ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2005. Т. 21. № 5

Бета-субодиниця казеїнкінази 2 як новий зв'язувальний партнер кінази 1 рибосомного білка S6

Г. Г. Панасюк[1], І. О. Немазаний[1], О. М. Живолуп[1], В. В. Філоненко[1], І. Т. Гут[1, 2]

[1]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна
[2]Університетський коледж Лондона
Говер стрит, WC1E 6BT, Лондон, Велика Британія

E. mail: panasyuk_g@imbg.org.ua

Сигнальні шляхи клітини відіграють провідну роль у регуляції і координації клітинних процесів. Важливою регуляторною ланкою сигнальних шляхів є родина Ser/Thr протеїнкіназ S6 білка 40S субчастинки рибосом (S6K1 і S6K2), які належать до PI3-кіназа-залежного сигнального шляху. На сьогодні виявлено суттєве значення S6K1 для регуляції біосинтезу білка, індукованого мітогенними стимулами внаслідок фосфорилювання рибосомного білка S6. Також показано роль S6 кінази в регуляції клітинного циклу. Актуальним є дослідження білкових партнерів S6K у клітині, особливо із застосуванням методичних підходів, що максимально б відповідали умовам in vivo. Двогібридна система дріжджів є сучасним методом, який широко використовують у світі для виявлення білково-білкових взаємодій. Використавши як байт активовану форму S6K1, скринуванням кДНК-бібліотеки клітин HeLa ідентифіковано вісім нових S6K1-зв'язувальних партнерів, серед яких β-субодиниця казеїнкінази 2 (CK2). Біоінформаційний комп'ютерний аналіз первинної послідовності S6K1 виявив існування декількох потенційних сайтів фосфорилювання для CK2, найімовірнішим серед них є Ser17. Підтверджено фосфорилювання S6K1 по Ser17 рекомбінантною CK2 за умов реакції in vitro. Також визначено in vitro взаємодію між рекомбінантними білками S6K1 і CK2β.

Ключові слова: S6K1, S6K2, β-субодиниця казеїнкінази 2, двогібридна система дріжджів, фосфорилювання.

Вступ. Кінази S6 рибосомного білка залучені до сигнальних шляхів, завдяки чому регулюються клітинний ріст, розмір та G1/S перехід клітинного циклу. Родину кіназ S6 рибосомного білка представлено двома ізоформами (S6K1 і S6K2), які, в свою чергу, мають цитоплазматичні і ядерні сплайсові варіанти. В численних експериментах показано, що родина S6K — це єдині відомі на сьогодні кінази, здатні фосфорилювати рибосомний білок S6 *in vivo* [1]. Фосфорилювання S6 селективно регулює трансляцію мРНК, які містять олігопіримідинову послідовність на 5′-кінці та кодують компоненти білоксинтезувального апарату (рибосомні білки і фактори елонгації). Таким чином, активація S6K в PI3K-сигнальному шляху призводить до стимуляції клітинного росту. Також показано роль S6 кінази у регуляції клітинного циклу [2].

Ціла низка кіназ і фосфатаз здатні використовувати S6K як субстрат *in vitro*, однак лише для деяких із них підтверджено існування функціонального зв'язку *in vivo* [3—5]. Саме тому молекулярні механізми регуляції активності S6K кіназ у

© Г. Г. ПАНАСЮК, І. О. НЕМАЗАНИЙ, О. М. ЖИВОЛУП, В. В. ФІЛОНЕНКО, І. Т. ГУТ

клітині лишаються багато в чому незрозумілими. Одним із методичних підходів для визначення білково-білкових взаємодій за умов, що максимально відповідали б умовам *in vivo*, є двогібридна система дріжджів. Із застосуванням цієї методології раніше нами ідентифіковано новий S6K1-асоційований білок — КоА-синтазу, що дозволило встановити зв'язок між PI3K-залежним сигнальним шляхом та енергетичним метаболізмом клітини [6, 7].

Матеріали і методи. *Двогібридна система дріжджів.* Використано двогібридну систему дріжджів DupLEX-ATM виробництва компанії OriGene Technologies Inc. (США). Як байт застосовано ДНК конструкцію на основі вектора *pEG202* з клонованою в нього послідовністю S6K1/T412D [8].

Трансформацію дріжджових клітин байт-плазмідами і плазмідами — компонентами системи DupLEX-ATM і кДНК-бібліотекою клітинної лінії HeLa проводили ПЕГ-літієвим методом за модифікованим протоколом OriGene Technologies [9]. Скринування кДНК-бібліотеки та аналіз позитивних клонів здійснювали згідно з рекомендаціями виробника і модифікаціями, як у роботі [8].

Експресія рекомбінантних білків. Для отримання рекомбінантних білків використано *pET*-систему («Novagene», США). ДНК-послідовність гена CK2β клонували у вектор *pET42a* [10]. Для напрацювання плазмідної ДНК та експресії рекомбінантних білків CK2β-GST-6His і GST-6His використовували бактеріальні штами — XL10Gold і BL21(DE3) відповідно.

In vitro зв'язування CK2β-GST-6His і S6K1. Реакцію *in vitro* зв'язування CK2β-GST-6His і S6K1 проводили, як описано раніше [6]. Для виявлення в зразках S6K1, CK2β-GST-6His і GST-6His використовували анти-S6K1 поліклональні антитіла [11] та анти-GST моноклональні антитіла [10] відповідно.

In vitro CK2 кіназна реакція. Кіназну реакцію проводили в кінцевому об'ємі 20 мкл. Склад реакційної суміші: CK2 кіназний буфер (20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl з додаванням 5 мкКі [γ-^{32}P] ATP, 2 мМ ATP, 100 од. акт. рекомбінантного ферменту CK2, а також 1 мкг субстрату. Реакцію проводили за температури 30 °С протягом 30 хв та зупиняли додаванням 2 × буфера для нанесення зразків для білкового електрофорезу в ПААГ і прогріванням (95 °С, 5 хв). Зразки розділяли у 10 %-му ПААГ в денатурувальних умовах, кількість включеного радіоактивного ^{32}P у білок-субстрат вимірювали авторадіографічно. Кількість субстрату в реакції контролювали або методом Вестерн-блоту, або фарбуванням ПААГ кумасі.

Сайт-спрямований мутагенез здійснювали з використанням набору QuikChange («Stratagene», США). Для введення заміни у послідовність S6K1 (Ser17 на Ala) використовували праймери: 5′-gaggatgcaggcGCTgaggatgagctg-3′ та 3′-cagctcatcctcAGCgcctgcatcctc-5′. Присутність мутації підтверджували секвенуванням кДНК. Мутантну S6K1/Ser17Ala та S6K1 дикого типу, злитих з EE-міткою, транзієнтно надекспресували в клітинах лінії HEK293 з використанням реагенту ExGen500 («Fermentas», Литва), згідно з рекомендаціями виробника, і надалі імунопреципітували за допомогою анти-EE антитіл, як описано в [6]. Преципітати розділяли на дві рівні частини і використовували в *in vitro* CK2 кіназній реакції та паралельно у Вестерн-блоті з анти-S6K1 поліклональними антитілами для контролю кількості білка в реакції.

Результати і обговорення. З огляду на важливу роль Ser/Thr фосфорилювання для активності S6K1 при подальшому дослідженні її нових функціональних зв'язків зроблено пошук білків, асоційованих з активованою формою S6K1. Для цього як байт використовували мутантну форму S6K1, що містила точкову мутацію, де Thr412 було замінено на Asp (S6K1/T412D) і тим самим імітовано фосфорильований стан кінази.

За результатами скринування кДНК бібліотеки клітин лінії HeLa із 120 первинних позитивів, які потенційно взаємодіяли з химерним білком LexA-S6K1/T412D, методом статевого злиття специфічність підтверджено для 25 позитивних клонів. Аналогічно підтверджено специфічність проаналізованих клонів стосовно байта S6K1 дикого типу.

Виявилося, що 23 з 25 клонів є специфічними для обох байтів S6K1 кіназ (мутантного і дикого типів). Отримані дані свідчать, що взаємодія S6K1 із зв'язувальними білками, які кодують ці клони, не залежить від конформації (активна/неактивна) кінази, оскільки заміна T412D у такому разі впливала б на формування комплексу. Щодо двох клонів, для білкових продуктів яких не підтверджено взаємодії з S6K1 дикого типу, можна припустити, що це пов'язано саме із зміною конформації активованої форми S6K1, спричиненої мутацією в активному центрі ферменту.

кДНК позитивних клонів, специфічність яких

Білки, ідентифіковані в дріжджовому двогібридному скринуванні, та функція, яку вони виконують у клітині

№ клону	Білок, який відповідає клону	Функція білка
1—12	Tudor repeated associator with PTAIR2 (TRAP)	Невідома
13	PDK-1	Ser/Thr протеїнкіназа
15—15	Rac-1	G-білок
16	EF-Ts	Мітохондріальний фактор елонгації
17	Тубулін альфа 6	Цитоскелетний білок
18—20	CK2β	Регуляторна субодиниця CK2
21	L17	Рибосомний білок
22—23	AIRAP	Індукований арсенітом РНК-зв'язувальний білок
24	Human oligo neuro protein	Невідома
25	S4X	Рибосомний білок

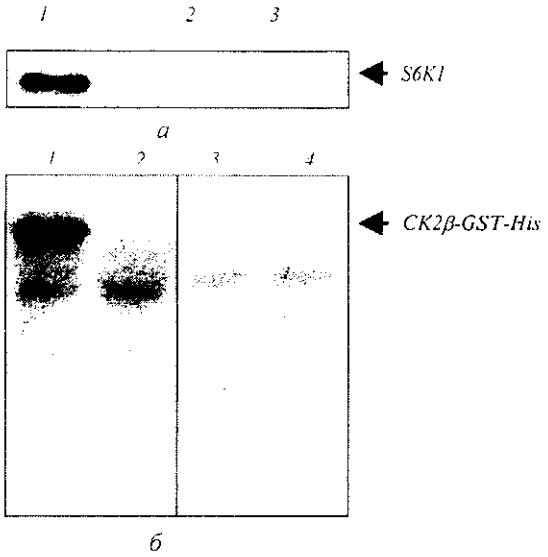

Рис. 1. Вестерн-блот-аналіз S6K1/GST-CK2β-His комплексів за допомогою анти-S6K1 (*а*) і анти-GST (*б*) антитіл: *а* — преципітація S6K1/GST-CK2β-His комплексу за допомогою глутатіонсефарози (преципітацію проводили за присутності: *1* — S6K1, GST-CK2 β-His, глутатіонсефарози; *2* — S6K1, GST-His, глутатіонсефарози, S6K1 і глутатіонсефарози); *б* — імунопреципітація S6K1/GST-CK2β-His комплексу за допомогою анти-S6K1 антитіл (преципітацію проводили за присутності: *1* — S6K1, GST-CK2 β-His, анти-S6K1 антитіл, білок А-сефарози; *2* — S6K1, GST-His, анти-S6K1 антитіл, білок А-сефарози; *3* — GST-CK2 β-His, анти-S6K1 антитіл, білок А-сефарози; *4* — S6K1, GST-His, анти-S6K1 антитіл, білок А-сефарози)

підтверджено методом статевого злиття, секвеновано та ідентифіковано за допомогою бази даних первинних послідовностей GenBank з використанням програми BLAST (таблиця).

Виявилося, що серед білків — партнерів S6K1 кДНК двох клонів кодують уже відомі і раніше охарактеризовані партнери S6K1 — Rac-1 [4] і PDK-1 [12], що, перш за все, вказує на якість проведеного двогібридного скринування. Інші білкові партнери S6K1 у клітинах дріжджів ідентифіковано вперше. кДНК трьох незалежних позитивних клонів кодували регуляторну субодиницю CK2.

CK2 є Ser/Thr протеїнкіназою, яка не належить до PI3K-сигнального шляху. CK2 — це надзвичайно консервативний і убіквітарно експресований білок, регуляцію і фізіологічну роль якого до кінця не з'ясовано [13, 14]. Згідно з результатами аналізу методом статевого злиття в клітинах дріжджів, β-субодиниця CK2 взаємодіє з S6K як мутантного, так і дикого типу.

У клітині охарактеризовано більш ніж 300 субстратів CK2. Для більшості з них показано фізіологічну роль фосфорилювання, яка виявляється у зміні субклітинної локалізації, стабільності або активності [15].

Взаємодію між CK2β і S6K1 дикого типу підтверджено *in vitro*. Для цього використовували рекомбінантну форму CK2β (GST-CK2β-His) та повнорозмірну форму S6K1, експресовану в бакуловірусній системі. До іммобілізованого на глутатіонсефарозі CK2β білка додавали рекомбінантну S6K1, а комплекси між CK2β і S6K1, преципітовані глутатіонсефарозою, аналізували Вестерн-блотом з використанням поліклональних анти-S6K1 антитіл (рис. 1, *а*). За контроль слугували зразки, у яких тестували зв'язування S6K1 з іммобілізованим на глутатіонсефарозі GST-His білком та лише з глутатіонсефарозою. Згідно з даними, наведеними на рис. 1, *а*, S6K1 специфічно взаємодіє з β-субодиницею CK2, але не з GST-His тагом. Аналогічні дані отримано в разі преципітації CK2β/S6K1 комплек-

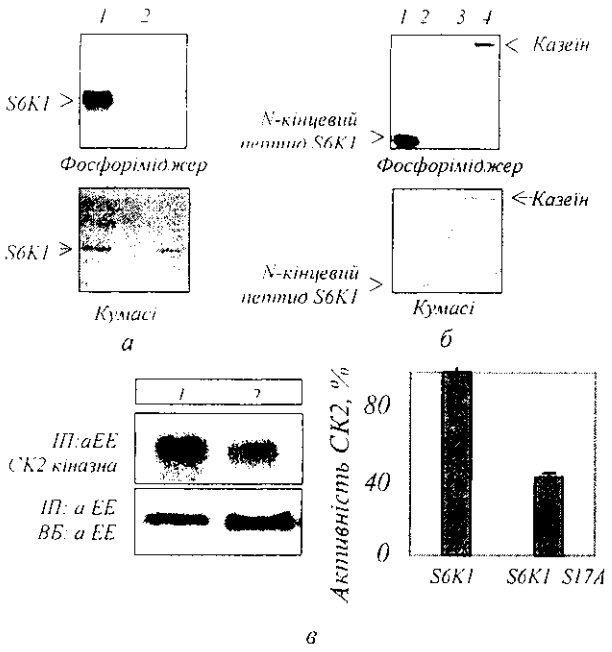

Рис 2. *In vitro* фосфорилювання S6K1 (*а*), S6K1 N-кінцевого пептиду і казеїну (*б*) та S6K1 і S6K1 S17A, імунопреципітованих анти-ЕЕ антитілами з клітин HEK293 (*в*), казеїнкіназою 2 (СК2) (*а*: *1* — проба, що містила S6K1 і СК2, *2* — проба, що містила тільки S6K1; *б*: *1* — проба, що містила S6K1 N-кінцевий пептид і СК2, *2* — проба, що містила S6K1 N-кінцевий пептид, *3* — проба, що містила казеїн, *4* — проба, що містила казеїн і СК2 (фосфоріміджер — радіоактивний сигнал, отриманий з допомогою фосфоріміджера, кумасі — гель, пофарбований кумасі); *в*: *1* — імунопреципітати з клітин з надекспресованою S6K1 дикого типу, *2* — імунопреципітати з клітин з надекспресованою S6K1 S17A мутантом (кількість білка контролювали за допомогою вестерн-блотингу з використанням анти-ЕЕ антитіл, права панель — результати денситометричного вимірювання активності СК2 по відношенню до S6K1))

су за допомогою анти-S6K1 антитіл та подальшого аналізу GST-CK2β-His із застосуванням анти-GST антитіл (рис. 1, *б*). Контролем у цьому експерименті виступали зразки, в яких тестували неспецифічне зв'язування GST-His із S6K1, а також зв'язування CK2β-GST та GST-His лише з протеїн А-носієм у присутності анти-S6K1 антитіл. Як видно з рис. 1, *б*, специфічний сигнал CK2β-GST виявлено лише в одному зразку в присутності S6K1 і CK2β. У негативних контролях неспецифічного зв'язування не спостерігали.

З огляду на специфічність утворюваного комплексу за допомогою програми ScanSite [16] було здійснено комп'ютерний аналіз первинної послідовності білків СК2 та S6K1 на присутність сайтів фосфорилювання одна для одної.

У результаті виявлено чотири потенційних сайти фосфорилювання для СК2 на S6K1, серед яких найімовірнішим є Ser17, а три інших (Ser 357, Ser 375 і Thr376) мають меншу вірогідність фосфорилювання.

Для підтвердження чи спростування результатів біоінформаційного аналізу щодо можливих сайтів фосфорилювання СК2 у S6K1 було досліджено *in vitro* фосфорилювання рекомбінантної S6K1-EE за участі СК2. Як видно з рис. 2, *а*, S6K1 є *in vitro* субстратом СК2.

Локалізацію сайта фосфорилювання S6K1 для СК2 визначали за допомогою N-кінцевого рекомбінантного пептиду S6K1, що відповідає першим 45 амінокислотним залишкам S6K1. У складі цього пептиду є два залишки Ser17/Ser30, де лише Ser17 знаходиться в межах мотиву фосфорилювання СК2. Як видно з рис. 2, *б*, N-кінцевий пептид S6K1 також є субстратом для СК2 *in vitro*.

Щоб остаточно підтвердити сайт фосфорилювання СК2 саме як Ser17 та виявити фізіологічну роль цього фосфорилювання у клітинах ссавців, здійснено сайт-спрямований мутагенез залишку Ser17, тобто замінено його на Ala, що унеможливлює фосфорилювання цієї амінокислоти.

Мутантну форму S6K1/S17Ala і S6K1 дикого типу, злиті з ЕЕ-міткою, транзієнтно надекспресували в клітинах ссавців лінії HEK293, імунопреципітували анти-ЕЕ антитілами та використовували як субстрат СК2 в *in vitro* кіназній реакції. Сигнали, отримані авторадіографічно, нормували по відношенню до кількості білка (S6K1) у реакційній суміші. З даних рис. 2, *б*, видно, що як S6K1 дикого типу, так і S6K1/Ser17Ala фосфорилюються СК2, однак очевидно, що мутант, у якого залишок Ser замінено на Ala, завдяки чому його фосфорилювання стало неможливим, є менш ефективним субстратом для СК2, аніж форма S6K1 дикого типу. Якщо ж нормалізувати рівень фосфорилювання до кількості білка в реакції, то, скоріш за все, заміна Ser17 на Ala призведе до зниження рівня фосфорилювання на 60 %, що підтверджує припущення про фосфорилювання Ser17 як найефективнішого сайта для СК2 *in vitro*, однак не єдиного, що узгоджується з даними, одержаними при використанні програми ScanSite.

Отримані результати є ще одним доказом ефективності підходу пошуку білково-білкових взаємодій методом двогібридної системи дріжджів. Вперше показано взаємодію S6K1 з вісьмома новими

білками, однак свою увагу ми зосередили на вивченні потенційного зв'язку між S6K1 і CK2, оскільки CK2 є вже охарактеризованим білком. Більше того, CK2, як і S6K1, залучена до регуляції таких фундаментальних процесів у клітині, як регуляція клітинного росту, біосинтезу рРНК, клітинного поділу, апоптозу. Саме вивчення такого зв'язку між CK2 і S6K1, можливо, дозволить краще зрозуміти, як відбувається регуляція цих фундаментальних процесів за участі S6K1. В цій роботі наведено результати, які підтверджують, що CK2β і S6K1 взаємодіють у клітинах дріжджів та *in vitro*. Крім того, з'ясовано значення такої взаємодії, а саме — фосфорилювання Ser17 S6K1 казеїнкіназою 2. На даний час проводяться експерименти для підтвердження взаємодії між S6K1/CK2 та фосфорилювання S6K1 *in vivo*.

Таким чином, методом двогібридної системи дріжджів ідентифіковано новий зв'язувальний партнер S6K1 — CK2, підтверджено взаємодію між цими двома кіназами *in vitro* та показано, що внаслідок взаємодії CK2 фосфорилює S6K1 по Ser17 в умовах реакції *in vitro*.

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

The beta subunit of casein kinase 2 as a novel binding partner of the ribosomal protein S6 kinase 1

Summary

Signaling pathways play a major role in regulation and coordination of many cellular processes. The kinases of 40S ribosomal subunit protein, S6K, S6K1 and S6K2, are an important player in signaling network. S6K belongs to and are regulated via PI3-kinase signaling pathway. It is known that S6K1 plays a key role in the regulation of mitogen activated protein biosynthesis facilitated by phosphorylation of ribosomal protein S6 that leads to the translation initiation of mRNA encoding components of the protein synthesis apparatus. Moreover, the participation of S6K1 in the regulation of cell cycle was found. Several protein kinases and phosphptases can use S6K as a substrate in vitro, but only for some of them the functional link to S6K has been demonstrated in vivo that is why molecular mechanisms of regulation of S6K activity in the cell remain unclear. Because of that it is very important to investigate protein targets of S6K in the cell, especially with the use of methodological approaches which would correspond to the conditions in vivo. The yeast-two hybrid system is a modern technique widely used in the world for the identification of protein-protein interactions in vivo. Using activated form of S6K1 as a bait, eight novel binding partners of S6K1 were identified. Among them the interaction between S6K1 and (regulatory subunit of casein kinase 2 has been discovered. Bioinformatic analysis of the primary structure of S6K1 and S6K2 has shown the presence of several potential CK2 phosphorylation sites, the Ser17 in S6K1 being the most preferential. Further studies have confirmed that S6K1 is phosphorylated at Ser17 by CK2 in the conditions of in vitro kinase reaction. The formation of S6K1/S6K2 beta complex has been proven in vitro as well.

Key worlds: S6K1, S6K2, Casein kinase 2 beta subunit, yeast two-hybrid system, phosphorylation.

А. Г. Панасюк, И. А. Немазаный, А. Н. Живолуп, В. В. Филоненко, И. Т. Гут

Бета-субъединица казеинкиназы 2 как новый связывающий партнер киназы 1 рибосомного белка S6

Резюме

Сигнальные пути клетки играют ведущую роль в регуляции и координации клеточных процессов. Семейство Ser/Thr протеинкиназ S6 белка 40S субчастицы рибосом (S6K1 и S6K2) — одно из важнейших регуляторных звеньев сигнальных путей, относящихся к PI3-киназа-зависимому сигнальному пути. Выявлено существенное значение S6K1 для регуляции биосинтеза белка, индуцированного митогенными стимулами вследствие фосфорилирования рибосомного белка S6. Также показана роль S6 киназы в регуляции клеточного цикла. Актуальными являются исследования белковых партнеров S6K в клетке, особенно с использованием методологических подходов, максимально отвечающих условиям in vivo. Двугибридная система дрожжей — это современный метод, широко применяемый для поиска белково-белковых взаимодействий. Используя в качестве байта активированную форму S6K1, скринированием кДНК-библиотеки клеток HeLa идентифицированы восемь новых S6K1-связывающих партнеров, среди которых β-субъединица казеинкиназы 2 (CK2). Биоинформационный компьютерный анализ первичной последовательности S6K1 выявил наличие нескольких потенциальных сайтов фосфорилирования для CK2, наиболее вероятным среди них является Ser17. Подтверждено фосфорилирование S6K1 по Ser17 рекомбинантной CK2 в условиях реакции in vitro. Также определено in vitro взаимодействие между рекомбинантными белками S6K1 и CK2β.

Ключевые слова: S6K1, S6K2, β-субъединица казеинкиназы 2, двугибридная система дрожжей, фосфорилирование.

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. *Brennan P., Babbage J. W., Thomas G., Cantrell D.* p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes // Mol. Cell. Biol.—1999.—19.—P. 4729—4738.
3. *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.
4. *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.—P. 573—583.
5. *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.—P. 4438—4442.
6. *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 path-

way, CoA biosynthesis and energy metabolism // FEBS Lett.—2004.—578.—P. 357—362.

7. *Zhyvoloup A., Nemazanyy I., Babich A., Panasyuk G., Pobigailo N., Vudmaska M., Naidenov V., Kukharenko O., Palchevskii S., Savinska L., Ovcharenko G., Verdier F., Valovka T., Fenton T., Rebholz H., Wang M. L., Shepherd P., Matsuka G., Filonenko V., Gout I. T.* Molecular cloning of CoA Synthase. The missing link in CoA biosynthesis // J. Biol. Chem.—2002.—277.—P. 22107—22110.
8. *Живолуп О. М., Немазаний І. О., Побігайло Н. В., Панасюк Г. Г., Пальчевський С. С., Кухаренко О. М., Савінська Л. О., Овчаренко Г. В., Вудмаска М. І., Гут І. Т., Мацука Г. Х., Філоненко В. В.* Використання дріжджової двогібридної системи для пошуку S6K1- та S6K2-зв'язувальних партнерів // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 2.—С. 102—109.
9. *Panasyuk G., Nemazanyy I., Filonenko V., Zhyvoloup A.* Large-scale yeast transformation in low-percentage agarose medium // Biotechniques.—2004.—36.—P. 44—47.
10. *Panasyuk G., Nemazanyy I., Ovcharenko G., Lyzogubov V., Gout I., Filonenko V.* Generation and characterization of monoclonal antibodies to protein kinase 2 (CK2) beta subunit // Hybridoma (Larchmt).—2005.—24.—P. 206—210.
11. *Savinska L. O., Lyzogubov V. V., Usenko V. S., Ovcharenko G. V., Gorbenko O. N., Rodnin M. V., Vudmaska M. I., Pogribniy P. V., Kyyamova R. G., Panasyuk G. G., Nemazanyy I. O., Malets M. S., Palchevskyy 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.
12. *Lawlor M. A., Mora A., Ashby P. R., Williams M. R., Murray-Tait V., Malone L., Prescott A. R., Lucocq J. M., Alessi D. R.* Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice // EMBO J.—2002.—21.—P. 3728—3738.
13. *Olsten M. E., Litchfield D. W.* Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2 // Biochem. Cell Biol.—2004.—82.—P. 681—693.
14. *Litchfield D. W.* Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death // Biochem. J.—2003.—369.—P. 1—15.
15. *Meggio F., Pinna L. A.* One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2β // FASEB J.—2003.—17.—P. 349—368.
16. *Obenauer J. C., Cantley L. C., Yaffe M. B.* Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs // Nucl. Acids Res.—2003.—31.—P. 3635—3641.

УДК 577.217;577.218; 57.052.6
Надійшла до редакції 14.06.05