

Ідентифікація ендогенних ізоформ кінази рибосомного білка S6 — S6K2

Г. Г. Панасюк¹, І. О. Немазаний¹, І. Т. Гут^{1, 2}, В. В. Філоненко¹

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

² Університетський коледж Лондона, відділ біохімії і молекулярної біології
Лондон, Велика Британія

До родини кіназ рибосомного білка S6 належать два представники — S6K1 і S6K2. Перший функціонує в клітині у вигляді двох ізоформ — цитоплазматичної (S6K1/II, 70 кДа) і ядерної (S6K1/I, 85 кДа), яка містить сигнал ядерної локалізації в межах N-кінцевого подовження. Вважається, що ізоформи S6K1 виникають як результат альтернативного сплайсингу мРНК або ж використання альтернативних стартів трансляції мРНК. Відомо, що S6K1/II залучена до регуляції біогенезу рибосом через контроль трансляції мРНК рибосомних білків. Функцію S6K1/II на сьогодні не досліджено. Високий рівень структурної гомології S6K1 і S6K2 і присутність двох альтернативних стартів трансляції мРНК свідчать про те, що S6K2 (як і S6K1) може існувати у вигляді двох ізоформ. Вестерн-блот-аналізом лізатів клітин з використанням поліклональних антитіл проти S6K2 не виявлено S6K2/I ізоформи очікуваної молекулярної маси (~70 кДа). Натомість за допомогою анти-S6K2 антитіл детектовано як S6K2/II, так і білковий продукт розміром 105 кДа.

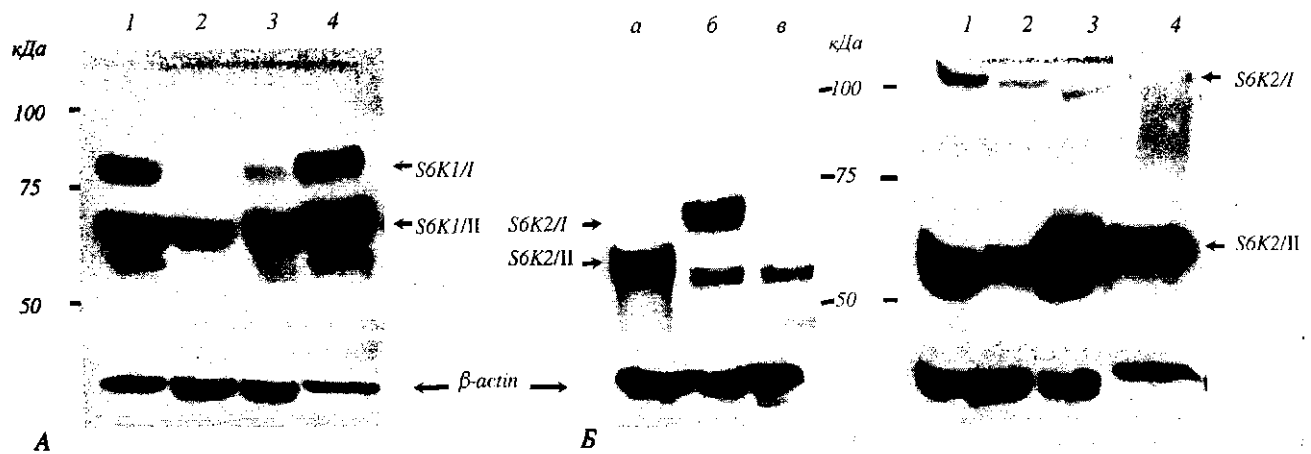
Ключові слова: S6K1, S6K2, рибосомний білок S6.

Вступ. Кінази S6 білка малої субчастинки рибосом (S6K) залучені до сигнальних шляхів, причетних до регуляції клітинного росту і проліферації [1—3]. На сьогодні ідентифіковано дві форми S6K — S6K1 і S6K2 [4]. Обидві вони активуються у відповідь на мітогенні стимули і поживні речовини через PI3K та mTOR залежні сигнальні шляхи [4]. Найдослідженішим фізіологічним субстратом S6K є рибосомний білок S6, однак на сьогодні виявлено вже цілу низку додаткових субстратів, серед яких фактор ініціації трансляції eIF4B, проапоптичний білок Bad, UBF — фактор транскрипції генів рибосомних РНК, білки SCAR і IRS [5], функції деяких з них пов'язані з ядром.

Незважаючи на високий рівень структурної гомології, існують і суттєві відмінності в кінетиці

активації кіназ мітогенами, чутливості до інгібітора mTOR рапаміцину та субклітинній локалізації [6, 7]. S6K1 функціонує в клітині у вигляді двох ізоформ — цитоплазматичної (S6K1/II, молекулярна маса (м. м.) 70 кДа) і ядерної (S6K1/I, 85 кДа). Остання містить у межах N-кінцевого подовження сигнал ядерної локалізації (NLS). Вважається, що ізоформи S6K1 виникають в результаті альтернативного сплайсингу мРНК або використання альтернативних стартів трансляції. Функція S6K1/I ще детально не досліджена, однак її пов'язують з фосфорилюванням ядерного білка CREM [8].

Аналіз кДНК S6K2 свідчить також про можливість існування двох ізоформ, проте (на відміну від S6K1) NLS виявлено як в межах N-кінцевого подовження, так і в C-кінцевій ділянці S6K2. Відповідно було зроблено припущення про ядерну локалізацію обох ізоформ S6K2 [9]. Вивчення субклітинної локалізації S6K2/I і S6K2/II підтвердило



Вестерн-блот-аналіз лізатів клітин HEK293 (1), NIH3T3 (2), C-6 (3), MCF7 (4) та клітин HEK293, трансфікованих *pcDNA3.1-S6K2/II* (а), *pcDNA 3.1-S6K2/I* (б) та *pcDNA3.1* (в), з використанням анти-S6K2 (А) або анти-S6K1 (Б)

винятково ядерну локалізацію S6K2/I та переважно ядерну — S6K2/II. Однак дослідження при цьому проводили з використанням рекомбінантних форм S6K2, експресованих в клітинах ссавців. Мета цієї роботи полягала у перевірці існування ендогенних ізоформ S6K2.

Матеріали і методи. кДНК короткої (S6K2/II-EE) та подовженої (S6K2/I-EE) форм S6K2 (де EE — поліглутамінова мітка) клонували у вектор для експресії у клітинах ссавців (*pcDNA 3.1*) за стандартною методикою з використанням смислових — 5'-GAATTCGGATCCGCCACCATGGAGTTCATGCCGATGGAGGCC, 5'-ATTACCGGTGTCGACCCACCATGGCAGGAGGCCGACGGGCCCGC та антисмислового — 5'-CGGGAATTCTCAGCGC-CCTGGACGCCACG-3' праймерів. Вестерн-блот-аналіз лізатів клітин з розрахунку 35 мкг на доріжку здійснювали, як описано раніше [10] з використанням специфічних поліклональних антитіл проти S6K1 та S6K2. Трансфекцію клітин HEK 293 відповідними кДНК конструкціями проводили за методом [4].

Результати і обговорення. S6K1 ідентифіковано наприкінці 80-х років минулого століття [14], у той час як клонування кДНК S6K2 було здійснено лише через 10 років [4]. Відповідно на сьогодні S6K1 є більш дослідженою. Декількома групами підтверджено існування ендогенних S6K1/I (85 кДа) та S6K1/II (70 кДа) ізоформ [3, 9]. Незважаючи на присутність лише 23 додаткових амінокислотних залишків, за електрофоретичною рухливістю ядерна форма (S6K1/I) відрізнялася на 15 кДа від цитоплазматичної. Дослідження ж S6K2 переважно були пов'язані з укороченою

формою, при цьому використовувалися рекомбінантні форми кінази, експресовані у клітинах ссавців [9, 10]. Отримання специфічних поліклональних антитіл проти S6K1 і S6K2 [11, 12] дозволило проаналізувати ендогенні форми S6K2. Для Вестерн-блот-аналізу застосовували лізати культивованих клітин людини — HEK293, MCF-7, щура — C-6 і миші — NIH3T3. Як свідчать результати, представлені на рисунку, А, анти-S6K1 антитіла розпізнають в лізатах дві форми відповідного розміру — 85 та 70 кДа, що за рухливістю збігаються з відповідними рекомбінантними формами, експресованими в клітинах HEK293 (даних не наведено). За аналогією з S6K1, ми сподівалися виявити теж дві форми S6K2 — низькомолекулярну (~60 кДа) та високомолекулярну (~70 кДа). Дійсно, за допомогою анти-S6K2 антитіл у лізатах клітин детектовано 60 кДа форму S6K2, однак навіть при максимальному білковому навантаженні ПААГ Вестерн-блот-аналізом не виявлено білка з м. м. ~70 кДа (рисунок, Б). Натомість, антитілами детектовано високомолекулярну форму S6K2 з м. м. ~105 кДа. Оскільки у S6K1/I визначено аномальну електрофоретичну рухливість, було зроблено припущення, що це може мати місце і в разі S6K2/I. Для перевірки цього клітини HEK293 трансфікували кДНК конструкціями для подовженої (S6K2/I-EE) або вкороченої (S6K2/II-EE) форми. За цих умов Вестерн-блот-аналізом лізатів відповідних клітин HEK293 з використанням анти-EE антитіл виявлено присутність у клітинах білкових продуктів з очікуваною м. м., близькою як 60 кДа (для S6K2/II-EE), так і 70 кДа (для S6K2/I-EE) (відповідно а і б на рисунку, Б)

Таким чином, у перевірених клітинах нами не знайдено ендогенної форми S6K2/I. Імовірність того, що рівень присутності її у клітині є значно нижчим порівняно з S6K1/I і не детектується антитілами, видається досить низькою, хоча нею також не можна знехтувати, оскільки вміст S6K1/I у клітині теж відрізняється залежно від клітинних ліній (рисунок).

Беручи до уваги високий вміст S6K2/II в ядрі [9] (на відміну від S6K1/II) цілком припустимою є відсутність експресії S6K2/I, оскільки її функції, можливо, здатна виконувати S6K2/II.

Блок з м. м. 105 кДа може бути додатковою або ж модифікованою формою S6K, однак для підтвердження цього необхідні подальші дослідження.

G. G. Panasyuk, I. O. Nemazanyu, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Identification of endogenous isoform of ribosomal protein S6 kinase — S6K2

Summary

S6K1 and S6K2 belong to the family of ribosomal protein S6 kinases. S6K1 has two isoforms — cytoplasmic (S6K1/II, 70 kDa) and nuclear (S6K1/I, 85 kDa) possessing nuclear localization signal within the N-terminal extension region. It is believed that S6K1 isoforms are generated from a single gene by alternative mRNA splicing or the use of alternative translational start sites. S6K1/II is implicated in ribosomal biogenesis via regulation of ribosomal proteins mRNAs translation. The function of S6K1/I is not clear. The high level of structural homology between S6K1 and S6K2 suggest that S6K2 has two isoforms as well, but Western blot analysis of cell lysates and tissue homogenates does not reveal S6K2/I with expected molecular mass (~70 kDa). However, 105 kDa protein has been detected by anti-S6K2 polyclonal antibodies.

Key words: S6K1, S6K2, ribosomal protein S6.

A. G. Панасюк, И. О. Немазаный, И. Т. Гут, В. В. Филоненко

Идентификация эндогенных изоформ киназы рибосомного белка S6 — S6K2

Резюме

Семейство киназ рибосомного белка S6 включает двух представителей — S6K1 и S6K2. Первый функционирует в клетке в виде двух изоформ — цитоплазматической (S6K1/II, 70 кДа) и ядерной (S6K1/I, 85 кДа), содержащей сигнал ядерной локализации в рамках N-концевого удлинения. Считается, что S6K1 изоформы возникают в результате альтернативного сплайсинга мРНК или же использования альтернативных стартовых трансляции. S6K1/II участвует в регуляции биогенеза рибосом, контролируя трансляцию мРНК рибосомных белков. Функции S6K1/I на сегодня не изучены. Высокий уровень структурной гомологии S6K1 и S6K2 свидетельствует о том, что S6K2 (аналогично S6K1) существует в виде двух изоформ. Вестерн-блот-анализом лизатов клеток и гомогенатов тканей с использованием поликлональных антител против S6K2 не выявлена S6K2/I форма с ожидаемой молеку-

лярной массой (~70 кДа). Однако с помощью анти-S6K антител детектирован белковый продукт размером 105 кДа.
Ключевые слова: S6K1, S6K2, рибосомный белок S6.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Avruch J., Belham C., Weng Q., Hara K., Yonezawa K. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity // *Progr. Mol. Subcell. Biol.*—2001.—26.—P. 115—154.
2. Dufner A., Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation // *Exp. Cell Res.*—1999.—253.—P. 100—109.
3. Price D. J., Nemenoff R. A., Avruch, J. Purification of a hepatic S6 kinase from cycloheximide-treated rats // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 13825—13833.
4. 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 S6 kinase I containing a proline-rich region // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 30061—30064.
5. Richardson C. J., Schalm S. S., Blenis J. PI3-kinase and TOR:PICTORing cell growth // *Sem. Cell. Develop. Biol.*—2004.—15.—P. 147—159.
6. Вальювка Т. Й., Філоненко В. В., Пальчевський С. С., Великий М. М., Дробот Л. Б., Вортенфілд М., Мацука Г. Х., Гут І. Т. Функціональні та регуляторні особливості кінрази рибосомного білка S6 типу β // *Біополімери і клітина.*—1999.—15, № 5.—С. 415—421.
7. Valovka T., Verdier F., Cramer R., Zhyvoloup A., Fenton T., Rebholz H., Wang M.-L., Gzhegotsky M., Lutsyk A., Matsuka G., Filonenko V., Wang L., Proud C. G., Parker P. J., Gout I. T. Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase β II and regulates its subcellular localization // *Mol. Cell Biol.*—2003.—23.—P. 852—863.
8. de Groot R. P., Ballou L. M., Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression // *Cell.*—1994.—79.—P. 81—91.
9. Koh H., Jee K., Lee B., Kim J., Kim D., Yun Y. H., Kim J. W., Choi H. S., Chung J. Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt // *Oncogene.*—1999.—18.—P. 5115—5119.
10. Minami T., Hara K., Oshiro N., Ueoku S., Yoshino K., Tokunaga C., Shirai Y., Saito N., Gout I., Yonezawa K. Distinct regulatory mechanism for p70 S6 kinase beta from that for p70 S6 kinase alpha // *Genes Cells.*—2001.—6.—P. 1003—1115.
11. Савінська Л. О., Киямова П. Г., Погребний П. В., Овчаренко Г. В., Гут І. Т., Філоненко В. В. Порівняльна характеристика експресії α та β ізоформ S6 кінрази в тканинах ссавців // *Біополімери і клітина.*—2001.—17, № 5.—С. 374—379.
12. Pogrebnoy P. V., Kukharensko A. P., Tykhonkova I. A., Pal'chevskiy S. S., Savinskaya L. A., Pogrebnaaya A. P., Valevka T. I., Markeeva N. V., Soldatkina M. A., Matsuka G. Kh., Gout I. T., Filonenko V. V. Generation and characterization of monoclonal antibodies to p70S6 kinase α // *Exp. Oncol.*—1999.—21.—P. 232—238.

УДК 577.112.7

Надійшла до редакції 06.12.04