

Регуляція субклітинної локалізації кінازی рибосомного білка S6 казеїнкіназою 2

Г. Г. Панасюк, І. О. Немазаний, О. М. Живолуп, В. В. Філоненко, І. Т. Гут

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

E. mail: panasyuk_g@imb.org.ua

*Казеїнкіназа 2 (СК2) є фізіологічним зв'язувальним партнером кінازی S6 рибосомного білка (S6K1), ідентифікованим завдяки використанню дріжджової двогибридної системи. Специфічність взаємодії між регуляторною β -субодиницею СК2 і S6K1 підтверджено *in vitro*, крім того, показано, що S6K1 може бути фосфорильована СК2 по залишку Ser17. Представлені дані свідчать, що фосфорильовання Ser17 є важливим етапом у регуляції експорту S6K1 з ядра. Методом імунопреципітації S6K1 і СК2 з ядерної і цитоплазматичної фракції клітин лінії NIH3T3 встановлено існування комплексу S6K1/СК2 в ядрі, але не в цитоплазмі. З використанням флуоресцентної мікроскопії продемонстровано, що мутант S6K1 (S17E) не накопичується в ядрі через активований експорт кінازی з ядра.*

Ключові слова: S6K1, S6K2, СК2 β , ядерний експорт.

Вступ. Родина Ser/Thr протеїнкіназ S6 білка 40S субчастинки рибосом (S6K1 і S6K2) є однією з регуляторних ланок PI3K/mTOR-залежного сигнального шляху — одного з провідних у регуляції основних клітинних функцій, а саме: росту клітин, проліферації, диференціації та апоптозу. Регуляція активності S6K відбувається за рахунок фосфорильовання/дефосфорильовання множинних сайтів, індукованого позаклітинними мітогенними стимулами [1]. Нещодавно нами з використанням дріжджової двогибридної системи ідентифіковано новий S6K1-зв'язувальний білок — регуляторну β -субодиницю казеїнкінази 2 (СК2 β). Утворення комплексу між СК2 і S6K1 підтверджено *in vitro*. Також показано, що СК2 може фосфорильовати Ser17 у складі S6K1 [2]. Подальшу роботу було спрямовано на підтвердження існування комплексу *in vivo* та на визначення фізіологічного значення фосфорильовання S6K1 по Ser17.

Матеріали і методи. Лінію клітин фібробластів миші (NIH3T3) отримано з Американської колекції культур клітин (ATCC). Антитіла проти СК2 альфа придбано у «SantaCruz» (США); проти ламіну — у «Cell Signalling» (США); проти тубуліну — у «Sigma» (США). Продуктування антитіл проти S6K1 описано раніше [3]. Екстракти ядерної і цитоплазматичної фракції одержували з клітин NIH3T3, як у роботі [4]. Імуноблот та імунопреципітацію здійснювали за раніше відомою методикою [5]. Для імунофлуоресцентного аналізу клітини лінії NIH3T3 трансфікували відповідними плазмідами, що кодували S6K1, S6K S17E в рамці з EE-міткою [6], з використанням реагенту PolyFect («QIAGEN», Велика Британія), як рекомендовано виробником. Через 24 год після трансфекції клітини культивували в середовищі без сироватки протягом 36 год і далі стимулювали додаванням 10 %-ї сироватки. Лептоміцин Б (LMB) вносили за 10 год до стимулювання клітин сироваткою. Клітини фіксували і обробляли, як описано раніше [6], при цьому як первинні антитіла використовували

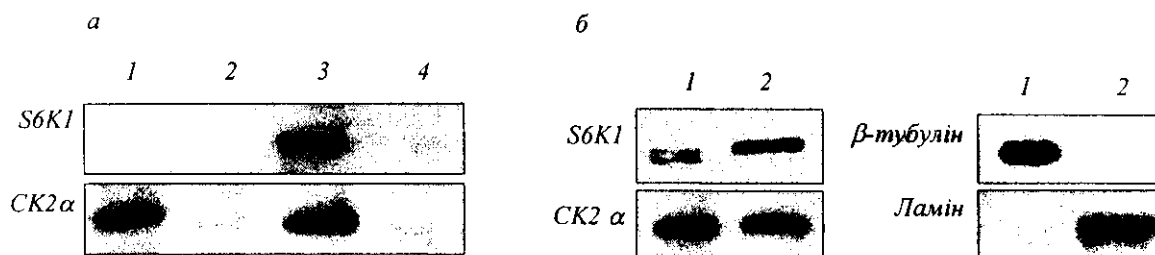


Рис. 1. Аналіз взаємодії ендогенної S6K1 з каталітичною субодиницею CK2 в ядерній і цитоплазматичній фракціях клітин: *а* — Вестерн-блот аналіз імунопреципітатів анти-CK2-антитіл з цитоплазматичної (1) і ядерної (3) фракцій лізатів клітин NIN3T3, стимульованих сироваткою з використанням анти-S6K1 та анти-CK2 α -антитіл; тест на неспецифічне зв'язування S6K1 і CK2 з Protein A-сефарозою в цитоплазматичній (2) і ядерній (4) фракціях; *б* — Вестерн-блот аналіз цитоплазматичної (1) і ядерної (2) фракцій екстрактів клітин NIN3T3 з використанням анти-S6K1, анти-CK2 α , анти-ламін (маркер ядра) та анти-тубулін антитіл (маркер цитоплазми)

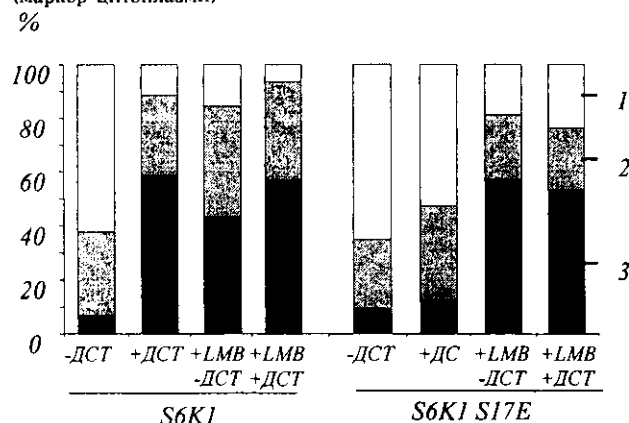


Рис. 2. Аналіз субклітинної локалізації рекомбінантних форм S6K1 дикого типу і S17E мутанта з використанням лазерної сканувальної мікроскопії. Клітини NIN3T3, тимчасово трансфіковані плазмідами, що містять кДНК S6K1 дикого типу або мутанта S6K1S17E в рамці з EE-міткою, інкубували в середовищі без сироватки протягом 24 год. Після чого до відповідних зразків додавали LMB (5 нМ) та залишали на 12 год, далі клітини стимулювали 10 %-ю сироваткою (DCT) упродовж 1 год, преімобілізували, обробляли анти-EE-антитілами і вторинними антитілами, міченими флуоресцеїнізотиоціанатом. В кожному експерименті підраховували не менше 150 клітин. Клітини підрозділяли на три групи: 1 — S6K1, локалізована лише в цитоплазмі; 2 — локалізація S6K1 і в ядрі, і в цитоплазмі; 3 — більша частина надекспресованого білка S6K1 локалізується в ядрі

вали моноклональні анти-EE-антитіла. Флуоресцентно мічені клітини аналізували за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM510.

Результати і обговорення. З огляду на те, що, з одного боку, CK2 часто залучена до регуляції субклітинної локалізації білків через їхнє фосфорилування, а з іншого, — фосфорилування Ser17 у складі S6K1 не впливає на її активність, ми зробили припущення відносно регуляторної ролі фосфорилування Ser17 для субклітинної локалізації S6K1. Щоб виявити субклітинну локалізацію S6K1/CK2 комплексу на рівні ендогенних білків

було проаналізовано ядерний і цитоплазматичний екстракти клітин лінії NIN3T3. Як видно з рис. 1, *а*, ендогенна S6K1 взаємодіє з CK2 лише в ядрі, незважаючи на те, що обидва ферменти детектовано як у ядрі, так і в цитоплазмі (рис. 1, *б*). Отже, CK2-опосередковане фосфорилування S6K1 по Ser17, найімовірніше, відбувається в ядрі.

Для виявлення фізіологічної ролі фосфорилування Ser17 у клітинах лінії NIN3T3 порівнювали субклітинну локалізацію рекомбінантних S6K1 дикого типу і мутантної форми (S6K1S17E), що моделює фосфорильований стан кінази. Локалізацію кіназ визначали за допомогою конфокальної сканувальної мікроскопії із застосуванням відповідних антитіл. Як видно з даних, наведених на рис. 2, S6K1 дикого типу і S6K1S17E за відсутності ростових факторів локалізовані переважно в цитоплазмі і лише приблизно в 7 % клітин за цих же умов S6K1 локалізується в ядрі. Однак при стимулюванні клітин 10 %-ю сироваткою протягом 1 год для переважної кількості клітин (до 60 %) спостерігається транслокація S6K1 дикого типу до ядра. Помітних змін в локалізації S6K1S17E при цьому не відбувається.

Представлені дані вказують на те, що фосфорилування Ser17 або блокує індукований сироваткою ядерний імпорт, або ж активує ядерний експорт S6K1. Зважаючи на існування S6K1/CK2 комплексу лише в ядрі клітин, останнє припущення видається вірогіднішим. Для його перевірки було проаналізовано локалізацію обох форм S6K1 при блокуванні в клітині ядерного експорту.

Експорт білків з ядра — це активний процес, що відбувається декількома відомими шляхами, з яких найдослідженішим є CRM1-залежний експорт. Відповідно ми застосували прямий інгібітор CRM1 — LMB [7]. Як видно з рис. 2, обробка

клітин LMB призводить до накопичення S6K1 дикого типу в ядрі як при стимулюванні клітин сироваткою, так і за його відсутності. Як і передбачалося, в разі S6K1S17E спостерігали суттєве збільшення кількості клітин з ядерною локалізацією кінрази (до 55 %), що вказує на існування активного імпорту мутантної форми S6K1S17E до ядра. Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що фосфорилування CK2 Ser17 у складі S6K1 залучено до регуляції експорту S6K1 з ядра клітини.

Як узагальнення описаних вище результатів ми пропонуємо модель регуляції ядерно-цитоплазматичного CRM1-залежного транспорту S6K1 за участі ростових факторів. Модель передбачає активний, індукований ростовими факторами імпорт S6K1 до ядра, однак характер імпульсів і молекулярні механізми цього процесу ще не з'ясовано. Можна передбачити, що в ролі таких імпульсів можуть виступати посттрансляційні модифікації S6K1. З іншого боку, експорт S6K1 із ядра є CRM1-залежним, де фосфорилування CK2 Ser17 у складі S6K1 є необхідною умовою. З огляду на те, що активність CK2, згідно з даними літератури, є конститутивною і не залежить від ростових факторів, регуляція експорту S6K1 з ядра, скоріш за все, відбувається на рівні утворення функціонального комплексу CK2 і S6K1.

G. G. Panasyuk, I. O. Nemazanyy, A. M. Zhyvoloup, V. V. Filonenko, I. T. Gout

Regulation of S6K1 subcellular localization by Casein kinase 2

Summary

Casein Kinase 2 (CK2) is physiological binding partner of ribosomal protein S6 kinase 1 identified using of two-hybrid yeast system. The specificity of interaction between β -subunit of CK2 and S6K1 was confirmed *in vitro*, also it was shown that Ser17 of S6K1 can be phosphorylated by CK2. The presented data suggest that Ser17 phosphorylation is the important event of S6K1 export from the nucleus. Immunoprecipitation studies of S6K1 and CK2 from cytoplasmic fraction of NIH3T3 cells indicate the formation of protein complex S6K1/CK2 in the nucleus, but not in the cytoplasm. Further fluorescent microscopy studies demonstrated that phosphorylation mimicking mutant of S6K1 (S17E) is not accumulated in the nucleus through the activated export of kinase from the nucleus.

Key words: S6K1, S6K2, CK2 β , nuclear export.

А. Г. Панасюк, І. А. Немазаній, А. Н. Живолуп, В. В. Філоненко, І. Т. Гут

Регуляция субклеточной локализации киназы рибосомного белка S6 казеинкиназой 2

Резюме

Казеинкиназа 2 (CK2) как физиологически связывающийся партнер киназы S6 рибосомного белка (S6K1) идентифицирована с использованием дрожжевой двугибридной системы. Специфичность взаимодействия между регуляторной β -субъединицей CK2 и S6K1 подтверждена *in vitro*, кроме того, показано, что S6K1 может быть фосфорилирована CK2 по Ser17. Представленные данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование Ser17 — важный этап регуляции экспорта S6K1 из ядра. Исследованиями по иммунопреципитации S6K1 и CK2 из ядерной и цитоплазматической фракций клеток линии NIH3T3 показано существование комплекса S6K1/CK2 в ядре, но не в цитоплазме. С использованием флуоресцентной микроскопии выявлено, что мутант S6K1 (S17E) не накапливается в ядре из-за активированного экспорта киназы из ядра.

Ключевые слова: S6K1, S6K2, CK2 β , ядерный экспорт.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Thomas G. The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth // *Biol. Res.*—2002.—35.—P. 305—313.
2. Панасюк Г. Г., Немазаній І. О., Живолуп О. М., Філоненко В. В., Гут І. Т. Бета субодиниця казеїнкінази 2 як новий зв'язувальний партнер кінрази рибосомного білка S6 // *Біополімери і клітина.*—2005.—21, № 5.—С. 407—412.
3. Savinska L. O., Lyzogubov V. V., Usenko V. S., Ovcharenko G. V., Gorbenko O. N., Rodnin M. V., Vudmaska M. I., Pogribnyy P. V., Kyuyamova R. G., Panasyuk G. G., Nemazanyy I. O., Malets M. S., Patchevskyy S. S., Gout I. T., Filonenko V. V. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 expression in human breast tumors // *Eksp. Onkol.*—2004.—26.—P. 24—30.
4. Zhang X., Shu L., Hosoi H., Murti K. G., Houghton P. J. Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 28127—28134.
5. Nemazanyy I., Panasyuk G., Zhyvoloup A., Panayotou G., Gout I. T., Filonenko V. Specific interaction between S6K1 and CoA synthase: a potential link between the mTOR/S6K pathway, CoA biosynthesis and energy metabolism // *FEBS Lett.*—2004.—578.—P. 357—362.
6. Zhyvoloup A., Nemazanyy I., Panasyuk G., Valovka T., Fenton T., Rebholz H., Wang M. L., Foxon R., Lyzogubov V., Usenko V., Kyuyamova R., Gorbenko O., Matsuka G., Filonenko V., Gout I. T. Subcellular localization and regulation of coenzyme A synthase // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 50316—50321.
7. Kutay U., Guttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak // *Trends Cell Biol.*—2005.—15.—P. 121—124.

УДК 577.217, 577.218
Надійшла до редакції 07.10.05