteinkináz (Takio *et al.* 1984) byly identifikovány krátké, vysoce konzervované regiony převážně v oblasti katalytických domén enzymů. Tyto úseky byly využity pro určení proteinu jakožto proteinkinázy, zároveň byly využity k zařazení enzymu do konkrétní kinázové rodiny (Hanks *et al.* 1988).

Eukaryotické proteinkinázy vykazují relativně vysokou sekvenční identitu. Významné jsou zejména vysoce konzervované aminokyselinové zbytky. Jedná se o aminokyselinové zbytky obecně považované za nezbytné pro funkci proteinkináz. U některých proteinkináz se podařilo experimentálně prokázat význam těchto aminokyselinových zbytků v katalytickém mechanismu enzymu, jeho regulaci nebo v jiných funkcích. Kromě již zmíněného využití konzervovaných

aminokyselinových zbytků, jakožto základního dělení jednotlivých proteinkináz do skupin, rodin a podrodin, byla vysoká sekvenční identita využita pro přenesení konkrétní funkce některých konzervovaných aminokyselinových zbytků na ekvivalentní aminokyselinové zbytky na jiných zástupcích proteinkináz. Tato skutečnost má za následek, že domnělá funkce konzervovaných aminokyselinových zbytků některých proteinkináz nebyla experimentálně prokázána. Mnoho autorů tak využívá tyto poznatky a referuje při popisu vybraných proteinkináz funkce konzervovaných aminokyselinových zbytků jiných proteinkinázách (Hanks *et al.* 1988; Zhang *et al.* 1994; Hanks & Hunter 1995; Kornev *et al.* 2006). Tato skutečnost již zobecněla do takové míry, že jsou v novější odborné literatuře brány za samozřejmé a nejsou referovány ani studie, kde byla funkce určitých aminokyselinových zbytků či struktur prokázána.

Publikované krystalografické struktury ERK1/2 potvrzovaly některé předpoklady, který byly do té doby částečně inspirované jinými proteinkinázami. Přestože tyto studie byly uskutečněny především na krysích homolozích ERK2, můžeme díky vysoké sekvenční identitě s lidským homologem (99,16%) vztáhnout tyto poznatky i na homology lidské (Zhang *et al.* 1994; Canagarajah *et al.* 1997).

Postupem času vznikaly i krystalografické studie týkající se lidského ERK2, v případě lidského ERK1 je zájem o krystalografická data znatelně nižší (Ohuri *et al.* 2005; Kinoshita *et al.* 2008).

3.3. Obecná struktura ERK1/2 v kontextu dalších proteinkináz

Proteinkinázy mají řadu konzervovaných znaků, které se vyskytují u zástupců nejrůznějších proteinkinázových rodin. Jako nejjednodušší rozdělení může být využito rozdělení na N-koncovou a C-koncovou doménu. Významnou složkou z funkčního hlediska je katalytická doména, která slouží jako jeden z hlavních faktorů pro zařazení domnělých proteinkináz do proteinkinázových rodin. Toto dělení zároveň dává výzkumníkům základní hypotetické informace o určité proteinkináze (Hanks *et al.* 1988).

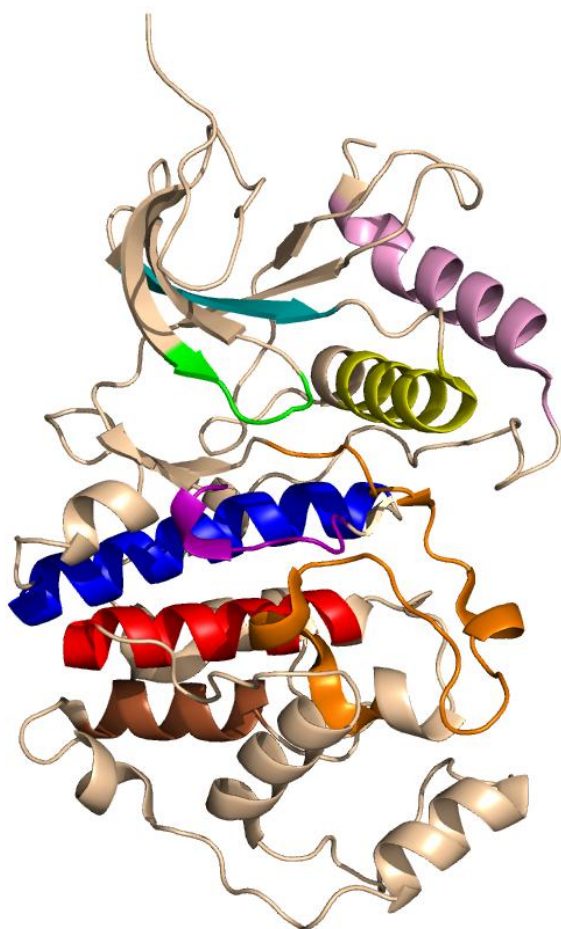
Katalytická doména proteinkináz se dá teoreticky rozdělit na dvě hlavní složky. Tyto složky jsou N-koncový a C-koncový lalok. C-koncový lalok, který je tvořen převážně α helixy, zahrnuje větší množství aminokyselinových zbytků, proto je také označován jako větší lalok. N-koncový lalok je převážně tvořen z β vláken (viz Obrázek 3, str. 16) (Knighton *et al.* 1991).

Kromě N-koncového laloku a C-koncového laloku se na proteinkinázách vyskytují i tzv. prodloužení. Pojmy N-koncové a C-koncové prodloužení poukazují na přesnější označení těchto úseků vzhledem k jejich umístěním na enzymu, obě hrají roli v regulaci proteinkináz (Hanks *et al.* 1988).

Dalšími aspekty primární sekvence, které mohou pomoci při zařazení proteinkinázy do specifické skupiny, jsou aminokyselinové zbytky vysoce konzervované v zástupcích konkrétních

skupin. Pro zástupce ze skupiny CMGC proteinkináz se podařilo takové aminokyselinové zbytky identifikovat. Některé z těchto aminokyselinových zbytků nemají jasně určenou funkci v enzymu, avšak vzhledem k vysoké konzervovanosti se dá o určité funkci uvažovat. Při zvážení dynamiky posunů, kterými nejen proteinkinázy skupiny CMGC prochází (například z plně aktivované do neaktivní formy) se dá předpokládat, že některé takto konzervované aminokyselinové zbytky se podílí na správném přechodu z různých forem enzymu do jiných tak, aby proteinkináza byla i po přechodu funkčním či aktivovatelným celkem (Kannan & Neuwald 2004).

Dalším významným znakem proteinkináz je dělení primární sekvence katalytické domény na subdomény. Tyto subdomény obsahují aminokyselinové zbytky v charakteristických motivech, které jsou vysoce konzervované v katalytických doménách proteinkináz. U proteinkináz bylo definováno



celkem 12 subdomén, které zahrnují konzervované sekvence s aminokyselinovými zbytky podílejícími se na funkci enzymu. Konzervované motivy se podílí na katalytickém mechanismu, který se zdá být totožný ve všech eukaryotických proteinkinázách. Konzervované motivy se objevují v katalytických a regulačních oblastech (Hanks *et al.* 1988; Hanks & Hunter 1995).

Obrázek 3: Molekula lidské proteinkinázy ERK2. Barevně jsou vyznačeny významné sekundární struktury enzymu. Zeleně je označena smyčka bohatá na glycin; žlutě je označen α C helix; modrozeleně je označen β 3 list; oranžově je označen aktivační segment; fialově je označena katalytická smyčka; červeně je označen α F helix; modře je označen α E helix; hnědě je označen α H-helix; růžově je označen L16 segment. PDB ID: 1TVO.

4. Významné znaky primární struktury v kontextu sekundární a terciární struktury

4.1. Aktivační segment a aktivační pysk

Proteinkináza ERK1/2 je fosforylována na tzv. aktivačním segmentu. Jedná se o vysoce konzervovanou sekvenci, obsahující aktivační pysk, který obsahuje oba fosforylovatelné aminokyselinové zbytky nezbytné pro aktivaci ERK1/2 (T202/185 a Y204/187). Předpokládá se,

že vzhledem k vysoké konzervovanosti proteinkináz by aktivační segment mohl mít stejnou nebo podobnou funkci i u ostatních homologů proteinu ERK1/2 (Anderson *et al.* 1990; Payne *et al.* 1991).

Aktivační segment ERK1/2 o délce 31 aminokyselinových zbytků se nachází v subdoménách VII a VIII. Sekvenční identita aktivačního segmentu ERK1 a aktivačního segmentu ERK2 činí 93,55%. Po fosforylaci T202/185 a Y204/187 dochází k významné změně struktury aktivačního segmentu, která má za následek změny v sekundárních strukturách a terciární struktuře ERK1/2 vedoucí k aktivaci enzymu (Canagarajah *et al.* 1997).

4.2. Vliv fosforylovaného T202/185 na sekundární a terciární strukturu proteinu ERK1/2

Fosforylace T202/185 se významně podílí skrze elektrostatické interakce a vodíkové můstky na změně funkčně významných sekundárních struktur v ERK1/2. Fosforylovaný T202/185 působí na α C helix (viz kapitola 4.4. AXK motiv a C helix) přes vazby s R87/70, na katalytickou smyčku přes aminokyselinový zbytek R165/148 (nachází se v HRD motivu, viz kapitola 4.5. Aminokyselinové zbytky zprostředkovávající katalýzu) a na R189/172 v aktivačním pysku (viz kapitola 4.6. DFG motiv smyčky vázající hořčík). Změna sekundární struktury aktivačního segmentu vede k uspořádání aminokyselinových zbytků do regulačního hřbetu, struktury významné pro stabilizaci proteinkinázy (viz kapitola 4.7. Katalytický a regulační hřbet). Fosforylovaný T202/185 se také podílí na změně terciární struktury enzymu, a to skrze interakce s aminokyselinovými zbytky na N-koncové doméně a C-koncovém prodloužení, což má za následek zvýšení kompaktnosti enzymu skrze významné změny sekundárních struktur definovaných segmentů. C-koncové prodloužení obsahuje alfa helikální strukturu tzv. segment L16, který po aktivaci ERK1/2 podstupuje významné přestavby sekundární struktury. Po fosforylaci ERK1/2 na aktivačním pysku část L16 segmentu změní svoji strukturu na 3_{10} helix. Jedná se o sekvenci v aminokyselinových pozicích 346-352 (u ERK1), 329-335 (u ERK2). Tato přeměna je zapříčiněna hlavně interakcí s fosforylovaným treoninem na pozici 202/185. Struktura segmentu L16 je následně stabilizována dalšími slabými interakcemi s jinými aminokyselinovými zbytky i v aktivačním pysku (Canagarajah *et al.* 1997; Krupa *et al.* 2004; Masterson *et al.* 2010).

4.3. Vazba ATP na smyčku bohatou na glycin

Jedním z významných znaků primární sekvence N-koncové domény proteinkináz je sekvence bohatá na glycin. Tato sekvence se nachází v subdoméně I. Ve vyšších molekulárních strukturách zodpovídá sekvence bohatá na glycin za vazbu ATP který je donorem fosfátové skupiny přenášené na substrát, kterým je za fyziologických podmínek substrátový protein. Sekvence bohatá na glycin, označována také jako smyčka bohatá na glycin, má u lidského ERK1 podobu GEGAYG a nachází se na aminokyselinových pozicích 49-54. Lidský ERK2 obsahuje totožnou sekvenci na aminokyselinových pozicích 32-37 (Wierenga & Hol 1983; Owaki *et al.* 1992; Charest *et al.* 1993). Sekvence bohatá na glycin tvoří smyčku mezi dvěma β vlákny označovanými $\beta 1$ a $\beta 2$. Smyčka spolu s oběma β vlákny tvoří

kapsu, která napomáhá udržovat dusíkatou bázi ATP v definované poloze. Vznik interakcí stabilizující ATP má za následek stabilizaci molekuly proteinkinázy ERK1/2. Fosfáty molekuly ATP jsou následně koordinovány do pozice vhodné pro katalýzu dalšími aminokyselinovými zbytky a kationty hořčíku. První glycin ve smyčce bohaté na glycin (G49/32) interaguje s částí ribózy, zbytek smyčky bohaté na glycin interaguje s β a γ fosfátem molekuly ATP (viz Obrázek 4, str. 19) (Sternberg & Taylor 1984; Hanks *et al.* 1988; Kornev *et al.* 2008; Taylor & Kornev 2011).

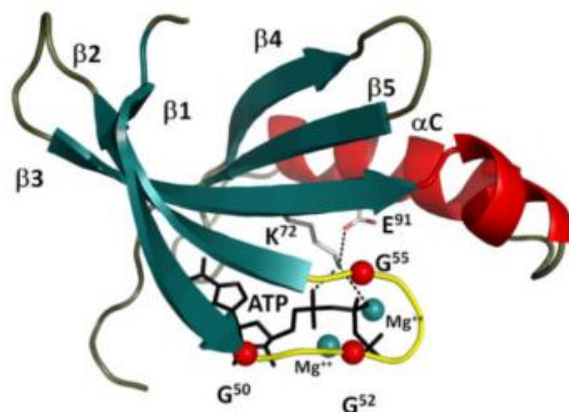
Sekvenci bohatou na glycin následuje další konzervovaný aminokyselinový zbytek V56/39, který se podílí na přesném uspořádání smyčky bohaté na glycin skrze vodíkový můstek vznikající mezi V56/39 a prvním glycinem smyčky bohaté na glycin. Aminokyselinový zbytek V56/39 se také podílí na vazbě ATP skrz hydrofobní interakce a je zároveň součástí funkčně významného katalytického hřbetu (viz kapitola 4.7. Regulační a katalytický hřbet). Další hydrofobní interakce s adenosinem je uskutečněna aminokyselinovým zbytkem I48/31. Na vazbě ATP se podílí také peptidová kostra proteinkinázy, která tvoří ohyb kolem dusíkaté báze molekuly ATP a skrze vodíkové můstky pomáhá molekulu nukleotidu vázat (Hanks *et al.* 1988; Hanks & Quinn 1991; Hanks & Hunter 1995; Emrick *et al.* 2006; Taylor & Kornev 2011).

4.4. AXK motiv a C helix

Subdoména II obsahuje jeden z nejdůležitějších a nejvíce konzervovaných aminokyselinových zbytků proteinkináz. Jedná se o lysin v konsenzus sekvenci AXK (X je nekonzervovaný aminokyselinový zbytek). V případě ERK1/2 se konsenzus sekvence AXK nachází na β vlákně označovaném $\beta 3$ a jedná se o lysinový zbytek na pozici 71 u ERK1, respektive 54 u ERK2. Experimentálně připravené mutanty proteinkinázy p60^{SFC}, které namísto ekvivalentního konzervovaného lysinu obsahovaly jinou aminokyselinu (například histidin) nebyly schopny plnit svoji enzymatickou funkci. Proteinkináza p60^{SFC} je nefunkční i při nahrazení lysinového zbytku argininovým zbytkem, tedy zbytkem s podobnými chemickými vlastnostmi postranní skupiny. Přesná funkce tohoto aminokyselinového zbytku na ekvivalentních pozicích různých proteinkináz byla dlouho nejasná. Vylučovací metodou byly zavrhnuty možnosti, které by dokázal naplnit i argininový zbytek na pozici místo konzervovaného lysinového zbytku v subdoméně II. Dalšími výzkumy byla posílněna hypotéza tvorby vodíkových můstků a elektrostatické interakce s molekulou ATP a dalším konzervovaným aminokyselinovým zbytkem E88/71. Aminokyselinový zbytek K71/54 umožňuje správnou orientaci ATP skrze interakce s α a β fosfátem. Zprostředkování vhodné orientace je nezbytné pro přenos γ fosfátové skupiny na cílový substrát (Snyder *et al.* 1985; Kamps & Sefton 1986; Owaki *et al.* 1992; Charest *et al.* 1993; Madhusudan *et al.* 1994; Taylor & Kornev 2011).

Aminokyselinový zbytek E88/71 se nachází v α helixu (také označován jako α C helix) ERK1/2, což je dominantní struktura lokalizovaná v subdoméně II a III. E88/71 interaguje skrze elektrostatickou interakci a vodíkový můstek s ϵ -aminoskupinou K71/54. Postranní skupina lysinového zbytku je pod vlivem těchto interakcí schopna vytvořit vodíkové můstky s α a β fosfátem ATP (Taylor & Kornev 2011).

Obrázek 4: Na glycin bohatá smyčka a α C helix proteinkinázy A. G50, 52, 55 jsou na ekvivalentních pozicích glycinových zbytků v na glycin bohaté smyčce ERK1/2, stejné vlastnosti vykazuje K72 a E91, které odpovídají K71/54 a E88/71 proteinkinázy ERK1/2. Upraveno dle (Taylor & Kornev 2011).



4.5. Aminokyselinové zbytky zprostředkovávající katalýzu

Původní hypotézy vyvracejí funkci konzervovaného lysinu jakožto hlavního aminokyselinového zbytku zodpovědného za vazbu ATP (Zoller & Taylor 1979) a dávají mu spíše funkci katalytickou, v procesu přenosu fosfátu (Carrera *et al.* 1993). Tyto poznatky se dají vysvětlit i jinak a to sice způsobem zahrnujícím aktuální pohled, kdy se aminokyselinový zbytek K71/54 podílí na správné orientaci α a β fosfátů, což představuje nynější předpoklady. Interakce uskutečněna aminokyselinovým zbytkem K71/54 umožňuje aminokyselinovým zbytkům podílejícím se na katalýze provést jejich úlohu. Na základě poznatků z krystalografických struktur byly identifikovány aminokyselinové zbytky, které by se mohly podílet na katalýze přímo. Jedná se o vysoce konzervovaný aspartát (v případě lidského ERK1/2 jde o D166/149), který se nachází v blízkosti hydroxylové skupiny aminokyselinového zbytku fosforylovaného substrátového proteinu. Aminokyselinový zbytek D166/149 je součástí HRD motivu (názvy motivů jsou často sloučeninou jednopísmenných zkratk aminokyselinových zbytků, které je tvoří), který se nachází v subdoméně VIb. Zdali funguje tento vysoce konzervovaný aspartát jako báze nebo pomocí vodíkového můstku atrahuje vodík substrátové hydroxylové skupiny a pomáhá tak nastavit kyslík stejné hydroxylové skupiny do vzdálenosti a polohy ideální pro nukleofilní atak atomu fosforu z γ fosfátové skupiny ATP, není zatím zcela jasné (Madhusudan *et al.* 1994). Nicméně funkce D166/149 jakožto akceptora vodíkového můstku se zdá být přijatelnější (viz Obrázek 5, str. 21).

Aminokyselinové zbytky v aktivním místě proteinkináz se navíc významně nepodílí na vazbě ATP. Tato skutečnost připadá jiným aminokyselinovým zbytkům, jakými je například zmiňovaný konzervovaný K71/54 v N-koncovém laloku (Madhusudan *et al.* 1994).

Lysinový zbytek na pozici 168/151 v primární sekvenci téměř sousedí s HRD motivem a hraje roli při vazbě substrátového proteinu a především orientaci terminálního fosfátu ATP do polohy vhodné pro nukleofilní atak. Zároveň se tento lysinový zbytek částečně podílí na vazbě substrátového proteinu tvorbou vodíkového můstku s karbonylovou skupinou peptidové vazby mezi P-2 a P-1 zbytkem (P je označení pro aminokyselinový zbytek substrátového proteinu, kde dochází k fosforylaci, záporná číslce značí vzdálenost aminokyselinového zbytku směrem k N-konci od pozice fosforylace, kladná číslce značí vzdálenost aminokyselinového zbytku směrem k C-konci od pozice fosforylace) (Madhusudan *et al.* 1994).

4.6. DFG motiv smyčky vzájemný hořčík

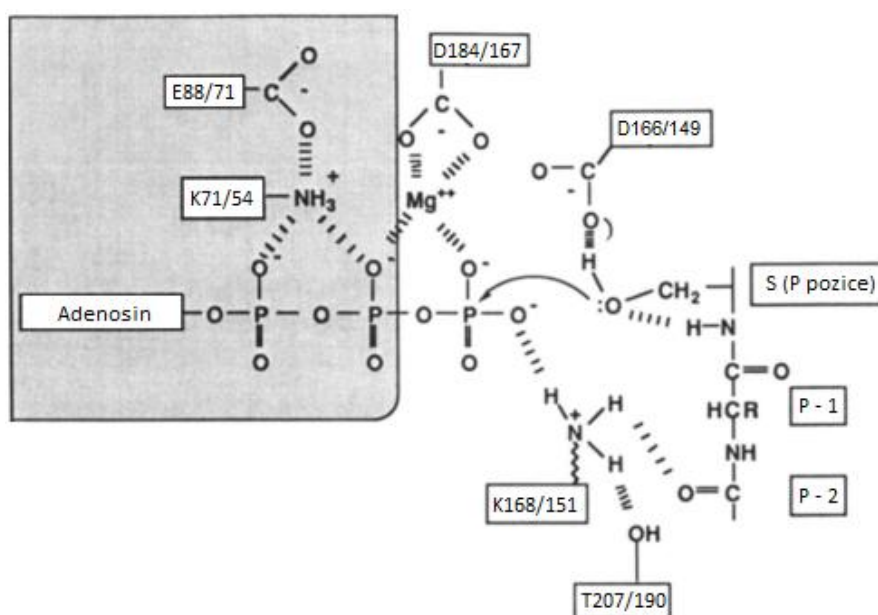
Hořčík vazebná smyčka (DFGLA) zahrnuje DFG motiv a aminokyselinové zbytky významné v katalytickém mechanismu proteinkináz. Postranní skupina příslušného aminokyselinového zbytku interaguje přímo s fosfáty ATP nebo skrze interakci s hořčíkovými kationty. DFG motiv ohraničuje N-konec aktivačního segmentu a je důležitou součástí proteinkináz, nachází se v subdoméně VII (Sternberg & Taylor 1984; Canagarajah *et al.* 1997; Kornev *et al.* 2006).

První aminokyselinový zbytek DFG motivu (D184/167) působí skrze elektrostatické interakce a vodíkové můstky na kationty hořčíku a zároveň na fosfáty příslušející molekule ATP (viz Obrázek 5, str. 21). Pomáhá tím orientovat ATP do pozice vhodné pro katalýzu. Další aminokyselinový zbytek z DFG motivu (G186/169) je při přechodu enzymu z neaktivní do aktivní konformace reorientován, vzniká vodíkový můstek mezi amidovou skupinou peptidové vazby G186/169 a kyslíkem postranní skupiny D184/167. Aminokyselinový zbytek D184/167 je tímto způsobem naveden do konformace nutné pro jeho funkci. Změny konformace G186/169 je dosaženo vznikem antiparalelního β listu 6 a 9, který je typický pro aktivovanou formu proteinkináz. Antiparalelní β list, složený z β vláken 6 a 9, vzniká po interakci fosforylovaného T202/185 s R189/172. Argininový zbytek je prvním zbytkem na β vlákně 9. V inaktivním stavu se antiparalelní β list neutváří (Zheng *et al.* 1993; Kornev *et al.* 2006).

Druhý aminokyselinový zbytek DFG motivu (F185/168) hraje významnou úlohu v nastavení aminokyselinových zbytků podílejících se na interakcích s fosfáty molekuly ATP. Napomáhají tak optimální orientaci fosfátů molekuly ATP pro přenos terminálního fosfátu na substrátový protein. Benzylová postranní skupina F185/168 hydrofobně interaguje s uhlíky postranní skupiny K71/54 na β 3 vlákně. Napomáhá tím ke vzniku interakcí mezi K71/54 a E88/71, aminokyselinových zbytků nezbytných pro funkci proteinkinázy. Aminokyselinový zbytek F185/168 zároveň interaguje s HRD motivem, přesněji řečeno s postranní skupinou histidinového zbytku (H164/147). Tato interakce je důležitá pro orientaci aminokyselinového zbytku D166/149, který je zodpovědný za oddálení vodíku náležícího -OH skupině aminokyselinového zbytku substrátového proteinu, který má být

fosforylován. Kyslík hydroxylové skupiny serinu nebo treoninu pak nukleofilním atakem napadá terminální fosfát z ATP (Kornev *et al.* 2006).

Obrázek 5: Model mechanismu katalýzy fosforylace zprostředkované lidskými homology ERK1/2. V tomto zobrazení je aminokyselinový zbytek D166/149 vyobrazen jakožto akceptor vodíkového můstku. D184/167 interaguje s kationtem hořčíku stabilizující β a γ fosfáty molekuly ATP. Aminokyselinový zbytek E88/71 skrze vodíkový můstek a elektrostatické interakce ovlivňuje postranní skupinu K71/54. Aminokyselinový zbytek K71/54 usměrňuje α a β fosfáty molekuly ATP. Aminokyselinový zbytek K168/151 interaguje s peptidovou kostrou substrátového proteinu a zároveň pomáhá orientovat γ fosfát ATP. Aminokyselinový zbytek T207/190 interaguje s postranní skupinou K168/151 nastavuje tak správnou orientaci postranní skupiny K168/151. Upraveno podle (Madhusudan *et al.* 1994).

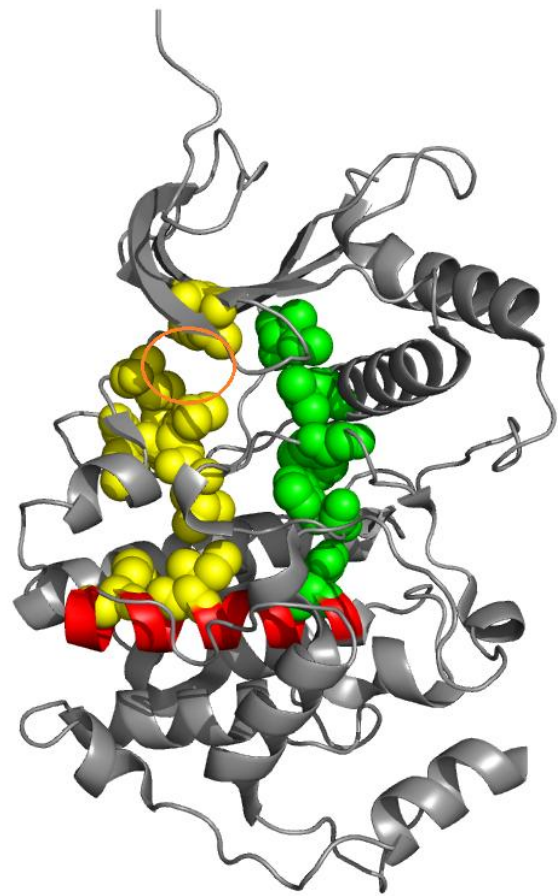


4.7. Regulační a katalytický hřbet

Struktury nazývané hřbety (z ang. spines) jsou zodpovědné za pohyb N- a C-koncového laloku vůči sobě. Zároveň se významně podílí na stabilizaci aktivní formy proteinkinázy. Katalytický hřbet (z ang. C spine, Catalytic spine) se podílí na vazbě ATP a regulační hřbet (z ang. R spine, Regulatory spine) se podílí na mechanismu katalýzy. Významným znakem těchto struktur je jejich mobilita v rámci uspořádání a stabilita v rámci celku. Definované aminokyselinové zbytky tvořící regulační, respektive katalytický hřbet se nenacházejí v sousedství v rámci primární struktury, která by je předurčovala k určité funkci. Pro funkci hřbetů je nezbytná aktivace v případě regulačního hřbetu a vazba ATP v případě katalytického hřbetu (Kornev *et al.* 2008).

Regulační hřbet se skládá z aminokyselinových zbytků nacházejících se v N- i C-koncové doméně (viz Obrázek 6). Jedná se o aminokyselinové zbytky L92/75, I103/86, H164/147 (z HRD motivu), F185/168 (z DFG motivu) a D227/210. Ve vyšších strukturách aktivované formy enzymu ERK1/2 nabývají tyto aminokyselinové zbytky specifické struktury interagující převážně přes hydrofobní interakce, čímž jsou stabilizovány. D227/210 se nachází na α F helixu v C-koncovém laloku a skrze postranní řetězec interaguje s H164/147. Aminokyselinové zbytky H164/147 a F185/168 interagují vzájemně skrze hydrofobní interakce postranních skupin, F185/168 zároveň hydrofobně interaguje s L92/75. Aminokyselinový zbytek L92/75 hydrofobně interaguje s I103/86. Tímto způsobem vzniká řada hromadících se interakcí, které stabilizují proteinkinázu ERK1/2 během pohybů v katalytickém cyklu (Lu *et al.* 2005; Kornev *et al.* 2006).

Obrázek 6: ERK2 s vyznačenými hřbety. Katalytický hřbet (žlutě označené aminokyselinové zbytky), a regulační hřbet (zeleně označené aminokyselinové zbytky); α F helix (červená sekundární struktura); oranžový kruh označuje místo vazby dusíkaté báze molekuly ATP. PDB ID: 1TVO.



Součástí katalytického hřbetu je dusíkatá báze molekuly ATP, která se podílí na jeho stabilizaci. Vazba ATP je tak dalším faktorem podílejícím se na stabilizaci ERK1/2. Katalytický hřbet se skládá z V56/39, A69/52, L173/156, L172/155, M125/108, I234/217, M238/221 a I174

u ERK1, L157 u ERK2. Dusíkatá báze molekuly ATP interaguje s katalytickým hřbetem mezi aminokyselinovými zbytky V56/39, A69/52 a L173/156 (Kornev *et al.* 2008).

Aminokyselinové zbytky I234/217 a M238/221 se nacházejí na α F helixu, hydrofobní sekundární struktuře, která je považována za jednu z nejstabilnějších v celém proteinu ERK1/2 a v eukaryotických proteinkinázách obecně. Stabilita je zajištěna hydrofobními vlastnostmi α F helixu a hydrofobními interakcemi s α H helixem (Kornev *et al.* 2008).

Sekundární struktura α F helixu se podílí na interakcích s I167/150. Tento aminokyselinový zbytek v primární sekvenci okamžitě následuje HRD motiv. Hydrofobní vlastnosti α F helixu mají za následek nekovalentní vazbu s I167/150, čímž se zabrání možným prostorovým omezením postranní

skupiny leucinu s postranními skupinami aminokyselinových zbytků HRD motivu. Aminokyselinový zbytek I167/150 zaujímá konformaci, která dovolí lepší uspořádání aminokyselinových zbytků (D166/149 a K168/151) nutných pro katalýzu zprostředkovanou ERK1/2 (Kornev *et al.* 2008).

4.8. Fosforylační motiv a motiv vázající P+1 aminokyselinový zbytek

Motiv, který proteinkináza ERK1/2 rozpoznává a fosforyluje má podobu P-X-(S/T)-P (přičemž na pozici vyznačené X nesmí být prolin). Prolin na pozici P+1 je významným faktorem, který se považuje za nezbytný z hlediska funkce ERK1/2 (Clark-Lewis *et al.* 1991). Na pozici P-2 se vyskytuje hydrofobní aminokyselinový zbytek s preferencí pro prolin (Songyang *et al.* 1996).

Motiv specificky rozeznávající P+1 je již popsána. Jedná se o krátký úsek osmi aminokyselinových zbytků (YVATR WYR) odpovídající pozicím 204 až 211 v případě ERK1 a 187 až 194 v případě ERK2. Tato sekvence nacházející se v subdoméně VIII obsahuje část aktivačního pysku s tyrosinovým zbytkem na pozici 204/187, který je fosforylovaný v aktivované formě ERK1/2 (Anderson *et al.* 1990; Payne *et al.* 1991; Canagarajah *et al.* 1997).

Fosforylovaný Y204/187 tvoří na povrchu proteinu spolu s dalšími aminokyselinovými zbytky doménu podílející se na rozpoznání a vazbě substrátového proteinu. Aminokyselinové zbytky podílející se přímo na konstrukci místa vazby P+1 jsou Y204/185, V205/188 a R211/194. V inaktivní formě ERK1/2 aminokyselinové zbytky R211/194 a V205/188 blokují vazebné místo a zamezují tak vazbě P+1 aminokyselinového zbytku. Fosforylovaná forma Y204/187 pomocí slabých interakcí upravuje pozici R208/191 a R211/194, čímž umožňují vazbu aminokyselinového zbytku P+1. Další aminokyselinové zbytky podstupují v závislosti na fosforylaci Y204/187 malé přesuny v rámci terciární struktury a zároveň dávají vznik vodíkovým můstkům, které interagují s hlavními aminokyselinovými zbytky tvořící P+1 vazebné místo, stejně jako s peptidovou kostrou substrátového proteinu (Zhang *et al.* 1994; Canagarajah *et al.* 1997).

Prolin nacházející se v konformaci *trans* se zdá být jediným možným aminokyselinovým zbytkem o specifické konformaci, který je možno vázat v P+1 vazebném místě na ERK1/2. Jiné aminokyselinové zbytky jsou kvůli jejich postranním skupinám vytěšňovány argininem na pozici 211/194. Prolin je zároveň jediný aminokyselinový zbytek, který je schopen dlouhodobě zaujímat nutnou konformaci pro vazbu do P+1 místa (Canagarajah *et al.* 1997).

5. Interakční motivy a vazebná místa

Proteinkináza ERK1/2 interaguje se substrátovými proteiny i s proteiny, které nemusí být substrátové, skrze stejná konzervovaná vazebná místa. Příkladem nesubstrátových proteinů proteinkinázy ERK1/2 mohou být tzv. cytosolické kotvy (jako kotva je označován protein, s kterým ERK1/2 interaguje a je tak zajištěno setrvání této proteinkinázy v cytosolu nebo v buněčném

kompartmentu za určitých fyziologických podmínek) (Reszka *et al.* 1995; Fukuda *et al.* 1997; Rubinfeld *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2000; Lee *et al.* 2004). V této práci jsou tyto proteiny souhrnně označovány jako *interakční partneři*.

Proteinkináza ERK1/2 obsahuje dvě významná vazebná místa. Tato vazebná místa jsou v této práci označována jako místo vázající LXL motiv a místo vázající FXFP motiv. Místo vázající LXL motiv, váže LXL motiv lokalizován na interakčních partnerech. Místo vázající FXFP motiv váže FXFP motiv lokalizován na interakčních partnerech. Názvy těchto vazebných míst a motivů jsou historické a vzhledem k novějším poznatkům tyto označení zcela přesně neodpovídají. Přesto jsou v této práci použity, jelikož nejlépe popisují podobu motivů (Yang *et al.* 1998; Jacobs *et al.* 1998, 1999; Lee *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2006).

Jelikož fosforylační motiv není dostatečný pro vazbu proteinu ERK1/2, nabývají tak vazebné motivy na vysokém významu. Vazebné motivy předurčují, který protein se stane substrátem proteinkinázy ERK1/2, fosforylační místo tuto roli nemá. Lokalizace těchto vazebných motivů může rozhodovat o tom, který fosforylační motiv bude fosforylován jakou proteinkinázou a zda vůbec fosforylován bude. S navýšením vazebných motivů ve struktuře proteinů se zvyšuje i šance na rozponání příslušnou proteinkinázou (Jacobs *et al.* 1999).

LXL motiv a FQFP motiv jsou konzervované prvky a vyskytují se v řadě MAPK drahách v jiných organizmech než v člověku, jako například u *Saccharomyces cerevisiae*, *Ceanorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* aj. (Bardwell & Thorner 1996; Jacobs *et al.* 1999).

5.1. LXL motiv

LXL motiv má konsenzus sekvence K/R-X₍₀₋₂₎-K/R₍₁₋₂₎-X₍₁₋₄₎-L/I-X-L/I. Leucinové a isoleucinové zbytky, nacházející se v hydrofobní konsenzus sekvenci LXL motivu, jsou často konzervované, avšak vcelku častým, je zastoupení L/I alaninovým nebo valinovým aminokyselinovým zbytkem. Dá se tedy usuzovat, že pozice L/I vyžaduje hydrofobní aminokyselinový zbytek (Jacobs *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2000).

LXL motiv je sám o sobě dostačující signál pro vazbu interakčního partnera na kinázu ERK1/2. Navíc, tento motiv uskutečňuje i vazbu s proteinkinázou JNK. Proteiny, které v primární sekvenci obsahují sekvenci LXL motivu, mohou být vázány proteinkinázou ERK1/2 i JNK. Zdali jsou takové proteiny i substráty záleží na fosforylačním místě (Yang *et al.* 1998; Jacobs *et al.* 1999).

Před N-koncem LXL motivu (tj. v blízkosti před prvním pozitivně nabitým aminokyselinovým zbytkem LXL motivu) se v některých interakčních partnerech enzymů ERK1/2 nachází hydrofobní aminokyselinový zbytek. Jelikož se nejedná o znak, který by se vyskytoval u každého proteinu vázající se k ERK1/2 pomocí LXL motivu, nebývá zahrnut do konsenzus sekvence. Tento znak není specifický pro určitou skupinu interakčních partnerů enzymů ERK1/2 (Zhou *et al.* 2006).

5.2. Vazebné místo LXL motivu

Pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky nacházející se na N-konci LXL motivu jsou vázány tzv. obecnou vazebnou doménou (přesto, že jde o pouhé dva aminokyselinové zbytky D335/318 a D338/321, bylo této sekvenci přidáno přízvisko doména, převzato z ang. common binding domain), která je součástí vazebného místa LXL motivu. Jedná se o aminokyselinové zbytky ekvivalentní k aminokyselinovým zbytkům homologů ERK1/2 modelových organismů *Xenopus laevis* a *Rattus norvegicus*, na kterých byla jejich funkce popsána. Aminokyselinový zbytek D338/321 na enzymu ERK1/2 interaguje skrze elektrostatické interakce s pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky blíže k C-konci motivu. Na stejné interakci, avšak pouze s jedním pozitivně nabitým aminokyselinovým zbytkem LXL motivu se podílí E98/81 nacházející se ve spojovací oblasti mezi α C a β 4 sekundárními strukturami proteinkinázy ERK1/2. Na vazbě pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků na N-konci LXL motivu se podílí i další aminokyselinové zbytky proteinu ERK1/2. Tyto interakce nejsou tak specifické jako vazby uskutečněné obecnou vazebnou doménou. Jedná se o vodíkové můstky s peptidovou kostrou pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků LXL motivu. Tyto interakce uskutečňuje Y145/128. Další aminokyselinové zbytky se podílí na stabilizaci obecné vazebné domény skrze komplikovanou síť nekovalentních interakcí (Rubinfeld *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2006).

Po interakci obecné vazebné domény s pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky LXL motivu dojde k strukturním změnám na proteinu ERK1/2. Tyto změny se týkají sekundární struktury aktivačního pysku, kde dojde k zpřístupnění aminokyselinových zbytků T202/185 a Y204/187 pro okolní prostředí. Vazba pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků na obecnou vazebnou doménu má vliv i na terciární strukturu ERK1/2. V tomto případě dojde ke vzniku nových intramolekulárních interakcí, které mají za následek vyšší kompaktnost enzymu (Zhou *et al.* 2006).

Relativně nespecifická interakce je uskutečněna mezi hydrofobní částí konsenzus sekvence LXL motivu a místem vazby této části motivu na vazebném místě LXL motivu enzymu ERK1/2. První hydrofobní aminokyselinový zbytek hydrofobní částí konsenzus sekvence LXL motivu interaguje s aminokyselinovými zbytky na povrchu α E helixu (H142/125, Y145/128) a C178/161. Druhý hydrofobní aminokyselinový zbytek hydrofobní částí konsenzus sekvence LXL motivu interaguje s L132/115, F146/129, I174 (u ERK1), L157 (u ERK2) a také s C178/161. Aminokyselinový zbytek C178/161 se podílí na interakcích s oběma hydrofobními zbytky LXL motivu (Zhou *et al.* 2006).

Některé aminokyselinové zbytky nabývají své funkce v závislosti na primární sekvenci v oblasti LXL motivu. Jsou tak popsány interakce mezi aminokyselinovými zbytky proteinkinázy ERK1/2 a postraními skupinami aminokyselinových zbytků peptidového substrátů, přičemž se jedná o aminokyselinové zbytky, které se neobjevují v konsenzus sekvenci LXL motivu jako konzervované. Tyto interakce tak nejsou závislé na konzervovaných aminokyselinových zbytcích LXL motivu.

Například aminokyselinový zbytek vazebného místa LXL motivu Q136/119 tvoří vodíkové můstky s peptidovou kostrou LXL motivu. Podobným způsobem se na vazbě proteinového substrátu podílí H142/125 interagující s karbonylovou skupinou peptidové vazby, na které se podílí nekonzervovaný aminokyselinový zbytek X v LXL motivu (Zhou *et al.* 2006).

5.3. FXFP motiv

Sérií experimentů se skupina Jacobs *et al.* pokusila určit FQFP sekvenci na některých proteinových substrátech ERK jakožto sekvenci tvořící motiv nezbytný pro vazbu proteinkinázy ERK2. Vytvořili několik peptidových segmentů, které se skládaly z úseků známých proteinových substrátů ERK2 z různých organismů včetně člověka (LIN-1, Elk-1, Aop). Tyto peptidy obsahovaly nativní FQFP motiv, respektive FQFHP motiv v případě proteinu Aop z modelového organismu *Drosophila melanogaster*. V těchto peptidových segmentech se zároveň nacházelo fosforylační místo, rozeznávané příslušnými homology proteinkinázy ERK. Skupina Jacobs *et al.* dále připravila mutanty, ve kterých byla sekvence domnělého vazebného motivu mutována do podoby AAAP. Byla prokázána vysoká vazebná afinita proteinkinázy k substrátům obsahující nativní sekvenci. Oproti tomu mutované sekvence s AAAP motivem měly K_m několika násobně vyšší než segmenty s motivem vazebným (Jacobs *et al.* 1999).

V dalších experimentech byl použit segment LIN-1 proteinu obsahující potenciální fosforylační místa, ale bez FQFP sekvence. Takový peptidový segment byl špatným substrátem pro myší proteinkinázu ERK2. Pokud byla ke stejné aminokyselinové sekvenci přidána FQFP sekvence, značně se zvýšila afinita k tomuto substrátu. Přidání další FQFP sekvence znamenalo další zvýšení afinity k myšimu enzymu ERK2 (Jacobs *et al.* 1999).

Oba fenylalaninové zbytky nacházející se v FQFP motivu mají významnou roli ve vysoce specifické vazbě tohoto segmentu k homologům proteinkinázy ERK. Mutace fenylalaninů FQFP motivu v sekvenci krátkého peptidu, který zároveň obsahoval PRSP sekvenci, úsek aminokyselinových zbytků, který vykazuje vlastnosti pro fosforylaci enzymem ERK1/2 (viz kapitola 4.8. Fosforylační motiv a motiv vázající P+1 aminokyselinový zbytek) několika násobně zvýšila K_m . Vzhledem k výjimečným konformačním strukturám prolinu nacházejícího se v FQFP motivu, se usuzuje, že by tento aminokyselinový zbytek mohl mít důležitý vliv na sekundární strukturu motivu. Jelikož glutamin není podmínkou pro zajištění interakce, byla konsenzus sekvence určena jako FXFP, kde X je neupřesněný aminokyselinový zbytek. Navíc byl tento motiv nalezen i u jiných proteinů, Q v takových případech nebyl zachován (Jacobs *et al.* 1999).

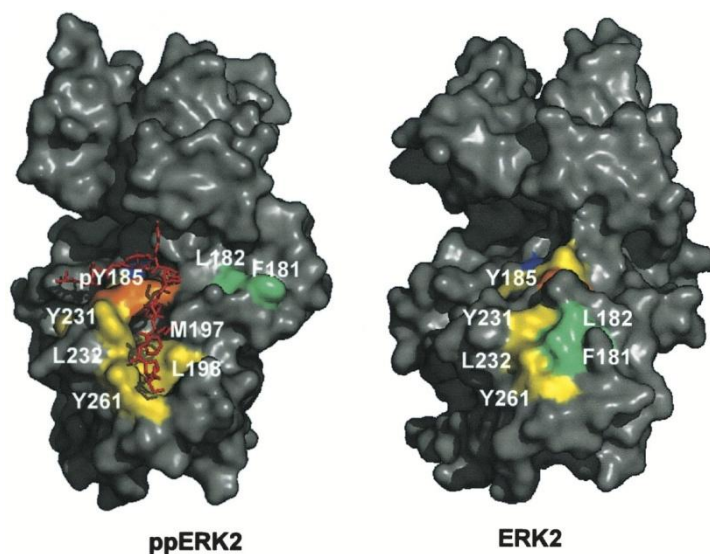
FQFP motiv je efektivní pro vazbu na ERK, což se podařilo prokázat také *in vivo*. Krátké peptidové segmenty obsahující FQFP motiv, totiž fungují jako inhibitory MAPK/ERK signální kaskády. Hladina fosforylovaných ERK nebyla pozměněna, na druhou stranu byla ovlivněna aktivita MAPKAPK,

konkrétně cdc2 kinázy v nematurovaných oocytech *Xenopus leavis*. Navíc mutované formy proteinu LIN-1 v organismu *Caenorhabditis elegans*, které nesou mutace narušující FXFP motiv, nejsou fosforylovány homologem proteinu ERK2, což má za následek defekt ve vývoji organismu (Jacobs *et al.* 1998, 1999).

5.4. Vazebné místo FXFP motivu

Vazebné místo FXFP motivu se skládá z aminokyselinových zbytků M216/199, L217/200, Y250/233, L251/234, L254/237 a Y280/263, které tvoří hydrofobní strukturu, do níž se váže FXFP motiv. Substrátový protein je interakcí s vazebným místem FXFP motivu nucen lokálně remodelovat svojí sekundární strukturu, což dovoluje vznik další interakce, a to mezi prvním fenylalaninovým zbytkem FXFP motivu a fosforylovaným Y204/187 (Lee *et al.* 2004).

Nejvyšší afinity vazby FXFP motivu je dosaženo, pokud je protein ERK1/2 plně aktivován. V takovém případě dochází k změně sekundárních struktur aktivačního segmentu, které mají za následek zrušení hydrofobních interakcí M216/199, L217/200, Y250/233 a L251/234 s F200/183 a L201/184. Aminokyselinové zbytky tvořící vazebné místo FXFP motivu jsou tak uvolněny z této blokující interakce a mohou vázat FQFP motiv (viz Obrázek 7) (Lee *et al.* 2004).



Obrázek 7: Model aktivované a neaktivované formy kryšihého homologu proteinkinázy ERK2. Molekula označená ppERK2 zobrazuje fosforylovanou formu proteinu ERK2 s označenými aminokyselinovými zbytky, které jsou ekvivalentní k pozicím lidských homologů tohoto proteinu. Struktura zároveň obsahuje navázaný substrátový peptid. Molekula označená ERK2 je vyobrazením neaktivní formy proteinkinázy s aminokyselinovými zbytky F181 a F182 (u lidského ERK2 jde o F183 a L184) v pozici částečně blokující vazebné místo pro FXFP motiv. Model byl utvořen podle dat skupin Canagarajah *et al.* 1997 a Zhang *et al.* 1994, skupinou Lee *et al.* 2004. Převzato z (Lee *et al.* 2004).

Pozice vazebného místa FXFP motivu na ERK1/2 se z hlediska terciární struktury nachází v těsné blízkosti místa, kde je uskutečněn přenos terminálního fosfátu ATP na hydroxylovou skupinu serinového nebo treoninového zbytku substrátového proteinu. Tento poznatek vysvětluje pozici FXFP motivu na C-konci od S/TP fosforylačního místa. Navíc je důležitá i vzdálenost mezi FXFP motivem a fosforylačním místem substrátovém proteinu. Pokud by byla vzdálenost kratší než 6 aminokyselinových zbytků nemohlo by docházet zároveň k vazbě substrátu přes FXFP motiv a zároveň k fosforylaci. V takovém případě by se tyto motivy nacházely blízko a nemohly by tak být rozpoznány oběma místy na ERK1/2 zároveň (Lee *et al.* 2004).

6. Interakční partneři

Vliv ERK1/2 na buněčné procesy je relativní a závisí na kontextu ostatních signálních kaskád. V roce 2006 byl publikován článek autorů Yoon a Seger, ve kterém prezentují podrobnou tabulku obsahující známé substráty proteinkinázy ERK1/2 v různých organizmech. V době vydání publikace bylo známo více než 150 proteinových substrátů proteinkinázy ERK1/2 (Yoon & Seger 2006). Je možno uvažovat, že dnes bude toto číslo téměř dvojnásobné.

6.1. c-Fos a c-Jun jako proteinové substráty ERK1/2

Transkripční faktor c-Fos je součástí transkripčního komplexu AP-1. Je fosforylován enzymem ERK1/2 a také enzymem RSK (ERK1/2 MAPKAPK) na několik místech. Fosforylace na proteinu c-Fos má za následek zvýšenou stabilitu proteinu, fosforylovaný c-Fos setrvává v jádře několik hodin. Fosforylace na c-Fos zároveň vede k odhalení FXFP motivu, který sice neodpovídá ideální konsenzus sekvenci, nicméně je tato sekvence dostatečná pro vazbu ERK1/2. Tím dojde k další fosforylaci na proteinu c-Fos, která z transkripčního faktoru učiní plně funkční a stabilní protein (Murphy *et al.* 2002; Eferl & Wagner 2003).

Proteinkinázy ERK1/2 se podílí na stabilizaci z hlediska prevence degradace a aktivaci pomocí fosforylace i jiných velmi časných genů (z ang. Immediate early genes, IEG), jakými jsou například Fra-1, Fra-2, c-Myc, c-Jun aj. (Murphy *et al.* 2004).

Situace týkající se c-Jun je částečně komplikována tím, že tento transkripční faktor neobsahuje FXFP motiv. Jedná se tak o jeden z mála případů, kdy je substrát pro enzym ERK1/2 bez vazebného motivu, zprostředkávající interakci s proteinkinázou ERK1/2. K fosforylaci c-Jun tak nejspíš dochází až po jeho asociaci v heterodimeru s proteinem c-Fos. Tento komplex je pak cílem pro dimer ERK proteinů, rozpoznávající a fosforylující c-Fos, a zároveň fosforyluje c-Jun (viz kapitola 7. Dimerizace ERK) (Murphy *et al.* 2004).

6.2. Interakce s proteiny jaderného póru

Translokace ERK1/2 do jádra je vedle volné difuze a přenosem dimerů těchto proteinů pomocí importinů zprostředkována i dalším způsobem. Jedná se o interakci proteinkinázy ERK1/2 se samotnými proteiny jaderného póru. Proteinkináza ERK1/2 interaguje s nukleoporiny Nup153 nebo Nup214. Interakce je uskutečněna přes FG repetice, které jsou rozeznávány FXFP vazebným motivem, a to i v neaktivovaných proteinkinázách ERK1/2. Neaktivní proteinkináza ERK1/2 je tak schopna rozeznat FG repetice bez potřeby aktivace, jelikož se v případě FG repetice nejedná o ideální konsenzus sekvenci tvořící motiv (Matsubayashi *et al.* 2001; Whitehurst *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004).

6.3. ERK1/2 jako substrát proteinkinázy CK2

Enzym ERK1/2 je substrátem proteinkinázy CK2. K fosforylaci dochází na SPS motivu, který se skládá z aminokyselinových zbytků odpovídající lidským ekvivaletům S263/246, P264/247 a S265/248. SPS motiv funguje jako jaderný NTS (signál zajišťující přemístění do jádra, z ang. nuclear translocation signal). Fosforylace je sice uskutečněna na obou serinových zbytcích, ale významově se liší. Fosfoserinový zbytek na pozici 265/248 je naprosto nezbytný pro NTS zprostředkovaný přenos do jádra, zatímco fosforylace na S263/246 urychluje jaderný přesun. Posttranslační modifikace S263/246 může být uskutečněna jak proteinkinázou CK2, tak i jinou proteinkinázou ERK1/2. Fosforylace na serinových zbytcích má za následek vazbu proteinu importin 7 (Imp7), což vede k lokalizaci ERK1/2 do jádra. Mutagenézí aminokyselinových zbytků nacházejících se v SPS motivu byla zvýšena kolokalizace mutantních proteinkináz v cytoplazmě i po stimulaci. Při nahrazení obou serinů kyselinou glutamovou, došlo k translokaci ERK1/2 do jádra (Chuderland *et al.* 2008; Plotnikov *et al.* 2011).

In vivo dochází k fosforylaci na NTS proteinkinázy ERK1/2 enzymem CK2 pouze u aktivovaných enzymů ERK1/2, tedy u těch, které neinteragují s cytosolickou kotvou. Takto modifikovaný enzym opouští interakci s kotevními proteiny (Plotnikov *et al.* 2011).

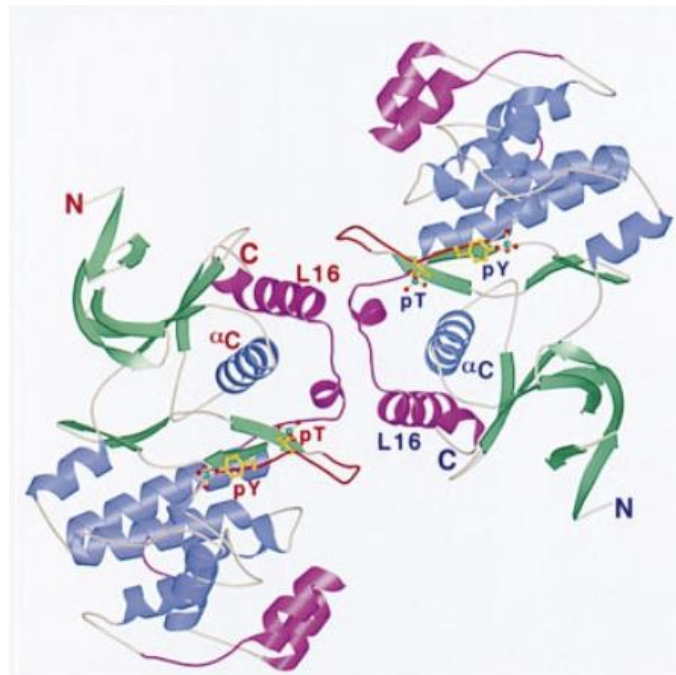
Fosforylace na SPS usnadňuje disociaci z proteinů Nup153 a Nup214. Enzym ERK1/2 se tak po translokaci do jádra uvolní a fosforyluje jaderné substráty (Chuderland *et al.* 2008).

7. Dimerizace proteinů ERK

Fosforylace ERK2 na aminokyselinových zbytcích v aktivačním pysku je hlavním induktorem translokace do jádra. Zároveň fosforylace ERK1, respektive ERK2, vede k vazbě dalšího monomeru ERK1 nebo ERK2 (viz Obrázek 8, str. 30), což je krok nezbytný pro specifickou jadernou translokaci. Mohou vznikat i heterodimery ERK1/ERK2, ale jejich stabilita je velmi nízká i v porovnání k nízké stabilitě homodimerů aktivované a neaktivované formy ERK2. Vazba fosforylovaného ERK2 k dalšímu monomeru ERK2 není závislá na fosforylaci tohoto monomeru (Khokhlatchev *et al.* 1998).

Pomocí mutačních analýz se podařilo identifikovat aminokyselinové zbytky, které se podílí na dimerizaci proteinů ERK1/2. V případě krysího homologu ERK2 se jedná o aminokyselinové zbytky P174, D175, H176, D177 (v případě lidských homologů se jedná o aminokyselinové zbytky na pozicích P193/176, E194 u ERK1 a D177, H195/178, D196/179 u ERK2). Dále se v segmentu L16 nachází definované leucinové zbytky L333, L336, L341, L344 (v případě lidských homologů ERK1/2 se jedná o aminokyselinové zbytky L352/335, L355/338, L360/343, L363/346). Série experimentů prokázala, že tyto zbytky jsou nezbytné pro dimerizaci monomerů ERK2, není však známo jakým způsobem. Mutace leucinů L333, L336, L341 a L344 samotných neměla za následek neschopnost dimerizace ERK2 monomerů (Khokhlatchev *et al.* 1998), což nevylučuje jejich podíl na dimerizaci v nižší míře (Rubinfeld *et al.* 1999).

Na základě krystalografických studií a poznatků zjištěných skupinou Khokhlatchev *et al.* byl navrhnout model fyziologického využití ERK dimerů. Plně aktivovaná forma dimeru ERK by dle tohoto modelu měla být schopna vázat v jeden moment dimer substrátových proteinů, například transkripčních faktorů. Zároveň by docházelo k fosforylaci obou substrátů tvořící dimer. Fosforylace by pak byla účinnější vzhledem k tomu, že by proběhla téměř současně a na dvou místech (Khokhlatchev *et al.* 1998).



Obrázek 8: Kvartérní struktury dimeru krysího homologu proteinkinázy ERK2. Model byl utvořen skupinou Khokhlatchev *et al.* na základně dat získaných skupinou Canagarajah *et al.* Upraveno podle (Canagarajah *et al.* 1997; Khokhlatchev *et al.* 1998).

Tento model zároveň přináší hypotézu o způsobu regulace hladiny, kdy je síla signálu indukující aktivaci ERK1/2 dostatečná pro odpověď na úrovni transkripce genů ovlivněných aktivovanými transkripčními faktory. Tato hypotéza přivádí do regulace ERK1/2 signalizace faktor zajišťující snížení efektivity odezvy MAPK/ERK signální kaskády při doznívajícím signálu. Když není signál dostatečně silný pro aktivaci velkého množství ERK1/2, tak vznikají dimery aktivované a neaktivované formy, které tak autoregulují aktivaci transkripčních faktorů tím způsobem, že dochází k jejich fosforylaci postupně, nikoli současně jako v případě dimerů ERK skládajících se z dvou aktivovaných forem stejného proteinu. Odezva na úrovni transkripce genů, které jsou aktivované fosforylovanými transkripčními faktory pak není tak silná a rychlá, jako by byla při dlouhodobé aktivaci MAPK/ERK signální kaskády (Khokhlatchev *et al.* 1998).

Tyto výsledky ve stínu novějších studií nepodávají jednoznačné odpovědi na otázku mechanismu translokace ERK1/2 do jádra. V první řadě se nepodařilo metodami fluorescenční mikroskopie prokázat dimerizaci jakožto nutnosti pro translokaci ERK1/2 do jádra (Burack & Shaw 2005). Tyto protichůdné poznatky vedly ke vzniku dalších studií, které se na téma mechanismu transportu ERK1/2 do jádra plně soustředili. Skupina Lidke *et al.* za použití metod fluorescenční mikroskopie uskutečnila experimenty, kterými studovala v buněčných liniích myši mechanismus translokace ERK z cytoplazmy do jádra. Experiment byl navržen tak, aby hladina mutované formy ERK1 odpovídala hladině určenou za fyziologickou. Tento odhad byl stanoven dle studie výzkumné skupiny Fujioka *et al.* (Fujioka *et al.* 2006). Mutantní forma neobsahovala aminokyselinové zbytky P193, E194, H195 a D196 považované za dimerizační doménu ekvivalentní k ERK2. Tento fúzní mutant s GFP sloužil k porovnání hodnot naměřených s nemutovanou GFP-ERK1 formou. Z těchto experimentů bylo usouzeno, že GFP-ERK1, který by neměl být schopen dimerizovat, je přítomen v jádře (Lidke *et al.* 2010).

8. Závěr

Proteinkináza ERK1/2 je významným enzymem podílejícím se na mnoha buněčných dějích fosforylací příslušných proteinů. Signální dráhy, kterých se ERK1/2 účastní jsou poměrně dobře prozkoumány. Na úrovni struktury, které se tato práce převážně věnuje, je úroveň znalosti poměrně dobrá. Přesto není jisté například, zda přes vysokou sekvenční identitu jsou funkce ERK1 a ERK2 zaměnitelné (Lloyd 2006). Jedním z hlavních cílů výzkumu vědeckých skupin je najít v kontextu buňky funkci proteinu ERK1 nebo ERK2, kterou by druhý protein neměl. To vychází z experimentů provedených na myších s vyřazeným genem pro ERK1 nebo ERK2. Tyto myši se prokazatelně lišily v pozorovaném fenotypu. Kdyby byla funkce ERK1 a ERK2 zaměnitelná, tak by měl být fenotyp totožný (Mazzucchelli *et al.* 2002). Několik studií prezentuje možné rozdíly ve funkcích proteinkináz ERK1 a ERK2. Například N-koncová doména proteinkinázy ERK1 obsahuje krátký úsek aminokyselinových zbytků (v případě krysího homologu se jedná o úsek dvaceti aminokyselinových zbytků), který by mohl zpomalovat rychlost jaderného transportu enzymu (Marchi *et al.* 2008). Další unikátní funkcí ERK1 může být její vliv na iniciaci translace nezávislé na čepičce (Casanova *et al.* 2012).

9. Použitá literatura

- Aelst L van, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M (1993) Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6213–6217.
- Ahn N, Seger R, Bratlien R (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2. *Journal of Biological chemistry*, **266**, 4220–4227.
- Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, **343**, 651–653.
- Baljuls A, Schmitz W, Mueller T, Zahedi RP, Sickmann A, Hekman M, Rapp UR (2008) Positive regulation of A-RAF by phosphorylation of isoform-specific hinge segment and identification of novel phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 27239–27254.
- Bardwell L, Thorner J (1996) A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in biochemical sciences*, **21**, 373–374.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radzilewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65**, 663–675.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, **249**, 64–67.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125–132.
- Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ (1995) Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 9809–9812.
- Buday L, Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, **73**, 611–620.
- Burack WR, Shaw AS (2005) Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 3832–3837.
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90**, 859–869.
- Carrera AC, Alexandrov K, Roberts TM (1993) The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 442–446.

- Casanova CM, Sehr P, Putzker K, Hentze MW, Neumann B, Duncan KE, Thoma C (2012) Automated high-throughput RNAi screening in human cells combined with reporter mRNA transfection to identify novel regulators of translation. *PLoS one*, **7**, e45943.
- Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 8323–8327.
- Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, Campbell SL (1997) 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 20990–20993.
- Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 15180–15184.
- Consortium TU (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research*, **42**, D191–198.
- Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949–954.
- DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR (1992) Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell*, **69**, 265–273.
- Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 3637–3640.
- Drugan JK, Khosravi-Far R, White MA, Der CJ, Sung YJ, Hwang YW, Campbell SL (1996) Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 233–237.
- Eferl R, Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, **3**, 859–868.
- Emrick MA, Lee T, Starkey PJ, Mumby MC, Resing KA, Ahn NG (2006) The gatekeeper residue controls autoactivation of ERK2 via a pathway of intramolecular connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 18101–18106.
- Fu H, Xia K, Pallas D, Cui C, Conroy K, Narsimhan R, Mamon H, Collier R, Roberts T (1994) Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. *Science*, **266**, 126–129.
- Fujioka A, Terai K, Itoh RE, Aoki K, Nakamura T, Kuroda S, Nishida E, Matsuda M (2006) Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 8917–8926.
- Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal*, **16**, 1901–1908.

- Gómez N, Cohen P (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature*, **353**, 170–173.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**, 2424–2428.
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167–1177.
- Hanks S, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal*, **9**, 576–596.
- Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in enzymology*, **200**, 38–62.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42–52.
- Chang EH, Gonda M a, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 4848–4852.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, Aelst L van, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D (1993) Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, **260**, 1338–1343.
- Charest DL, Mordret G, Harder KW, Jirik F, Pelech SL (1993) Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1. *Molecular and cellular biology*, **13**, 4679–90.
- Chuderland D, Konson A, Seger R (2008) Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell*, **31**, 850–861.
- Jacobs D, Beitel GJ, Clark SG, Horvitz HR, Kornfeld K (1998) Gain-of-function mutations in the *Caenorhabditis elegans* lin-1 ETS gene identify a C-terminal regulatory domain phosphorylated by ERK MAP kinase. *Genetics*, **149**, 1809–1822.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & development*, **13**, 163–175.
- Kamps MP, Sefton BM (1986) Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src. *Molecular and cellular biology*, **6**, 751–757.
- Kannan N, Neuwald AF (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein science: A publication of the Protein Society*, **13**, 2059–2077.

- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 18169–18177.
- Khokhlatchev A V, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605–615.
- Kinoshita T, Yoshida I, Nakae S, Okita K, Gouda M, Matsubara M, Yokota K, Ishiguro H, Tada T (2008) Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204. *Biochemical and biophysical research communications*, **377**, 1123–1127.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, **253**, 407–414.
- Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF Ten (2006) Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17783–17788.
- Kornev AP, Taylor SS, Ten Eyck LF (2008) A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14377–14382.
- Krupa A, Preethi G, Srinivasan N (2004) Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *Journal of molecular biology*, **339**, 1025–1039.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**, 417–421.
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min X, Goldsmith EJ, Chen L, Resing K a, Ahn NG (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Molecular cell*, **14**, 43–55.
- Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, **369**, 411–414.
- Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2009) Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle*, **8**, 705–711.
- Lidke DS, Huang F, Post JN, Rieger B, Wilsbacher J, Thomas JL, Pouyssegur J, Jovin TM, Lenormand P (2010) ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 3092–3102.
- Lloyd AC (2006) Distinct functions for ERKs? *Journal of biology*, **5**, 13.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, **70**, 431–442.

- Lu B, Wong C, McCammon J (2005) Release of ADP from the catalytic subunit of protein kinase A: A molecular dynamics simulation study. *Protein science : A publication of the Protein Society*, **14**, 159–168.
- Madhusudan, Trafny EA, Xuong NH, Adams JA, Ten Eyck LF, Taylor SS, Sowadski JM (1994) cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein science : A publication of the Protein Society*, **3**, 176–187.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912–1934.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal*, **14**, 3136–3145.
- Marchi M, D'Antoni A, Formentini I, Parra R, Brambilla R, Ratto GM, Costa M (2008) The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PloS one*, **3**, e3873.
- Masterson LR, Cheng C, Yu T, Tonelli M, Kornev A, Taylor SS, Veglia G (2010) Dynamics connect substrate recognition to catalysis in protein kinase A. *Nature chemical biology*, **6**, 821–839.
- Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E (2001) Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 41755–41760.
- Matsuda S, Kosako H, Takenaka K, Moriyama K, Sakai H, Akiyama T, Gotoh Y, Nishida E (1992) Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *The EMBO journal*, **11**, 973–982.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrizzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber Mu, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Poyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, **34**, 807–820.
- Meister M, Tomasovic A, Banning A, Tikkanen R (2013) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *International journal of molecular sciences*, **14**, 4854–4884.
- Moran MF, Koch CA, Anderson D, Ellis C, England L, Martin GS, Pawson T (1990) Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 8622–8626.
- Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 17309–17316.
- Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J (2004) A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Molecular and cellular biology*, **24**, 144–53.
- Murphy LO, Smith S, Chen R-H, Fingar DC, Blenis J (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature cell biology*, **4**, 556–564.

- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, **302**, 205–217.
- Ohori M, Kinoshita T, Okubo M, Sato K, Yamazaki A, Arakawa H, Nishimura S, Inamura N, Nakajima H, Neya M, Miyake H, Fujii T (2005) Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochemical and biophysical research communications*, **336**, 357–363.
- Owaki H, Makar R, Boulton T (1992) Extracellular signal-regulated kinases in T cells: characterization of human ERK1 and ERK2 cDNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, **182**, 1416–1422.
- Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouysségur J (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 8319–8323.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO journal*, **10**, 885–892.
- Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, Livnah O, Seger R (2011) Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology*, **31**, 3515–3530.
- Powers S, O'Neill K, Wigler M (1989) Dominant yeast and mammalian RAS mutants that interfere with the CDC25-dependent activation of wild-type RAS in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, **9**, 390–395.
- Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Stephenson JR (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 4218–4222.
- Ray LB, Sturgill TW (1988) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 3753–3757.
- Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH (1995) Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 8881–8885.
- Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, **363**, 83–85.
- Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R (1999) Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 30349–30352.
- Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W (2006) Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and cellular biology*, **26**, 2262–2272.

- Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 14373–14381.
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**, 726–735.
- Shih TY, Weeks MO, Young H a, Scolnick EM (1979) p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *Journal of virology*, **31**, 546–556.
- Shimizu K, Goldfarb M (1983) Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 2112–2116.
- Schlessinger J (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends in biochemical sciences*, **13**, 443–447.
- Snyder MA, Bishop JM, McGrath JP, Levinson AD (1985) A mutation at the ATP-binding site of pp60^{v-src} abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. *Molecular and cellular biology*, **5**, 1772–1779.
- Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology*, **16**, 6486–6493.
- Stephens RM, Sithanandam G, Copeland TD, Kaplan DR, Rapp UR, Morrison DK (1992) 95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site. *Molecular and cellular biology*, **12**, 3733–3742.
- Sternberg M, Taylor W (1984) Modelling the ATP-binding site of oncogene products, the epidermal growth factor receptor and related proteins. *FEBS letters*, **175**, 387–392.
- Sturgill TW, Ray LB (1986) Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, **134**, 565–571.
- Takio K, Wade RD, Smith SB, Krebs EG, Walsh KA, Titani K (1984) Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry*, **23**, 4207–4218.
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*, **2**, 110–116.
- Taylor SS, Kornev AP (2011) Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in biochemical sciences*, **36**, 65–77.
- Tommaso P Di, Moretti S, Xenarios I, Orobiteg M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J-F, Notredame C (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA

- sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research*, **39**, W13–W17.
- Trahey M, McCormick F (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, **238**, 542–545.
- Vogel US, Dixon RA, Schaber MD, Diehl RE, Marshall MS, Scolnick EM, Sigal IS, Gibbs JB (1988) Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature*, **335**, 90–93.
- Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205–214.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5**, 875–885.
- Whitehurst AW, Wilsbacher JL, You Y, Luby-Phelps K, Moore MS, Cobb MH (2002) ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 7496–7501.
- Wierenga RK, Hol WG (1983) Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant. *Nature*, **302**, 842–844.
- Yang SH, Yates PR, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD (1998) The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Molecular and cellular biology*, **18**, 710–720.
- Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*, **24**, 21–44.
- Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, **364**, 308–313.
- Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*, **367**, 704–711.
- Zheng J, Knighton DR, ten Eyck LF, Karlsson R, Xuong N, Taylor SS, Sowadski JM (1993) Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry*, **32**, 2154–2161.
- Zhou T, Sun L, Humphreys J, Goldsmith EJ (2006) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure*, **14**, 1011–1019.
- Zhu J, Balan V, Bronisz A, Balan K (2005) Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding. *Molecular biology of the cell*, **16**, 4733–4744.
- Zoller MJ, Taylor SS (1979) Affinity labeling of the nucleotide binding site of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using p-fluorosulfonyl-[¹⁴C]benzoyl 5'-adenosine. Identification of a modified lysine residue. *The Journal of biological chemistry*, **254**, 8363–8368.