

Вплив точкових мутацій регуляторних амінокислотних залишків та делецій N- і С-кінцевих ділянок S6K1 і S6K2 на активність кіназ

Т. Й. Вальовка¹, І. Т. Гут^{1, 2}, В. В. Філоненко²

¹ Людвіговський інститут Ракових Досліджень
WIP8BT, 91 Райдінг Хауз стріт, Лондон, Велика Британія

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

До родини кіназ рибосомного білка S6 (S6K) належать S6K1 та S6K2 кінази, які мають високий ступінь гомології амінокислотних послідовностей упродовж їхніх каталітичних доменів. Існування гомологічних сайтів фосфорилування у S6K свідчить про можливість функціонування подібних механізмів активації кіназ. Із застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу та делетування N- і С-кінцевих ділянок S6K встановлено, що фосфорилування Thr412 і Thr401 є необхідною умовою для повної активації S6K1 і S6K2 відповідно. Різна чутливість S6K1 і S6K2 до інгібіторної дії рапаміцину пов'язана з особливостями структури С-кінцевих ділянок S6K, які мають низький рівень гомології.

Ключові слова: рибосомний білок S6, S6K1 і S6K2, сайт-спрямований мутагенез.

Вступ. Кінази рибосомного білка S6 (S6K) належать до AGC родини Ser/Thr білкових кіназ, до якої входять протеїнкіназа С (PKC), протеїнкіназа В (PKB), SGK і 90 кДа кіназа рибосомного білка (p90 RSK). На сьогодні відомо дві форми S6K — S6K1 і S6K2, які виникають в результаті альтернативного сплайсингу мРНК і мають цитоплазматичну (S6K1/II, S6K2/II) та ядерну (S6K1/I, S6K2/I) ізоформи, що містять в N-кінцевому подовженні сигнал ядерної локалізації (NLS) [1, 2].

S6K1 ідентифіковано наприкінці 80-х років [3] на відміну від S6K2, яку виявлено нещодавно [4], і тому більшість досліджень стосується саме першої форми кінази. Вважається, що S6K1 залучена до індукованого мітогенними стимулами білкового синтезу внаслідок активації трансляції мРНК ком-

понентів апарату трансляції за рахунок фосфорилування специфічного субстрату — S6 рибосомного білка [5].

S6K1 і S6K2 мають дуже високий рівень гомології первинних структур [4] з найвищою гомологією упродовж каталітичних доменів. Однак існують і суттєві відмінності, що стосуються N- та С-кінцевих регуляторних ділянок, де гомологія сягає лише 28 і 25 % відповідно. Так, С-кінцевий район S6K2 містить специфічну пролін-багату ділянку, яка, за літературними даними, часто залучена до взаємодії з SH3 доменами білків. Крім того, нещодавно встановлено присутність додаткового NLS у межах С-кінцевої ділянки S6K2 [6]. Натомість у С-кінцевій послідовності S6K1 виявлено PDZ домен, також причетний до утворення білкових комплексів [7].

Дослідження з використанням трансгенних тварин свідчать, що блокування функціонування

гена S6K1 призводить до суттєвого зменшення розміру тварин за рахунок зменшення розміру клітин. Блокування ж гена S6K2 не впливає на розмір тварин. З іншого боку, рівень фосфорилування S6 білка суттєво знижується лише за відсутності активності S6K2 [8]. Визначено суттєві відмінності в кінетиці активації S6K у відповідь на мітогенну стимуляцію [9].

Таким чином, існують численні дані, що свідчать як про подібність, так і відмінності у функціонуванні S6K у клітині, а саме — про існування альтернативних шляхів регуляції активності S6K та використання специфічних субстратів.

Механізм активації S6K1 досліджували в ряді лабораторій, завдяки чому відомо, що активність S6K1 регулюється фосфорилуванням та дефосфорилуванням багатьох сайтів [10, 11]. Доведено, що PI3K, PKB, PDK, mTOR кіназа та ін. опосередковано або безпосередньо залучені до цього процесу [12]. Фосфорилування залишків Thr252 і 412 вважається необхідним для остаточної активації S6K1. Оскільки в структурі S6K2 присутні всі гомологічні сайти фосфорилування S6K1 (за винятком сайта, гомологічного Thr444), зроблено припущення стосовно можливості існування подібних механізмів регуляції активності.

Матеріали і методи. Клонування кДНК повнорозмірних та делетованих форм S6K у вектор для експресії в клітинах ссавців (pcDNA 3.1) здійснювали за стандартною методикою з використанням таких праймерів.

Смислові: S6K1/II — 5'-GAATTCGGATCCGCCACCATGGAGTTCATGCCGATGGAGAGGCAG-3';

S6K2/II — 5'-GAATTCGGATCCGCCACCATGGAGTTCATGCCGATGGAGGCCGCCGTGTTGATTTGGAT-3';

S6K1ΔN₇₅ — 5'-TTCGGATCCGCCACCATGGAGTTCATGCCGATGGAGGAAACTAGTGTGAA-CAGAGGGCCA-3';

S6K2ΔN₆₄ — 5'-TTCGGATCCGCCACCATGGAGTTCATGCCGATGGAGGAGACCAGCGTGAA-ACGTTGGCCCA-3' (*Bam*HI сайти підкреслено, EE-fag послідовності виділено курсивом).

Антисмислові: S6K1/II, S6K1ΔN₇₅ — 5'-CGGGAATTCCTCAAGATTCATAGGCAGGTTG-3';

S6K2/II, S6K2ΔN₆₄ — 5'-CGGGAATTCCTCAGCGCCCTGGACGCCACG-3';

S6KαDC₁₀₀ — 5'-CGGGAATTCCTACTTTTCTTTCACACTTCAAGTACAGATG-3';

S6KβΔC₈₁ — 5'-CGGGAATTCCTAGCCCTCCTTGATGCTGTCCAG-3' (*Eco*RI сайти підкреслено, стоп-кодони виділено курсивом).

Сайт-спрямований мутагенез. Мутантні форми білків з точковими амінокислотними замінами створювали з використанням QuickChange™ кіта для сайт-спрямованого мутагенезу («Stratagene», США) згідно з рекомендаціями виробника. В реакції використовували суперскручену дволанцюгову ДНК вектора зі вставкою, два синтетичних олігонуклеотидних праймери, що містили мутацію та високоточну PfuTurbo ДНК полімерази. При дизайні праймерів для мутагенезу враховували, що 1) мутагенні праймери повинні включати необхідну мутацію і зв'язувати ту саму послідовність на другому ланцюзі плазміди; 2) вони мають бути від 25 до 45 п. н. довжиною і плавитися при температурі, більшій або рівній 78 °C; 3) мутація має знаходитися в центрі праймера і містити 10—15 п. н. по краях.

Олігонуклеотидні праймери, кожен комплементарний до протилежного ланцюга вектора, подовжували з використанням ПЛР та PfuTurbo ДНК полімерази. Зразки денатурували при температурі 95 °C протягом 30 с, гібридизували при 55 °C — 30 с та подовжували при 68 °C (30 с для кожних 500 п. н.). У разі заміни однієї амінокислоти проводили 16 циклів ампліфікації. Після ампліфікації ПЛР до продукту реакції додавали 10 U ендонуклеази *Dpn*I при 37 °C упродовж 1 год для знищення немутованої ДНК матриці. Векторну ДНК з потрібними мутаціями далі трансформували у компетентні клітини *Escherichia coli* XL-1, а присутність потрібної мутації у відібраних клонах перевіряли секвенуванням кДНК.

Трансфекцію клітин HEK293 відповідними конструктами, отримання лізатів клітин, імунопреципітацію різних форм рекомбінантних S6K та подальше визначення активності S6K у реакції фосфорилування S6 рибосомного білка здійснювали, як описано раніше [9]. Вплив інгібіторів на активність S6K моделювали за методом [9].

Результати і обговорення. Як зазначалося вище, активація S6K1 відбувається в результаті фосфорилування по множинних сайтах, однак лише фосфорилування по залишках Thr252 і Thr412, які розташовані в каталітичному домені та в його подовженні, призводить до повної активації кінази, при цьому функціональна кооперація є преобладаючим фактором [13]. Для порівняння функ-

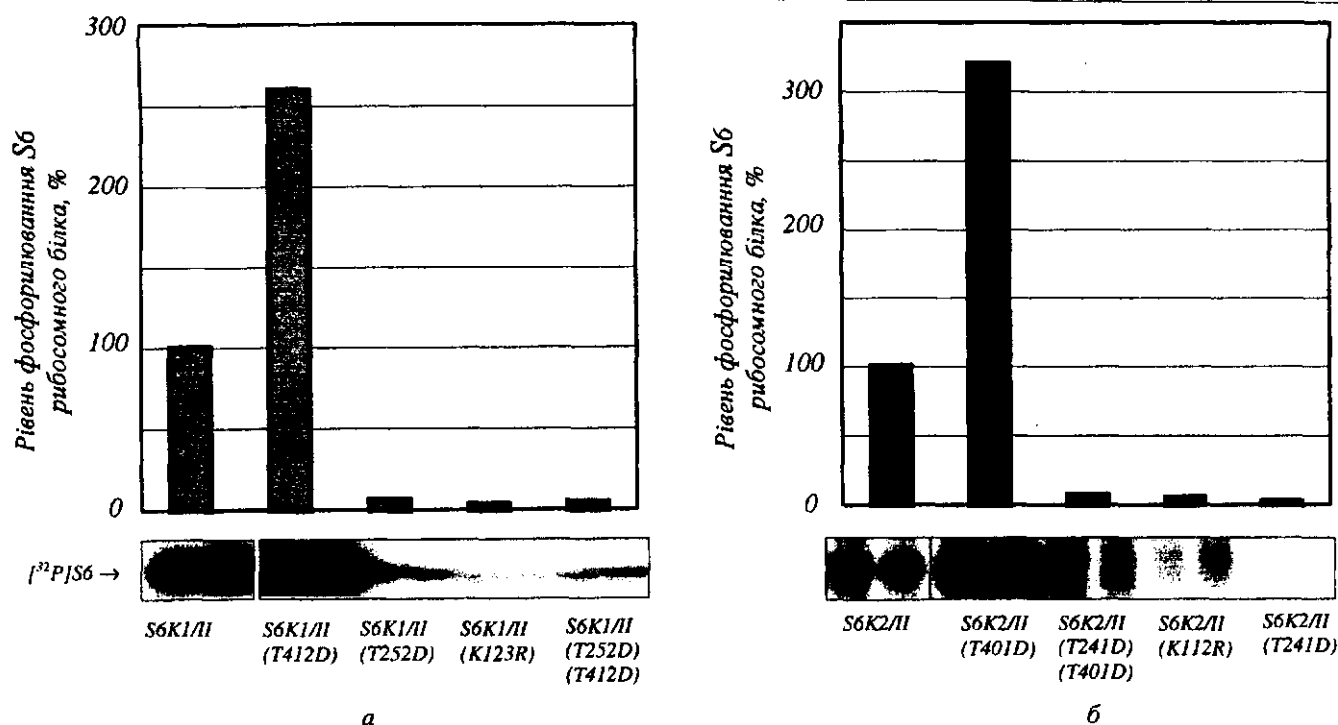


Рис. 1. Ефект різних точкових мутацій на активність S6K1/II (а) і S6K2/II (б). Клітини лінії HEK293 трансфіковано ДНК конструкціями, які містили кодуючі послідовності для повнорозмірних S6K1/II і S6K2/II дикого типу і відповідно мутантних форм S6K. Після 24 год культивування в середовищі DMEM з додаванням 10 % FCS клітини лізували, як описано [14]. S6K активність різних форм EE-S6K визначали в імунопреципітатах анти-EE антитіл з відповідних лізатів клітин. Для імунопреципітації використовували лізати клітин, які містили однакову кількість EE-S6K згідно з Вестерн-блот-аналізом лізатів клітин із застосуванням анти-EE антитіл. Активність S6K дикого типу вважали за 100 %

ціональної значущості гомологічних сайтів фосфорилування в структурі S6K1 і S6K2 нами було проаналізовано мутантні форми кіназ, у яких Thr252/412 в послідовності S6K1 та гомологічні залишки в послідовності S6K2 (Thr241/401) замінено на аспарагінову кислоту. кДНК конструкції S6K1 і S6K2, які містили відповідні мутації та додатковий EE-tag, створювали, як описано в «Матеріалах і методах».

Згідно з літературними даними, заміна Ser або Thr на негативно заряджену амінокислоту імітує стан фосфорилування заміненої амінокислоти, в нашому випадку фосфотreonіну [14, 15]. Активність мутантних форм (S6K1_{T412-D} і S6K2_{T401-D}) аналізували в імунопреципітатах анти-EE антитіл, отриманих з клітин HEK293, трансфікованих відповідними кДНК конструкціями, за визначенням рівня фосфорилування S6 рибосомного білка. Проведений аналіз показав дво- і триразове зростання активності S6K1_{T412-D} і S6K2_{T401-D} відповідно у порівнянні з S6K дикого типу (рис. 1). При цьому для S6K2, на відміну від S6K1, спостерігалось навіть

незначне підвищення рівня аутофосфорилування (даних не наведено). Поряд з цим аналогічна заміна по сайтах S6K1_{Thr252-D} і S6K2_{Thr241-D} несподівано спричинила протилежний ефект, а саме — повне пригнічення активності відносно фосфорилування S6 рибосомного білка (рис. 1). Однак на відміну від S6K1_{T252-D} мутація S6K2_{T241-D} зовсім не вплинула на рівень аутофосфорилування S6K2_{T241-D} (даних не наведено).

Одночасна мутація обох регуляторних сайтів фосфорилування (S6K_{T412-D/T252-D} і S6K_{T401-D/T241-D}) не призводила до відновлення активності. Отримані результати дозволяють припустити, що залишки Thr252 і Thr241 у складі каталітичних доменів є функціонально необхідними для прояву кіназної активності, тоді як фосфорилування Thr412/401 може бути етапом, який лімітує величину цієї активності.

Амінокислотний залишок Lys123 у структурі S6K1 розташований в каталітичному домені кінази і вважається сайтом для зв'язування АТФ. Мутаційний аналіз згаданого залишку і його аналога

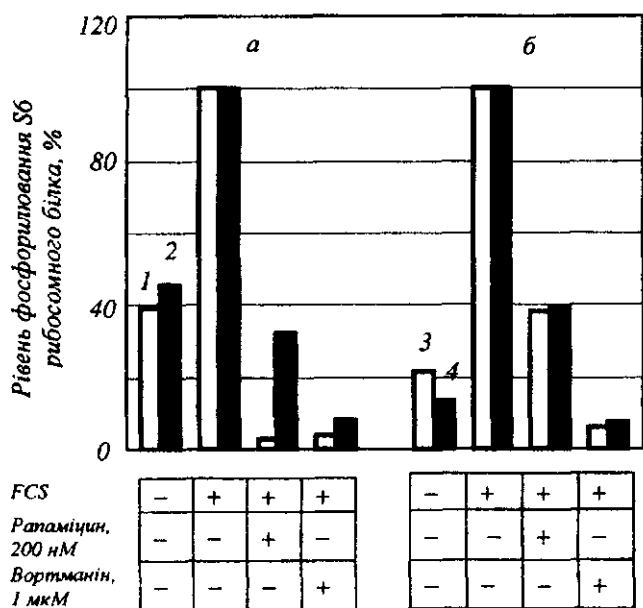


Рис. 2. Вплив С-кінцевих делецій S6K1/II (а) і S6K2/II (б) на чутливість кіназ до дії рапаміцину та вортманіну: 1 — S6K1/II; 2 — S6K1ΔC₁₀₀; 3 — S6K2/II; 4 — S6K2/ΔC₈₁. Клітини лінії HEK293 трансфіковано кДНК конструкціями делетованих форм S6K1 і S6K2. Після 24 год голодування на безсироватковому середовищі клітини інкубували з 0,01 % Me₂SO, 200 нМ рапаміцином або 1 мкМ вортманіном протягом 20 хв з подальшою стимуляцією клітин 10 % FCS та визначенням S6K активності. Активність різних форм S6K після стимуляції клітин сироваткою вважали за 100 %

у S6K2 Lys112 шляхом заміни на Arg підтвердив їхню функціональну значущість для обох кіназ. Згадана заміна викликала повну інактивацію як S6K1, так і S6K2.

Оскільки, як уже відмічалось, найбільші відмінності у структурі кіназ припадають на N- і С-кінцеві ділянки [4], для вивчення ролі цих районів у функціонуванні S6K1 і S6K2 було досліджено мутантні форми кіназ, що містили делеції саме в цих ділянках.

З літератури відомо, що С-кінцеві делеції S6K1 призводять до суттєвого зниження ступеня максимального пригнічення активності S6K1 рапаміцином (інгібітора mTOR кінازی, вищерозташованого ефектора S6K) з 95 до 60 % [15, 16]. До того ж додаткова N-кінцева делеція викликає повну нечутливість мутантної форми S6K1 до дії інгібітора [16]. Цікаво, що при цьому чутливість до дії вортманіну інгібітора PI3K і відповідно S6K1 не змінювалася.

З іншого боку, за нашими даними [9], S6K1 на

відміну від S6K2 є суттєво чутливішою до пригнічувальної дії рапаміцину на стимульовану сироваткою активність S6K.

Наведені дані дозволили зробити припущення про те, що відмінності в чутливості до рапаміцину між S6K1 та S6K2 пов'язані з особливостями структурної організації регуляторних N- та С-кінцевих ділянок кіназ, де спостерігається найменша гомологія.

Перевірку такого припущення здійснювали, досліджуючи ефект N- та С-кінцевих делецій у послідовностях S6K1 і S6K2 на активність цих кіназ та їхню чутливість до дії інгібіторів. Для цього клітини лінії HEK293 трансфікували векторними конструкціями, які містили кодуючі ДНК послідовності для повнорозмірних форм S6K (pcDNA3.1/EE-S6K1 і pcDNA3.1/EE-S6K2), а також мутантних форм (pcDNA3.1/EE-S6K1ΔN₇₅, pcDNA3.1/EE-S6K2ΔN₆₄, pcDNA3.1/EE-S6K1ΔC₁₀₀, pcDNA3.1/EE-S6K2ΔC₈₁). Для виявлення впливу інгібіторів клітини перед стимуляцією сироваткою інкубували в присутності 200 нМ рапаміцину і 1000 нМ вортманіну, а активність різних форм кіназ визначали в імунопреципітатах відповідних лізатів клітин з використанням анти-EE антитіл.

Отримані результати свідчать про те, що видалення 75 і 64 амінокислотних залишків з N-кінцевої ділянки S6K1 і S6K2 відповідно призводить до суттєвого зниження активності кіназ (даних не наведено) як базальної, так і стимульованої сироваткою, яка сягала майже 90 %.

Раніше іншими авторами також встановлено значний інгібіторний ефект внаслідок видалення 54 амінокислотних залишків з N-кінцевого району S6K1 [16, 17]. Таким чином, наші дані засвідчують важливу роль регуляторних N-кінцевих ділянок як S6K1, так і S6K2 для повної активації кіназ. При цьому вплив відповідних делецій на чутливість кіназ до дії інгібіторів PI3K та mTOR кінازی не може бути коректно визначеним та інтерпретованим, оскільки делеції самі по собі вже мають суттєвий пригнічувальний ефект.

На відміну від N-кінцевих, С-кінцеві делеції S6K майже не діяли на активність ні S6K1, ні S6K2, що узгоджується з літературними відомостями для S6K1 [13]. Крім того, індукована сироваткою активація мутантних форм S6K майже не відрізнялася від такої для кіназ дикого типу (рис. 2).

Раніше нами встановлено, що S6K1 і S6K2

відрізняються за своєю чутливістю до інгібіторної дії рапаміцину на індуковану мітогенами активацію S6K, а саме — 200 нМ концентрація рапаміцину призводила до майже 100 %-ї інактивації S6K1 і лише до 60 %-ї — S6K2 [13]. Перевірка відповідної чутливості делетованих з С-кінця форм S6K виявила, що в разі S6K2 зазначена делеція не мала помітного впливу на рівень пригнічення активності рапаміцином у порівнянні з повнорозмірною S6K2. Рівень інгібування активності як дикого типу S6K2, так і його делетованої форми сягав приблизно 60 %. Однак для S6K1ΔC визначено, що рівень пригнічення активності був співмірним з S6K2 і S6K2ΔC та відповідно значно нижчим у порівнянні з S6K1 дикого типу (рис. 2). Таким чином, С-кінцева ділянка S6K1, але не S6K2, залучена до інгібіторної дії рапаміцину і відповідно до регуляції S6K1 за участі mTOR кінази.

Дослідження ж ефекту С-кінцевих делецій S6K на їхню чутливість до дії вортманіну свідчить про відсутність впливу (рис. 2), тобто рівень інгібування активності повнорозмірних форм S6K збігається з таким для делетованих форм. Ці дані підтверджують, що С-кінцеві ділянки S6K не залучені до регуляції S6K активності, індукованої PI3 кіназою.

Отже, представлені результати свідчать про те, що S6K1 і S6K2 використовують подібні молекулярні механізми активації, які базуються на фосфорилуванні регуляторних залишків, консервативних для обох форм кіназ. Однак наведені дані не виключають, а, навпаки, навіть передбачають порядок з цим існування різних регуляторних механізмів за рахунок використання альтернативних сигнальних шляхів, в основі яких лежать деякі відмінності у структурній організації S6K.

T. I. Valovka, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Effect of point mutations of regulatory aminoacids residues and N- and C-terminal deletions of S6K1 і S6K2 on kinase activity

Summary

The family of ribosomal protein S6 kinases includes two forms — S6K1 and S6K2 that share high level of structural homology towards catalytic domains. Existence of homological phosphorylation sites suggests the functioning of similar mechanisms of the kinase activation. Using site-directed mutagenesis and N-, C-terminal deleting of S6K it has been demonstrated that phosphorylation of Thr412 and Thr401 are necessary for the full activation of S61 and S62 correspondently. Different sensitivity of S6K to the inhibitory actions of rapamycin relates to the structure of C-terminal S6K regions that exhibits low homology.

Key words: ribosomal protein S6, S6K1 and S6K2, site-directed mutagenesis.

T. I. Valovka, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Влияние точечных мутаций регуляторных аминокислотных остатков и делеций N- и С-концевых участков S6K1 и S6K2 на активность киназ

Резюме

К семейству киназ рибосомного белка S6 (S6K) принадлежит S6K1 и S6K2 киназы, проявляющие высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей в области каталитических доменов. Существование гомологичных сайтов фосфорилирования у S6K свидетельствует о возможности функционирования подобных механизмов активации киназ. С использованием сайт-направленного мутагенеза и делетирования N- и С-концевых районов S6K установлено, что фосфорилирование Thr412 и Thr 401 является необходимым для полной активации S6K1 и S6K2 соответственно. Разная чувствительность S6K1 и S6K2 к ингибиторному действию рапаміцина связана с особенностями структуры С-концевых районов S6K, где степень гомологии самая низкая.

Ключевые слова: рибосомный белок S6, S6K1 и S6K2, сайт-направленный мутагенез.

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. Jefferies H. B. J., Fumagalli S., Dennis P. B., Reinhard C., Pearson R. B., Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K // *EMBO J.*—1997.—16.—P. 3693—3704.
6. 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.
7. Burnett P. E., Blackshaw S., Lai M. M., Qureshi I. A., Burnett A. F., Sabatini D. M., Snyder S. H. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 8351—8356.
8. Pende M., Hee Ume S., Mieulet V., Sticker M., Goss Y. L., Mestan J., Mueller M., Fumagalli S., Kozma S. C., Thomas G. S6K1^{-/-}S6K2^{-/-} mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway // *Mol. and Cell. Biol.*—2004.—24.—P. 3112—3124.
9. Вальовка Т. Й., Філоненко В. В., Пальчевський С. С.,

- Великий М. М., Дробот Л. Б., Вотерфілд М., Мацука Г. Х., Гут І. Т. Функціональні та регуляторні особливості кінрази рибосомного білка S6 типу I // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 5.—С. 415—421.
10. Dennis P. B., Pullen N., Pearson R. B., Kozma S. C., Thomas G. Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 14845—14852.
 11. Weng Q. P., Kozlowski M., Belham C., Zhang A., Comb M. J., Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation *in vivo*. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 16621—16629.
 12. Pullen N., Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k // FEBS Lett.—1997.—410.—P. 78—82.
 13. Alessi D. R., Kozlowski M. T., Weng Q.-P., Morrice N., Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro* // Curr. Biol.—1997.—8.—P. 69—81.
 14. Pearson R. B., Dennis P. B., Han J.-W., Williamson N. A., Kozma S. C., Wettenhall R. E. H., Thomas G. The principal target of rapamycin-induced p70S6K inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain // EMBO J.—1995.—21.—P. 5279—5287.
 15. Fingar D. C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression // Oncogene.—2004.—23, N 18.—P. 3151—3171.
 16. Weng Q. P., Andrabi K., Kozlowski M. T., Grove J. R., Avruch J. Multiple independent inputs are required for activation of the p70 S6 kinase // Mol. Cell. Biol.—1995.—15.—P. 2333—2340.
 17. Martin K. A., Blenis J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways // Adv. Cancer Res.—2002.—86.—P. 1—39.

УДК 577.112.7
Надійшла до редакції 04.06.04