

Використання дріжджової двогібридної системи для пошуку S6K1 та S6K2 зв'язуючих партнерів

О. М. Живолуп¹, І. О. Немазаній¹, Н. В. Побігайло¹, Г. Г. Панасюк¹,
С. С. Пальчевський¹, О. П. Кухаренко¹, Л. О. Савінська¹, Г. В. Овчаренко¹,
М. І. Вудмаска¹, І. Т. Гут^{1,2}, Г. Х. Мацука¹, В. В. Філоненко¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Інститут Людвіга з вивчення раку
W1P8BP, Лондон, 91, Райдинг Хаус Стрит, Велика Британія

Кіназа рибосомного білка S6 (S6K) задіяна в сигнальних механізмах регуляції проліферації, диференціації та клітинного росту. На сьогодні відомо дві форми S6K (S6K1 та 2), які мають цитоплазматичний та ядерний сплайсингові варіанти. Відомо лише декілька фізіологічних субстратів S6K і партнерів її білково-білкової взаємодії. Для пошуку нових партнерів взаємодії з S6K1 та 2 нами використано дріжджову двогібридну систему. За допомогою аналізу шести створених «bait»-конструктів виявлено, що тільки повнорозмірна форма S6K1 відповідала вимогам двогібридного скринінгу. Великомасштабний скринінг кДНКової бібліотеки ембріона миші дозволив нам виявити 26 позитивних клонів, 13 з яких підтверджено методом статевого злиття. Рестрикційні дослідження і аналіз послідовностей даних клонів показали, що всі вони містять кДНК розміром близько 4000 п. н. з однаковою картиною рестрикції та послідовностями на 5'- та 3'-кінцях. Порівняння отриманих послідовностей з геномними та білковими банками даних засвідчило, що кДНК одержаних клонів кодує фрагмент нового білка. Первинна структура даного білка та особливості його взаємодії з S6K знаходяться в процесі вивчення.

Вступ. Останніми роками в галузі виявлення і дослідження специфічних білково-білкових взаємодій одним з найпоширеніших та ефективних підходів є двогібридна система [1]. На даний час відомо ряд варіантів двогібридних систем, які базуються на використанні систем експресії у клітинах бактерій, дріжджів та ссавців. В експериментальній практиці найчастіше використовуються дріжджові системи, основані на ДНК-зв'язуючих доменах білків LexA і Gal4 [2, 3]. Обидві двогібридні системи виявилася дуже плідними в пошуку нових регуляторних взаємодій при передачі сигналу від мембрани до ядра [4–6].

Одним з важливих ферментів у регулюванні експресії генів на рівні трансляції є кіназа рибосом-

ного білка S6 (S6K). S6K належить до серин/треонінових кіназ і відіграє ключову роль у регуляції білкового синтезу, індукованого гормонами, ростовими факторами і онкогенами [7]. Показано також, що S6K є одним з важливих регуляторів клітинного циклу на етапі G1 → S-переходу [8].

Сімейство S6 кіназ включає дві високогомологічні форми — S6K1 і 2, кожна з яких має цитоплазматичний і ядерний сплайсингові варіанти [9]. Основним субстратом *in vivo* для обох кіназ є рибосомний білок S6, фосфорилування якого є критичним у процесі ініціації індукованого білкового синтезу.

Активация S6 кіназ у відповідь на дію мітогенних факторів відбувається шляхом множинного фосфорилування Ser і Thr амінокислотних залишків у регуляторному C-кінцевому та кіназному доменах. В процесі передачі мітогенного сигналу S6K1 бере участь у формуванні мультиферментного комплексу, складові якого на даний час вивчені

© О. М. ЖИВОЛУП, І. О. НЕМАЗАНИЙ, Н. В. ПОБІГАЙЛО,
Г. Г. ПАНАСЮК, С. С. ПАЛЬЧЕВСЬКИЙ, О. П. КУХАРЕНКО,
Л. О. САВІНСЬКА, Г. В. ОВЧАРЕНКО, М. І. ВУДМАСКА,
І. Т. ГУТ, Г. Х. МАЦУКА, В. В. ФІЛОНЕНКО, 2001

недостатньо. Взаємодію S6K з білками сигнальних шляхів показано лише для малих GTP-зв'язуючих білків Cdc42 та Rac, протеїнкінази С типу зета (PKC ζ) і білкової фосфатази 2A (PP2A) [10–12]. Важливим напрямком дослідження ролі даної кінази в клітинних процесах є пошук та ідентифікація нових білків — партнерів взаємодії S6K, які можуть модулювати активність або локалізацію S6 кінази. Тому метою даної роботи був пошук нових партнерів взаємодії з S6K за допомогою дріжджової двогібридної системи [1].

Двогібридна система базується на модульній природі еукаріотичних активаторів транскрипції. Вони складаються щонайменше з двох доменів — ДНК-зв'язуючого та трансактивуючого. Просторове зближення доменів у ядрі спричиняє активацію транскрипції репортерного гена. Кодований плазмідною двогібридною системою ДНК-зв'язуючий домен експресується у вигляді злитого білка за досліджуванним «bait»-білком, а трансактивуючий домен зливають з послідовностями кДНК-бібліотеки («prey»). У дріжджовій клітині, трансформованій обома такими плазмідами, в разі взаємодії «bait»- і «prey»-білків утворюється комплекс, що активує транскрипцію репортерного гена (iv). Як репортерні гени використовують ті, що забезпечують клітині появу нових фенотипових проявів, зокрема: 1) здатність дріжджів до росту в середовищі без амінокислот (лейцину або лізину); 2) поява ферментативної активності, яку можна зареєструвати візуально за зміною кольору колоній або фотометрично (β -галактозидаза, глюкоконідаза).

Нами створено конструкти двогібридної системи для пошуку нових білків, які взаємодіють з S6K1 і 2. Серед шести «bait»-конструктів лише один відповідав вимогам двогібридного скринінгу. Скринування кДНК бібліотеки ембріона миші даним конструктом дало змогу виявити 26 клонів потенційних партнерів взаємодії S6K1, 13 з яких кодують новий білок, що зараз вивчається.

Матеріали і методи. *Плазміди і штами.* В даній роботі використано дріжджову двогібридну систему DupLEX-ATM виробництва компанії OriGene Technologies, Inc. (США).

Система містить наступні компоненти: дріжджові штами EGY48, EGY194, EGY188, EGY40, RFY206; штам *Escherichia coli* KC8; репортерні плазміди — *pSH18-34*, *pJK103*, *pRB1840*, *pJK101*; тестові/контрольні плазміди — *pRHF1*, *pSH17-4*, *pEG202-Max*, *pBait*, *pTarget*; вектори для «bait»- і «prey»-конструктів *pEG202*, *pEG202-NLS*, *pNLexA*, *pJG4-5*; праймери для ПЛР-ампліфікації та секвенування кДНК «prey»-конструктів (5'-CTGAGTG-GAGATGCCCTCC-3'; 5'-GCCGACAACCTTGATTG-

3'), праймер для секвенування «bait»-конструктів (5'-CGTCAGCAGAGCTTCAACC-3').

Створення «bait»-конструктів. Для створення «bait»-конструктів використано фрагменти генів S6K1 і 2, які кодують цитоплазматичні форми обох кіназ. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою Vent полімерази («New England Biolabs», Велика Британія) і відповідних праймерів, що містили послідовності рестрикційних сайтів *EcoRI* і *BamHI*. Ампліфіковані фрагменти кДНК цитоплазматичних форм кіназ клонували у вектор *pEG202* за названими сайтами за допомогою набору для лігування фірми «Takara» (Японія). Рекombінантні плазміди сконструйовано за стандартними методами і перевірено рестрикційним аналізом.

Трансформація і селекція рекombінантних клонів. Дріжджові штами трансформували сконструйованими плазмідами і плазмідами — компонентами системи DupLEX-ATM поліетиленгліколь-літєвим методом, як рекомендовано протоколом OriGene Technologies.

Трансформацію *E. coli* KC8 (*trp*-) плазмідною ДНК здійснено методом електропорації, як рекомендовано протоколом системи. Електрошок проводили за допомогою приладу Electroporator 2510 («Eppendorf», ФРН) при напрузі розряду 14 кВ/см протягом 4–5 мс. Селекцію *trp*⁺ клонів проводили за рекомендацією протоколу OriGene Technologies: перенесенням штрихом *trp*⁺ клонів, отриманих електропорацією, на чашку з відповідним мінімальним середовищем.

SDS-ПААГ електрофорез і імуноблотинг. Білковий препарат трансформованих дріжджових клонів отримували згідно з CLONTECH Yeast Protocols Handbook. Клітини руйнували механічно на Vortex-вібраторі інтенсивним струшуванням протягом 2 хв з рівними об'ємами буфера (50 мМ ацетат амонію, 20 мМ трис (рН 8,0), 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 0,05 об'єму «коктейлю» інгібіторів протеаз (0,1 мг/мл пепстатину А, 0,03 мМ лейпептин, 145 мМ бензамідин, 0,37 мг/мл апротиніну), скляних мікрокульок і 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Протягом усіх маніпуляцій препарати клітин і розчини періодично охолоджували на льоду. Отримані фракції препаратів білків розділяли електрофорезом у 4–15 %-му градієнтному гелі (SDS-ПААГ) і переносили напівсухим електроблотом на PVDF мембрану за допомогою приладу Trans-Blot SD фірми «BioRad» (США).

Експресію S6K-LexA химерних білків аналізували імуноблотингом з анти-LexA-кроячими поліклональними антитілами, люб'язно наданими д-ром Е. Големіс (США). Специфічне зв'язування виявляли за допомогою пероксидазних кон'югатів з

антикродячими антитілами і методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL) фірми «Amersham» (Велика Британія).

Аналіз «bait»-конструктів системи на трансактивацію і транслокацію в ядро. Здатність до самоактивації рекомбінантних білків, експресованих з «bait»-плазмід, аналізували, як рекомендовано виробником системи. Оцінку здатності «bait»-білка самостійно виконувати функцію активатора транскрипції репортерних генів здійснювали візуально за рівнем забарвленості колоній дріжджів на твердому хромогенному середовищі з X-gal та за ростовою активністю на безлейциновому середовищі. Подібним чином, за β -галактозидазною активністю, контрольованою спеціальним репортерним конструктом, оцінено здатність «bait»-білків проникати в ядро і зв'язуватися з операторними послідовностями ДНК, які є специфічними для білка LexA.

Скринування бібліотеки і виявлення позитивних клонів. Для скринування використано бібліотеку кДНК 19-денних мишачих ембріонів виробництва OriGene Technologies. Дріжджову експресуючу бібліотеку отримували великомасштабною трансформацією «bait»-вмісних клітин плазмідною ДНК бібліотеки згідно з протоколом OriGene Technologies з незначними модифікаціями, що підвищували ефективність методу. Первинний відбір позитивних дріжджових клонів за Leu^+ фенотипом проводили на агаризованому безлейциновому мінімальному середовищі з глюкозою, селективному для репортерних, «bait»- і «ргеу»-плазмід (без урацилу, гістидину і триптофану відповідно), як рекомендовано протоколом.

Кількісний аналіз залежності $LacZ^+$ та Leu^+ фенотипів клонів від індукції галактозою зроблено за оригінальним методом у 96-лункових планшетах.

Аналіз $LacZ^+$ фенотипів. Розведену суспензію клітин відібраних клонів засівали в рівних об'ємах паралельно в лунки двох планшетів з мінімальним селективним середовищем (ura-, his-, trp-) для репортерної, «bait»- та «ргеу»-плазмід. Перший як джерело вуглеводів містив 2 % глюкози, другий — 2 % галактози. Після 40 год росту клітини осаджували центрифугуванням у планшетах, позбавляли ростового середовища і суспендували їх у лунках в половині об'єму (100 мкл) буфера Z за відсутності β -меркаптоетанолу [13]. Оптичну густину (E) визначали при довжині хвилі 620 нм за допомогою плашкового денситометра «Anthos-2001». Після цього здійснювали 3 цикли заморожування—відтаювання ($-70 + +30$ °C) суспензії і додавали ще 100 мкл буфера Z з β -меркаптоетанолом у концен-

трації 4 мкл/мл та ортонітрофеніл- β -D-галактозидом (2 мг/мл). Планшети інкубували при 30 °C і після появи помітного пожовтіння середовища в лунках реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 1 M розчину Na_2CO_3 . Реакційне середовище очищували від клітинної суспензії центрифугуванням, відбирали аліквоти (200 мкл) у нові планшети і на довжині хвилі 405 нм визначали E аліквот і їхнє співвідношення в паралельних варіантах. Остаточний підрахунок ступеня галактозозалежності $LacZ^+$ фенотипів отриманих клонів здійснювали за формулою: $N_{LacZ} = (Gal_{405}/Glu_{405}) \cdot (Glu_{620}/Gal_{620})$, де Gal_{xxx} , Glu_{xxx} — показники E відповідної довжини хвилі для галактозних, глюкозних середовищ відповідно.

Аналіз Leu^+ фенотипів. Розведену суспензію клітин відібраних клонів засівали однаковими об'ємами паралельно в лунки двох планшетів з безлейциновим мінімальним середовищем (leu-, ura-, his, trp-). Як енергетичне джерело і регулятор експресії «ргеу»-білків середовище одного з планшетів містило 2 % глюкози, іншого — галактозу в тій же концентрації. Після росту протягом 40 год галактозозалежність Leu^+ фенотипу визначали як співвідношення оптичної густини клітинних культур галактозної та глюкозної паралелі. Показники E визначали, як описано вище. Ступінь галактозозалежності Leu^+ фенотипів клонів остаточно підраховували за формулою: $N_{Leu} = (LEUGal_{620}/LEUGlu_{620}) \times (Glu_{620}/Gal_{620})$, де $LEUGal_{620}$, $LEUGlu_{620}$ — показники E_{620} клітинних культур у галактозному, глюкозному середовищах з аналізу Leu^+ фенотипів; Gal_{620} , Glu_{620} — показники E_{620} клітинних культур у галактозних, глюкозних середовищах з аналізу $LacZ^+$ фенотипів.

Аналіз плазмідних ДНК. Плазмідну ДНК з відібраних позитивних ($LacZ^+Leu^+$) дріжджових клонів отримували за протоколом двогибридної системи DupLEX-ATM. Одержану плазмідну ДНК використовували для ампліфікації кДНК вставок та для трансформації *E. coli*. кДНК ампліфікували за допомогою Taq полімерази («MBI», Литва) в амоній-сульфатному буфері виробника зі стандартними концентраціями компонентів. Отримані продукти ампліфікації гідролізували рестриктазами *AluI* та *HpaII* безпосередньо в ампліфікаційній суміші. Порівняльний аналіз продуктів рестрикції кДНК проводили електрофорезом у 2 %-му агарозному гелі.

Перевірка позитивних клонів методом статевого злиття. Трансформацію штаму EGY48 (MAT α) здійснювали ізольованими «ргеу»-плазмідами первинних позитивів разом з репортерною плазмідною *pSH1834*. Статеве злиття цих клонів

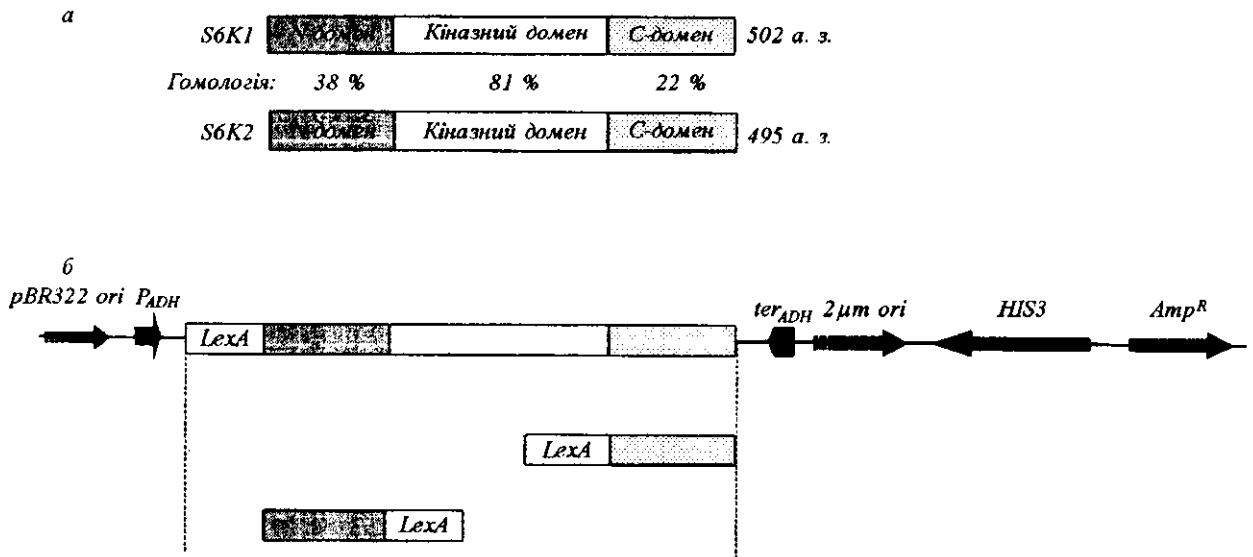


Рис. 1. Конструювання рекомбінантних плазмід для пошуку білково-білкових взаємодій з S6K кіназами: *а* — порівняння доменної структури кіназ S6K1 і S6K2 (у відсотках вказано гомологію пептидних послідовностей доменів кіназ); *б* — схема отриманих рекомбінантних «bait»-плазмід. Позначено структурні елементи «bait»-вектора. *P_{ADH}*, *ter_{ADH}*, *2µm ori* та *HIS3* — генетичні елементи *Saccharomyces cerevisiae*: промотор і термінатор гена алкоголдегідрогенази, реплікон 2µm елісоми, ген *his3* відповідно. *Amp^R*, *pBR322 ori* — ген β-лактамази та реплікон бактеріальної плазмиди *pBR322*; а. з. — амінокислотні залишки

проводили за методом, адаптованим до використання 96-лункових планшетів з клонами штаму RFY206 (MAT α), які містили ряд варіантів «bait»-векторів. Отримані клони вирощували на селективних середовищах (для клонів MAT α — *trp*-, *iga*-, для клонів MAT α — *his*-) в лунках планшетів до оптичної густини $E_{600} \sim 1$. Після цього 25 мкл суспензії клітин змішували в збагаченому середовищі YPD в усіх комбінаціях «MAT α × MAT α » і інкубували протягом 36 год при 30 °С. Далі суспензію клітин відмивали водою і використовували для кількісного аналізу *LacZ'* та *Leu'* фенотипів злитих клонів, як описано вище, а також на чашках з агаровим середовищем, як рекомендовано протоколом OriGene Technologies.

Результати і обговорення. Однією з найважливіших передумов успіху пошуку білково-білкових взаємодій за допомогою дріжджової двогібридної систем є створення «bait»-конструктів, які відповідали б вимогам обраної системи. Саме тому необхідно було сконструювати серію «bait»-рекомбінантів з різними фрагментами гена досліджуваного білка.

S6K1 та S6K2 мають подібну модульну структуру і складаються з трьох функціональних ділянок: N-кінцевого регуляторного, центрального каталітичного та С-кінцевого аутоінгібіторного до-

менів. Дослідження мутантів S6K1 з N- та С-кінцевими делеціями показали, що ці домени є важливими для функціонування і задіяні у білково-білкових взаємодіях [9]. З огляду на такий функціональний розподіл було вирішено створити «bait»-конструкти обох кіназ, що містять кДНК N-кінцевого домену, С-кінцевого домену та повну кодуєчу послідовність (рис. 1).

Отримано шість типів рекомбінантних плазмід:

- *pNLexA::N-домен S6K1 (pS6K1-N)*;
- *pEG202::C-домен S6K1 (pS6K1-C)*;
- *pEG202::повнорозмірний S6K1 (pS6K1)*;
- *pNLexA::N-домен S6K2 (pS6K2-N)*;
- *pEG202::C-домен S6K2 (pS6K2-C)*;
- *pEG202::повнорозмірний S6K2 (pS6K2)*.

Експресію химерних білків у клонах дріжджів, трансформованих отриманими конструктами, перевіряли ПААГ-електрофорезом у денатуруючих умовах і імуноблотингом з анти-Lex антитілами. Як показано на рис. 2, тотальні препарати білків більшості з відібраних клонів дріжджів містили химерні білки з очікуваною молекулярною масою. Серед п'яти клонів, що містять повнорозмірні S6K1 та 2, та десяти — з окремими доменами цих кіназ виявлено помітну кількість (3 з 5) конструктів, які не експресують білок очікуваного розміру.

Перевірка на здатність до транслокації в ядро

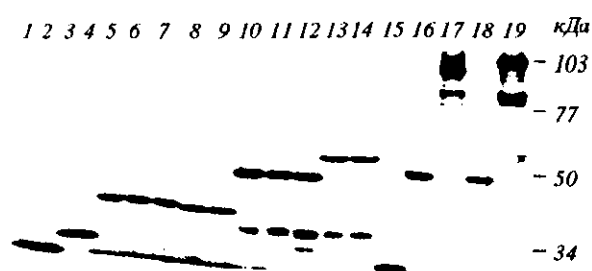


Рис. 2. Автограф імуноблотингу антитілами проти LexA тотальних препаратів дріжджових білків, виділених з клонів, трансформованих «bait»-конструкторами S6K кіназ: 1, 2 — штам EGY48 без плазмід; 3, 4 — *pEG202*; 5–7 — *pS6K2-N*; 8, 9 — *pS6K1-N*; 10–12 — *pS6K2*; 13, 14 — *pS6K1-C*; 15–17 — *pS6K2*; 18, 19 — *pS6K1*; стрілками позначено положення маркерів відповідної молекулярної маси

і здатність зв'язуватися з операторними послідовностями ДНК, специфічними для білка LexA, була наступним етапом аналізу «bait»-конструктів. Дослідження показали, що химерні білки, які містять повнорозмірні або N-кінцеві домени обох кіназ, проникають у ядро і зв'язуються з операторними послідовностями ДНК. Для C-кінцевих конструктів S6K1 і 2 помітної взаємодії з операторними послідовностями у ядрі виявлено не було.

Отримані «bait»-конструкти перевірено також на здатність самостійно виступати в ролі активаторів транскрипції репортерних генів *lacZ* та *leu2*. Попередніми дослідженнями [14] показано, що здатність до трансактивації переважно залежить від природи досліджуваного білка та чутливості штамів і репортерних плазмід. Аналіз засвідчив, що з усіх шести конструкцій лише повнорозмірна форма S6K1 має допустимий рівень трансактивації гена *lacZ*.

Виходячи з результатів вивчення експресії, транслокації у ядро і здатності до самоактивації отриманих «bait»-конструктів, вирішено провести скринінг кДНК бібліотеки мишачих ембріонів «bait»-плазмідною *pS6K1*. Для цього використано дріжджові штами з мінімально (EGY188), середньо (EGY194) та максимально (EGY48) чутливим до активації репортерним геном *leu2* і максимально чутливу репортерну плазмиду з вісьмома операторами LexA перед геном *lacZ* (*pSH18-34*, табл. 1). Великомасштабну трансформацію всіх трьох штамів виконано згідно з протоколом виробника, і отримано суспензію клітин дріжджових клонів з високим рівнем представництва ($4 \cdot 10^6$ клонів при потужності плазмідної бібліотеки $2 \cdot 10^6$).

Трансформовані дріжджі ($2 \cdot 10^7$ клітин кожної трансформації) було розсіяно на *leu*-, *uga*-, *his*-, *trp*-середовищі з галактозою, присутність якої активує продукцію кодованих кДНК «preu»-білків. Після інкубації впродовж 48 год відібрано по 192 колонії з підвищеною швидкістю росту на чашках з максимально і середньо чутливим штамом EGY188, не виявлено жодної колонії. Для всіх проаналізованих штамів спостерігався неспецифічний ріст основної маси клітин, що ускладнювало відбір *Leu*⁺ клонів. Повторний відбір клонів за швидкістю росту після 60 год інкубації був неможливий з цієї ж причини.

Згідно з протоколом, подальший аналіз відібраних клонів рекомендовано проводити на якісному рівні, шляхом порівняння галактозозалежності в умовах: 1) росту без лейцину; 2) β -галактозидазної активності клітин на чашках з X-gal — хромогенним субстратом. З огляду на значний рівень аутоактивації для подальшої перевірки відібраних клонів розроблено і використано методи кількісного аналізу залежності *LacZ*⁺ та *Leu*⁺ фенотипів клонів від індукції галактозою (див. «Матеріали і методи»). Аналіз усіх первинно відібраних 382 клонів підтвердив галактозозалежність *LacZ*⁺ та *Leu*⁺ фенотипів для 16 клонів штаму EGY48 та 12 клонів штаму EGY194. Узагальнені дані цих аналізів наведено в табл. 2.

Відомо, що ефективність засвоєння дріжджами різних типів вуглеводів, зокрема, глюкози і галактози суттєво різна. Галактоза є метаболічно «важким» вуглеводом [15] і, за нашими вимірами, на галактозних середовищах відносно глюкозних ріст різних штамів уповільнений в 1,5–3 рази. Особливо велика різниця спостерігається для плазмідовмісних штамів на мінімальних селективних середовищах. Тому введення індивідуального коефіцієнта поправки на тип цукру у формулі аналізу *Leu*⁺ фенотипів (Glu_{620}/Gal_{620} , див. «Матеріали і методи») є цілком логічним і дозволяє виявляти клони помірної індукції галактозою на фоні певного рівня трансактивації.

Першим етапом дослідження відібраних *Leu*⁺ та *LacZ*⁺ клонів була ампліфікація кДНК-фрагментів з наступним рестрикційним аналізом. Проведений аналіз для 16 клонів, відібраних у штамі EGY48 (рис. 3), показав, що лише клони 3, 9 та 10 мають рестрикційні картини, відмінні від інших. Таким чином, 13 з 16 клонів (а саме: 1, 2, 4–8, 11–16) містять ідентичну кДНК. Такий результат є суттєвим підтвердженням специфічності виявлених взаємодій.

Здатність дріжджового гена *trp1* до експресії в

Таблиця 1
Відносний рівень індукції галактозою $LacZ^+$ та Leu^+ фенотипів статевих злитих клонів

«Bait»-плазмід	Клони «preu»-плазмід											Контроль (pTarget)
	Штам EGY48			Штам EGY194								
	2	9	10	6	8	9	11	12	13	14	15	
$LacZ^+$												
<i>pS6K1</i>	6,07	1,08	1,10	1,01	1,31	1,16	1,27	1,10	1,22	1,54	1,12	1,46
<i>pS6K2</i>	1,44	0,80	0,92	0,84	0,81	0,85	0,79	0,97	0,85	1,00	0,91	0,88
<i>pS6K1-N</i>	1,34	1,49	1,00	0,71	0,73	1,33	0,71	0,61	0,69	0,77	1,11	0,90
<i>pS6K2-N</i>	1,26	1,25	1,25	0,65	0,78	0,66	0,50	0,65	0,59	1,02	0,77	0,78
<i>pS6K1-C</i>	1,05	0,92	1,03	0,65	0,75	0,80	0,72	0,80	0,83	0,80	0,99	0,87
<i>pS6K2-C</i>	1,23	0,98	0,73	0,49	0,56	0,74	0,62	0,76	0,68	0,80	0,86	0,89
<i>pBait</i>	1,08	1,03	0,97	0,77	0,89	0,91	0,94	0,96	1,00	1,00	0,99	12,46
<i>PEG202-Max</i>	1,42	1,49	1,17	0,86	0,92	0,97	0,96	1,08	1,08	1,01	1,11	1,32
Leu^+												
<i>pS6K1</i>	4,47	1,10	1,05	1,07	1,05	0,88	1,05	1,02	1,06	1,04	1,09	1,15
<i>pS6K2</i>	1,10	0,97	0,85	0,97	0,97	0,95	0,99	1,00	1,00	0,97	0,97	0,96
<i>pS6K1-N</i>	1,05	1,01	0,84	1,05	1,07	1,07	1,03	1,05	1,05	1,04	1,05	1,01
<i>pS6K2-N</i>	1,04	1,04	0,89	1,01	1,01	1,01	1,02	1,01	1,02	1,05	1,08	0,99
<i>pS6K1-C</i>	0,98	0,84	0,96	1,01	1,03	1,00	1,02	1,04	1,05	1,04	1,04	1,02
<i>pS6K2-C</i>	0,90	0,97	0,91	1,00	1,01	1,00	1,03	1,05	1,05	1,06	1,06	1,04
<i>pBait</i>	1,63	1,89	1,34	1,15	1,40	1,12	1,13	1,13	1,14	1,33	1,17	8,00
<i>PEG202-Max</i>	1,10	1,02	1,01	1,19	1,15	1,00	0,93	0,99	0,95	1,22	0,87	0,97

клітинах *E. coli* надає можливість селекції «preu»-плазмід за комплементациєю цього фенотипу. «Preu»-плазмід з усіх 28 первинних позитивних клонів було ізольовано за допомогою електропорації тотальною дріжджовою ДНК штаму *E. coli* KC8 (trp-) і селекції клонів з комплементованим *Trp*-фенотипом.

Головним і найпоширенішим методом підтвердження очікуваних білково-білкових взаємодій для первинних позитивних клонів є метод статевих злиття, який базується на явищі злиття гаплоїдних різностатевих (MATa та MATα) клітин дріжджів у диплоїдну з успадкування сумарного генотипу. В нашому випадку було проведено злиття клонів, які містили плазмід первинних позитивів і репортерну плазмід *pSH1834*, з клонами, що містили ряд варіантів «bait»-векторів, а саме: *pS6K1*, *pS6K2*, *pS6K1-N*, *pS6K2-N*, *pS6K1-C*, *pS6K2-C*, *pBait*,

PEG202-Max. Таким шляхом здійснено злиття клонів 2, 3, 9, 10, відібраних у штамі EGY48, та всіх 12 клонів, відібраних у штамі EGY194. В табл. 1 наведено результати аналізу розробленим нами кількісним методом галактозної залежності $LacZ^+$ та Leu^+ фенотипів частини отриманих диплоїдних клонів. Лише для клона 2 було підтверджено галактозозалежність його $LacZ^+$, Leu^+ фенотипу. «Preu»-білок, кодований плазмідом клона 2, виявив взаємодію лише з продуктом, кодованим *pS6K1* (але не *S6K2*), або з N-кінцевими та C-кінцевими фрагментами обох кіназ. Він також не взаємодіє з неспецифічними «bait»-білками плазмід *pBait* та *PEG202-Max*. Втім, у випадку *S6K2*, *pS6K1-N*, *pS6K2-N*, *pS6K1-C* та *pS6K2-C* взаємодія, можливо, маскувалася високим рівнем трансактивації, що є характерною для цих «bait»-плазмід. Дані якісного аналізу на агаровому середовищі $LacZ^+$, Leu^+

Таблиця 2
Відносний рівень індукції галактозою $LacZ^+$ та Leu^+
фенотипів відібраних клонів

Номер клона	N_{Leu}	N_{LacZ}
<i>Штам EGY48</i>		
1	5,98	12,93
2	5,72	6,25
3	3,13	2,56
4	5,10	7,96
5	5,43	8,61
6	4,43	15,03
7	4,93	7,27
8	5,77	12,27
9	2,10	6,56
10	4,37	3,53
11	4,23	5,50
12	4,70	10,54
13	4,56	11,20
14	3,55	7,04
15	1,98	2,13
16	3,37	6,44
<i>Штам EGY194</i>		
1	1,45	1,24
3	1,54	1,95
6	1,79	1,60
8	1,48	1,38
13	1,58	1,42
14	1,64	1,20
17	1,21	1,67
21	1,41	1,24
25	1,22	1,99
26	3,42	3,95
27	1,50	1,59
60	1,57	1,23

фенотипу клона 2 у поєднанні з «bait»-плазмідями $pS6K1$, $pS6K2$, $pBait$, $PEG202-Max$ збіглися з результатами кількісного методу. Високий рівень аутоактивації не дозволив зробити висновків стосовно $LacZ^+$ та Leu^+ фенотипів злиття клонів, що містять «prey»-плазмідю клона 2 і «bait»-плазмідю $pS6K1-N$, $pS6K2-N$, $pS6K1-C$ чи $pS6K2-C$.

M 1 2 5 6 7 11 12 14 4 3 8 9 10 13 16 15 M

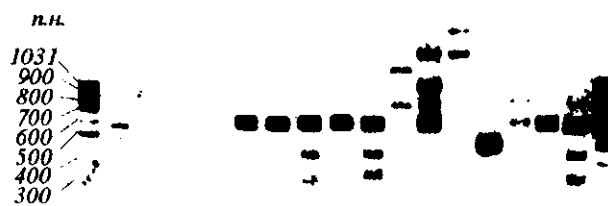


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції кДНК, ампліфікованої з 16 позитивних Lac^+ і Leu^+ клонів: M — фрагменти маркерних ДНК; 1–16 — ПЛР-продукти клонів після рестрикції *HpaI*

Отриманий результат є свідченням ефективності застосованого кількісного методу аналізу первинних позитивів у випадку «bait»-конструктив з помітним рівнем трансактивації.

За результатами визначення електрофоретичної рухливості ПЛР-ампліфікованих фрагментів кДНК «prey»-плазмід, розмір кДНК клона 2 складає близько 4 тис. п. н. Частковий аналіз первинної послідовності 5'- та 3'-кінців клону 2 показав, що кДНК кодує новий білок. На даний час проводиться секвенування клону та вивчається його експресія в різних системах. Нативність взаємодії, виявленої в дріжджовій двогибридній системі кінази з білком, кодованим клоном 2, необхідно підтвердити в клітинах ссавців. Для цього кДНК клона 2 буде експресовано в клітинній лінії HEK293 разом з $S6K1$ та 2.

Роботу виконано за підтримки гранту від Велком Траст (Велика Британія) 055427/Z/98/ZMER-/MW.

O. M. Zhyvoloup, I. O. Nemazanyy, N. V. Pobigailo,
G. G. Panasyuk, S. S. Palchevskyy, O. P. Kuharenko,
L. O. Savinska, G. V. Ovcharenko, M. I. Vudmaska,
I. T. Gout, G. Kh. Matsuka, V. V. Filonenko

Use of yeast two-hybrid system in search of $S6K1$ and $S6K2$ binding partners

Summary

The kinase of the ribosomal protein $S6$ ($S6K$) is involved in the signalling pathways which regulate the cell proliferation, differentiation and growth. The family of $S6K$ consists of two forms ($S6K1$ and 2), which have cytoplasmic and nuclear splicing variants. The activity of $S6K$ is regulated by phosphorylation/dephosphorylation events and specific protein-protein interactions. We have employed yeast two-hybrid system in search of novel $S6K$ binding partners. Among six created «bait» constructs, only the full length $S6K1$ meets the requirements of the yeast two-hybrid screening. The large-scale screening of mouse embryo cDNA library allowed us to identify 26 positive clones and 13 of them were confirmed in

mating analysis. The restriction and sequence analysis of these clones showed that all of them contain cDNAs of approximately 4000 bp with the same restriction pattern and sequence at 5' and 3' ends. Comparison of the sequences obtained with the genomic and protein databases has shown that identified cDNA codes a fragment of novel protein. The primary structure of this protein and specificity of its interaction with S6K are currently under investigation.

А. М. Живолуп, И. А. Немазаный, Н. В. Побизайло, Г. Г. Панасюк, С. С. Пальчевский, А. П. Кухаренко, Л. А. Савинская, Г. В. Овчаренко, М. И. Вудмаска, И. Т. Гут, Г. Х. Мацука, В. В. Филоненко

Использование дрожжевой двугибридной системы для поиска S6K1 и S6K2 связывающих партнеров

Резюме

Киназа рибосомного белка S6 (S6K) причастна к сигнальным механизмам регуляции пролиферации, дифференциации и клеточного роста. На сегодня известны две ее формы (S6K1 и S6K2), имеющие цитоплазматический и ядерный варианты сплайсинга. Известно лишь несколько физиологических субстратов S6K и партнеров ее белково-белкового взаимодействия. Для поиска новых партнеров взаимодействия с S6K1 и 2 нами использована дрожжевая двугибридная система. С помощью анализа шести созданных «bait»-конструктов выявлено, что только полноразмерная форма S6K1 отвечала требованиям двугибридного скрининга. Крупномасштабный скрининг кДНКовой библиотеки эмбриона мыши позволил нам выявить 26 позитивных клонов, 13 из которых подтверждены методом полового слияния. Рестрикционные исследования и анализ последовательностей данных клонов показали, что все они содержат кДНК размером около 4000 п. н. с одинаковой картиной рестрикции и последовательностями на 5'- и 3'-концах. Сравнение полученных последовательностей с геномными и белковыми банками данных свидетельствует о том, что кДНК полученных клонов кодирует фрагмент нового белка. Первичная структура данного белка и особенности его взаимодействия с S6K находятся в процессе изучения.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Phizichky E., Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis // *Microbiol. Revs.*—1995.—59, N 1.—P. 94—123.
2. Gyuris J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2 // *Cell.*—1993.—75, N 4.—P. 791—803.
3. Chien C. T., Bartel P. L., Sternglanz R., Fields S. The

- two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 9578—9582.
4. Vojtek A. B., Hollenberg S. M., Cooper J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf // *Cell.*—1993.—74, N 1.—P. 205—214.
5. Wang T., Donahoe P. K., Zervos A. S. Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12 // *Science.*—1994.—265, N 5172.—P. 674—676.
6. Shin H. M., Goldman P. S., DeMaggio A. J., Hollenberg S. M., Goodman R. H., Hoekstra M. F. A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions: identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 13896—13901.
7. Dufner A., Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation // *Exp. Cell Res.*—1999.—253, N 1.—P. 100—109.
8. Lane H. A., Fernandez A., Lamb N. J., Thomas G. p70s6k function essential for G1 progression // *Nature.*—1993.—363, N 6425.—P. 170—172.
9. Gout I., Minami T., Hara K., Tsujishita Y., Filonenko V., Waterfield M. D., Yonezawa K. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 kinase i containing a proline-rich region // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 46.—P. 30061—30064.
10. Chou M. M., Blenis J. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1 // *Cell.*—1996.—85, N 4.—P. 573—583.
11. Peterson R. T., Desai B. N., Hardwick J. S., Schreiber S. L. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96, N 8.—P. 4438—4442.
12. Akimoto K., Nakaya M., Yamanaka T., Tanaka J., Matsuda S., Weng Q. P., Avruch J., Ohno S. Atypical protein kinase Clambda binds and regulates p70 S6 kinase // *Biochem. J.*—1998.—335, pt 2.—P. 417—424.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
14. Estojak J., Brent R., Golemis E. Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements // *Mol. Cell Biol.*—1995.—15, N 10.—P. 5820—5829.
15. Берри Д. Биология дрожжей.—М.: Мир, 1985.—С. 25—27.

УДК 577.113.5
Надійшла до редакції 22.10.01