

Експресія α - та β -ізоформ p70S6K у клітинних лініях та пухлинах молочної залози людини

Л. О. Савінська¹, В. С. Усенко², В. В. Лизогубов²,
П. В. Погрібний³, С. С. Пальчевський¹, Г. В. Овчаренко¹,
В. Г. Чешук⁴, І. Т. Гут^{1, 5}, Г. Х. Мацука¹, В. В. Філоненко¹

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

² Морфологічна лабораторія «БІОНТЕК»
Вул. Комсомольська, 52А/88, Дніпропетровськ, 49000, Україна

³ Інститут експериментальної онкології, патології і радіобіології НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

⁴ Національний медичний університет ім. акад. Богомольця МОЗ України
Бульвар Шевченка, 13, Київ, 01004, Україна

⁵ Інститут досліджень раку Людвіга
WIP SBT, Лондон, Райдинг Хаус стрит, 91

Одним з ключових ферментів активації синтезу білка у відповідь на мітогенні сигнали є p70 кінза S6 рибосомного білка, представлена в клітині двома ізоформами — p70S6K α та p70S6K β . Вперше проаналізовано експресію двох ізоформ p70S6K у ряді клітинних ліній, а також у злоякісних та доброякісних пухлинах молочної залози людини. Встановлено, що в усіх обстежених клітинних лініях раку молочної залози експресія як S6K α , так і S6K β підвищена. Спостерігалось значне зростання рівня експресії обох ізоформ кінзи в ракових пухлинах, що може свідчити про їхню участь у процесах злоякісної трансформації. Нами вперше виявлено надекспресію S6K α в доброякісних пухлинах молочної залози, рівень якої принципово не відрізнявся від такої в злоякісних пухлинах.

Вступ. Вищим організмам властивий координований контроль функціонування клітин. Відомо, що регуляторний ефект позаклітинних стимулів, залучених до контролю білкового синтезу, реалізується через фосфорилювання—дефосфорилювання ключових компонентів апарату трансляції (факторів ініціації, елонгації та білків рибосоми). Одним з таких компонентів є S6 білок малої субчастинки рибосоми. Специфічними кінзами, які фосфорилюють його по кількох сайтах, є дві ізоформи β серин-треонінової кінзи p70S6K — S6K α та S6KS6 [1—3]. На сьогоднішній день відомо також дві ізоформи S6K α — ядерна S6K α 1 (p85S6K α) та цитоплазматична S6K α 2 (p70S6K α), які кодуються

одним геном та є результатом альтернативного сплайсингу мРНК. Більшість літературних публікацій присвячено S6K α , оскільки дана ізоформа була клонувана більше 10 років тому, а S6K β — лише нещодавно [4, 5]. Активація S6K спричинює до підвищення експресії мРНК, які кодують компоненти апарату трансляції [6, 7]. Показано також роль цієї кінзи в регуляції клітинного циклу. Інактивація S6K α мікроін'єкцією нейтралізуючих антитіл чи інкубацією з імуносупресором рапаміцином супроводжується сповільненням переходу в S фазу чи зупинкою багатьох типів клітин у G1 фазі клітинного циклу. Зупинці клітинного циклу, зумовленій пригніченням S6K α , передують порушення процесів активації білкового синтезу та експресії c-fos білка. Виявлено також, що блокування активності S6K α в період G1 фази клітинного циклу має

© Л. О. САВІНСЬКА, В. С. УСЕНКО, В. В. ЛИЗОГУБОВ,
П. В. ПОГРІБНИЙ, С. С. ПАЛЬЧЕВСЬКИЙ, Г. В. ОВЧАРЕНКО,
В. Г. ЧЕШУК, І. Т. ГУТ, Г. Х. МАЦУКА, В. В. ФІЛОНЕНКО,
2003

сильний інгібіторний ефект на синтез ДНК у клітині [8—11].

Генетичне конструювання організмів, дефектних за геном S6K, показало, що відсутність експресії S6 кіназ (dS6K) у дрозофіли спричинює затримку її фізіологічного розвитку та впливає на розміри органів цих комах [12]. У мишей з гомозиготним дефектом гена, який кодує S6K α , також спостерігали пригнічення росту, особливо в період ембріонального розвитку [13], та зменшення генетично детермінованого розміру β -клітин підшлункової залози [14].

Дослідження останніх років дозволяють припустити суттєву роль p70S6K у регуляції реорганізації цитоскелета та потенційну — в клітинній міграції [15, 16]. При вивченні утворення тромбін-індукованих стресових волокон у клітинах Swiss 3T3 показано, по-перше, що p70S6K колокалізована з активними волокнами цитоскелета, з чого можна зробити висновок, стосовно важливої ролі p70S6K в полімеризації актину і, по-друге, що індукована тромбіном організація та елонгація волокон напруження пригнічується оброблянням рапаміцином [17].

S6K впливає не лише на ріст та проліферацію клітини через свій канонічний субстрат — рибосомний білок S6, але й на молекулярні механізми регуляції апоптозу. Показано, що S6K α відповідає за сайт-специфічне фосфорилування та інактивацію проапоптотичної молекули BAD [18].

Поряд з цим існують дані, які вказують на зв'язок S6 кіназного сигнального шляху з процесами злоякісної трансформації клітини [19]. Дослідження генетичних порушень у карциномах молочної залози виявили ампліфікацію гена, який кодує S6K α і розташований в 17q22—24 хромосомній ділянці, а саме — в ділянці 17q23. Важливо також зазначити, що ампліфікація генів згаданої хромосомної ділянки є характерною особливістю онкологічних захворювань даного типу. Таким чином, активується низка онкогенів, серед яких: *HER-2* (17q12), *c-MYC* (8q24), *PRAD1/CYCLIND* (11q13), *FGFR-1* (8p12), *FGFR-2* (10q24). Найчастіше вражається довге плече 17-ї хромосоми, зокрема, ампліфікуються ділянки в q21 та q22—24. Серед ділянок, проаналізованих методом генної гібридизації, хромосомна ділянка 17q23 була ампліфікованою в 20 % первинних пухлин молочної залози, в 50 % пухлин з *BRCA1*-мутаціями і у 87 % пухлин з *BRCA2*-мутаціями [19]. Показано, що п'ять або більше копій гена *p70S6K* (S6K α) представлені в геномі 7,5 % первинних пухлин карциноми молочної залози, в той час як підвищений рівень (2,5-кратне перевищення контролю)

мРНК спостерігався у 38 % пухлин. При цьому не виявлено кореляції між рівнем ампліфікації чи надекспресії для всіх досліджуваних у цій роботі генів зазначеної хромосомної ділянки та стадією обстеженої пухлини. Спільною рисою, характерною для досліджених генів, була також наявність ампліфікації за відсутності надекспресії або, навпаки, наявність надекспресії при відсутності ампліфікації [20].

В результаті детального порівняльного аналізу S6K α та S6K β ми дійшли висновку, що поряд з дуже високим ступенем гомології на рівні первинної структури між цими ізоформами S6K існують суттєві відмінності [1, 24]. Вони стосуються в першу чергу механізмів регуляції активності кіназ у клітині та безпосередньо регуляції трансляції. Беручи до уваги вищевикладене, метою представленої роботи було порівняння рівнів експресії p70S6K β і S6K α в клітинних лініях раку молочної залози та пухлинах молочної залози.

Матеріали і методи. Післяопераційні зразки тканин молочної залози люб'язно надано нам співробітниками кафедри онкології Національного медичного університету ім. акад. Богомольця МОЗ України. Для досліджень відбирали пухлини аденокарциноми молочної залози та прилеглі позапухлинні тканини пацієнтів, які попередньо не зазнавали дії променевої та хімічної терапії. Матеріал добирали від хворих на I та II стадіях перебігу хвороби. Переважна більшість доброякісних пухлин видалювалася на стадії швидкого росту. При секторальній резекції відбирали також ділянки нормальних навколопухлинних тканин, які використовували в дослідженнях як умовну норму. Діагнози верифікували гістологічно у патоморфологічній лабораторії. Досліджували 16 злоякісних пухлин (аденокарциноми), 17 доброякісних (15 фіброаденом, 2 кісти) та 15 зразків тканин, що оточували злоякісні та доброякісні пухлини (5 та 10 зразків відповідно).

Приготування лізатів клітин та тканин. Клітини вирощували до стану моношару. Далі видалляли культуральне середовище, клітини промивали забуференим фосфатним розчином (PBS), заморожували та зберігали при температурі -70 °C. Клітинні білки екстрагували (4 °C) у лізуючому буфері, який містив 10 мМ трис-НСl, рН 7,6, 50 мМ NaCl, 1 мМ PMSF (фенілметилсульфонілфторид), 2 мкг/мл апротиніну, 5 мМ бензамідину та суміш інгібіторів протеаз фірми «Boehringer Mannheim» (Німеччина).

Зразки нормальних та пухлинних тканин заморожували в рідкому азоті та зберігали при температурі -70 °C. Гомогенати отримували механіч-

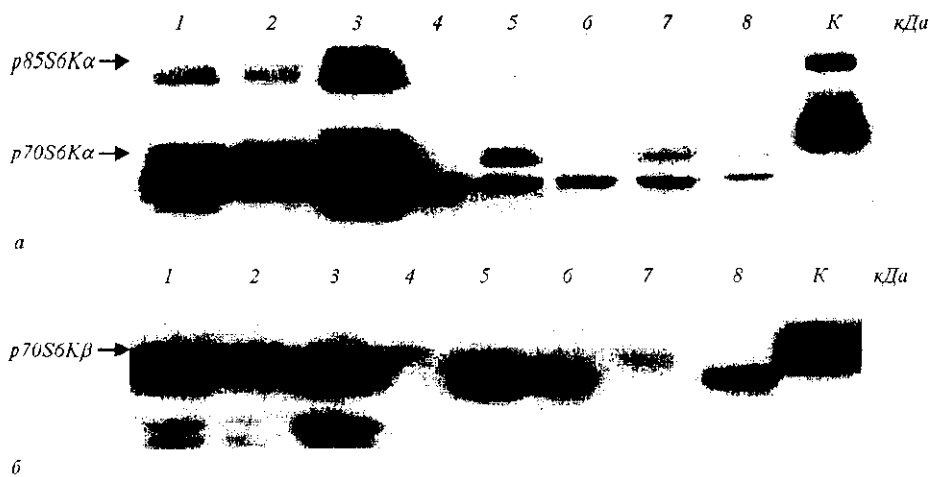


Рис. 1. Імуноблот-аналіз лізатів клітинних ліній: 1 — C36; 2 — C52; 3 — MCF-7; 4 — B16F1; 5 — MDCK; 6 — Jurkat; 7 — U937; 8 — COLO 320; K — рекомбінантний білок (контроль) з антитілами проти С-кінцевого фрагмента p70S6Kα (а); і С-кінцевого фрагмента p70S6Kβ (б)

ним розтиранням тканин у керамічній ступці в рідкому азоті з наступним додаванням лізуючого буферу та набору інгібіторів протеаз. Отримані клітинні та тканинні лізати центрифугували при 13000 g (4 °C) протягом 30 хв. У супернатанті визначали концентрацію білка за методом Бредфорда [25]. Для електрофоретичного розділення в ПААГ використовували 30 мкг білка з кожного лізату.

Імунохімічне скринування клітинних та тканинних екстрактів. Імунохімічний аналіз отриманих лізатів на вміст S6Kα та S6Kβ проводили методом Вестерн-блотингу згідно з методичними рекомендаціями [22]. Для цього білки розділяли одновимірним електрофорезом у градієнті концентрації ПААГ (6—15 %) за методом Лемлі [23] з деякими модифікаціями: для кращого розходження білків з великою молекулярною масою величина рН розділювального геля була 8,4. Після цього проводили електроперенос білків на PVDF-мембрану протягом 1 год при силі струму 250 мА в буферному розчині, що містив 39 мМ гліцин, 48 мМ трис, 0,03 % SDS та 20 % метанолу, використовуючи прилад для напівсухого переносу фірми «Bio-Rad» (США). PVDF-мембрану відмивали протягом 5 хв в TBS буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,6, 150 мМ NaCl) та блокували сайти неспецифічної сорбції протягом 1 год у TBS, що містив 5 % сухого знежиреного молока та 0,1 % твін-20. Імуноблот-аналіз S6Kα і S6Kβ здійснювали за допомогою поліклональних антитіл кроля до С-кінцевих фрагментів відповідних кіназ, які були отримані, очищені та тестовані нами раніше [24]. Незважаючи на високий рівень гомології цих кіназ, антитіла демонстрували специфічність лише до своєї ізоформи антигену та були використані нами

для визначення відносного рівня експресії S6Kα і S6Kβ у нормальних тканинах щура [24]. Як вторинні антитіла використовували антитіла кози до антитіл кроля, кон'юговані з пероксидазою хрому фірми «Promega» (США). Блоти проявляли за допомогою реакції хемілюмінесценції з використанням набору ECL фірми «Amersham» (Велика Британія).

Результати і обговорення. Однією з причин злоякісної трансформації клітини вважається порушення передачі позаклітинних стимулів, у першу чергу мітогенних, від клітинної мембрани до відповідних компартментів клітини. Це обумовлено насамперед змінами в експресії і активності компонентів сигнальних шляхів, а саме — клітинних рецепторів, кіназ і фосфатаз.

В даній роботі ми порівняли рівні експресії p70S6Kα та β в нормальних та пухлинних тканинах молочної залози людини (аденома та аденокарцинома). Попередні експерименти засвідчили надзвичайно високий рівень p70S6Kα в клітинах MCF7 та BT474 [19, 25]. Нами було перевірено декілька клітинних ліній на наявність експресії обох ізоформ p70S6K, а саме: C36, C52, MCF7 — клітини карциноми молочної залози; B16F1 — меланомні клітини миші; MDCK (NBL-2) — епітеліоїдні клітини собачої нирки (Madin-Darby Canine kidney); Jurkat — клітини людської лімфоцитарної Т-клітинної лейкемії; U937 (human Caucasian histiocytic lymphoma) — міелоцитарні клітини дифузної гістіоцитарної лімфоми людини; COLO320 — клітини аденокарциноми товстої кишки людини.

Як свідчать результати імуноблотингу (рис. 1, а), надекспресія обох ізоформ S6Kα (p70S6Kα і p85S6Kα) спостерігалася в лініях клітин C36, C52 та MCF7 раку молочної залози, дещо нижчий

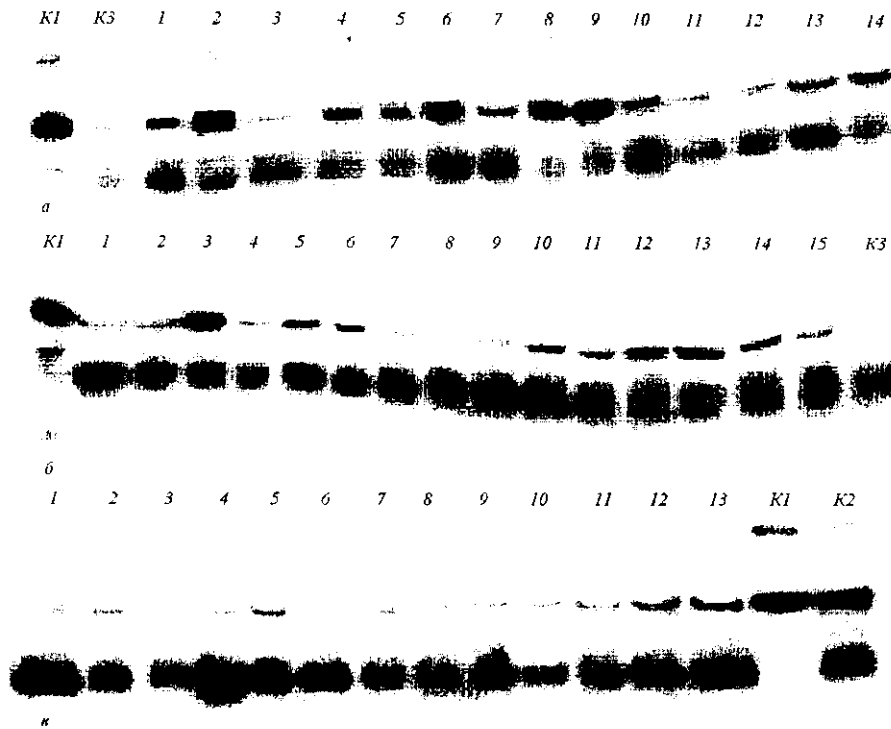


Рис. 2. Експресія p70S6K α в тканинах молочної залози людини: *a* — в злоякісних пухлинах; *b* — в доброякісних пухлинах; *в* — в умовно нормальних тканинах, що оточували доброякісні (доріжки 1—8) та злоякісні (доріжки 9—13) пухлини; K1 — позитивний контроль (лізат клітин лінії MCF-7); K2 — позитивний контроль (лізат сім'яників щура); K3 — норма (екстракт умовно нормальної тканини, що оточувала доброякісну пухлину) (*в*, доріжка 7). Стрілками вказано p70S6K α

рівень експресії — в лінії MDCK епітеліоїдних клітин собачої нирки. Найвищий рівень експресії S6K β детектовано в лініях C36, C52, MCF7 та MDCK (надекспресія), трохи нижчий — в лінії клітин Jurkat T-клітинної лейкемії людини. З цього випливає, що в клітинних лініях раку молочної залози поряд з надекспресією p70S6K α [19, 25] відбувається і надекспресія S6K β . Оскільки вже встановлено, що ампліфікація гена S6K α і підвищений рівень експресії S6 кінази в клітинах властиві не лише клітинним лініям, а й злоякісним пухлинам, нами проведено порівняльний аналіз експресії p70S6K α і β в пухлинних тканинах молочної залози.

Як позитивний контроль відносного рівня експресії S6K α використовували тканини сім'яників щура, які, за попередніми даними, вирізняються досить високим вмістом даної ізоформи [24], а також клітинну лінію MCF7. Для порівняння рівня експресії S6K β позитивним контролем слугували екстракти клітин лінії MCF7, а також клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293, трансфікованої вектором *pcDNA3.1/p70S6K β* , який містить ген повнорозмірної форми p70S6K β .

Результати імуноблот-аналізу екстрактів тканин, які оточували злоякісні та доброякісні пухлини молочної залози (умовно нормальні), свідчать

про те, що базальний рівень експресії S6K α є досить низьким: дещо вищим у зразках лізатів навколопухлинних тканин аденокарцином та зовсім незначним у навколопухлинних тканинах доброякісних пухлин (рис. 2, *в*; рис. 3, *в*). Стосовно S6K β , то, як видно з рис. 3, *в*, чутливість методу при такому навантаженні доріжки тотальним білком, обраному для всіх екстрактів нормальних та патологічно змінених тканин, не дала можливості виявити експресію S6K β в жодному з представлених зразків. Це узгоджується з отриманими нами раніше даними щодо рівня експресії S6K β у нормальних тканинах щура, який майже вдвічі нижчий за відповідний рівень S6K α .

Для візуальної оцінки відносного рівня експресії S6K α та S6K β у пухлинних тканинах та порівняння його з базальним рівнем поряд зі стандартним позитивним контролем — лізатами надекспресуючих зразків (MCF7, сім'яники щура, трансфектна лінія HEK293/S6K β) — брали один зразок умовно нормальної тканини, що демонстрував приблизно середній базальний рівень експресії S6K α та S6K β (K3 на рис. 1, *a*, 2, *a*; 1, *б*, 2, *б*; зразок № 9 на рис. 1, *в*, та 2, *в*, відповідно).

Аналіз результатів Вестерн-блотингу показав, що в доброякісних пухлинах (рис. 2, *a*, *б*) характер

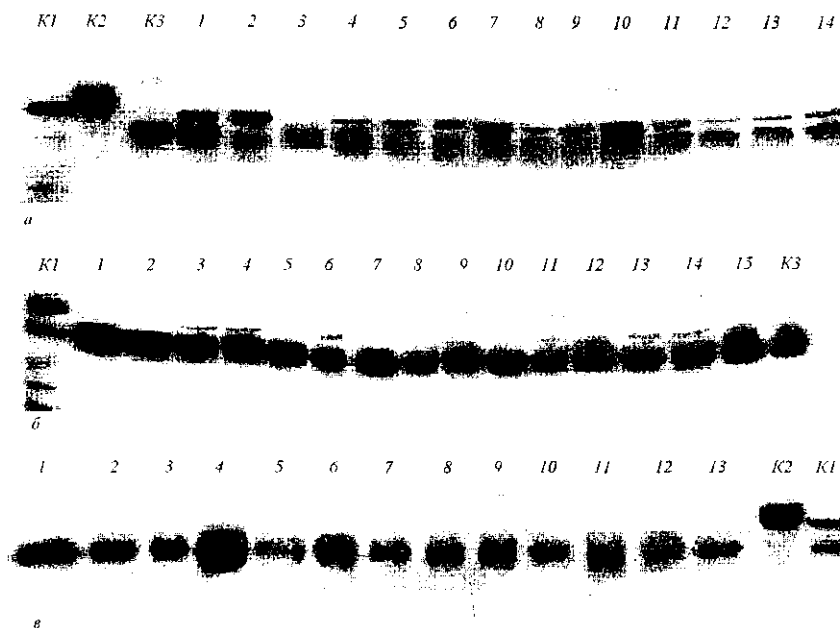


Рис. 3. Експресія р70S6K β в тканинах молочної залози людини: а — в злоякісних пухлинах; б — в доброякісних пухлинах; в — в умовно нормальних тканинах, що оточували доброякісні (доріжки 1—8) та злоякісні (доріжки 9—13) пухлини; K1 — позитивний контроль (лізат клітин лінії MCF-7); K2 — позитивний контроль (лізат клітин лінії HEK293, трансфікованої плазмідною рсDNA 3.1/p70S6 β); K3 — норма (екстракт умовно нормальної тканини, що оточувала доброякісну пухлину) (в, доріжка 7). Стрілками вказано р70S6K β

експресії обох ізоформ дещо відрізнявся від такого при раку (рис. 1, а, б). Так, у доброякісних пухлинах S6K α (рис. 2, а) була надекспресована в семи випадках (доріжки 3, 5, 6, 10, 12—14), ще в семи зразках була помітно підвищеною і лише в одному зразку (доріжка 8) — на рівні норми. І це не дивно, зважаючи на той факт, що здебільшого ми обстежували надані нам зразки фіброаденомних пухлин, які видаляли у хворих при досить швидкому рості. Експресія S6K β у доброякісних пухлинах (рис. 2, б) була загалом відчутно нижчою, ніж у злоякісних (рис. 1, б). При стандартному навантаженні ПААГ (30 г білка на доріжку) сигнали були на рівні фону. При 1,5-кратному збільшенні навантаження експресія S6K β відзначалася слабким сигналом у шести зразках (доріжки 3—5, 8, 15, 16) на фоні практичної відсутності сигналу в зразку умовної норми K3 (рис. 2, б). Кількісна кореляція між рівнем експресії S6K α та β була неповною. Таким чином, у доброякісних пухлинах, які швидко ростуть, спостерігається значне підвищення рівня експресії S6K α (до 75 % обстежених зразків).

При злоякісній трансформації клітини пухлин експресують обидві ізоформи р70S6K на досить високому рівні: з 14 зразків лише в трьох (доріжки 3, 13, 14) експресія S6K α була на рівні норми, ще в трьох зразках вона була дещо підвищеною, а у вісьмох зразках (доріжки 2, 4, 6—10, 14) — значно вищою (рис. 1, а). Стосовно S6K β , то, зважаючи на практичну відсутність сигналу в нормі, лише в одному зразку експресії не спостерігалось (доріжки

3), в двох вона була дещо підвищеною (доріжки 8, 12), а в 11 зразках — значно вищою (рис. 2, а). До того ж не було чіткої кількісної кореляції в рівнях експресії α та β ізоформ. З аналізу отриманих результатів випливає, що при злоякісних новоутвореннях у пухлинних тканинах часто (до 75 % обстежених випадків) спостерігається підвищення рівня експресії S6K α та зростання (з меншою амплітудою, близько 80 % випадків) рівня експресії S6K β . Цей факт може свідчити про важливу роль обох ізоформ S6K у процесах злоякісної трансформації.

Порівняння загальної картини експресії двох ізоформ S6K в обох типах обстежених пухлин показало, що біля 75 % як злоякісних, так і доброякісних пухлин надекспресують S6K α . Стосовно S6K β , то припущення щодо загальнопоширеності її експресії в тканинах аденокарциноми (на відміну від доброякісних пухлин) має бути підтверджено імуногістохімічними методами.

В нещодавно опублікованій роботі [26] методом фосфорилування *in vitro* білка S6 сумарною фракцією імунопреципітованої кінази р70S6 α з лізатів нормальних тканин та тканин аденокарциноми молочної залози показано, що, незважаючи на значне збільшення в зразках пухлин кількості експресованої S6K α , рівень її активності лишається майже незмінним, тобто ступінь питомого фосфорилування зменшується.

Раніше було встановлено, що при мітогенній стимуляції клітин сироваткою максимальна акти-

вація S6K β спостерігається вже на 10-й хв інкубації, тоді як максимум активності S6K α припадає на 20-ту хв та збігається з піком інактивації S6K β . Це може свідчити про здатність S6K β забезпечувати ранню відповідь клітини на мітогенний стимул, а S6K α , очевидно, відповідає за пізнішу стадію фосфорилування S6 білка і, не виключено, процесу біосинтезу білка в цілому [1]. Отримані нами результати наводять на думку, що при злоякісній трансформації клітин у тканинах, на відміну від клітинних ліній, роль S6K α може перебирати на себе інша ізоформа — S6K β , але в якій мірі та чому, ще належить з'ясувати. Однак потрібно взяти до уваги, що функції як S6K α , так і S6K β остаточно не з'ясовані, оскільки вже на сьогодні відомо, що S6K α залучена не лише до регуляції трансляції відповідних мРНК, а й до регуляції клітинного циклу та механізмів апоптозу. Можна припустити, що канонічна функція p70S6K — регуляція трансляції мРНК при злоякісній трансформації — здійснюється альтернативними шляхами, можливо, через порушення механізмів регуляції апоптозу.

Таким чином, ґрунтуючись на отриманих результатах, можна зробити наступні висновки.

Нами встановлено, що в усіх досліджених клітинних лініях та тканинах злоякісних пухлин молочної залози спостерігається надекспресія обох ізоформ p70 S6K.

Наші дані стосовно S6K α дещо відрізняються від літературних. Якщо раніше повідомлялося, що за даними RT-PCR п'ятиразове збільшення експресії мРНК S6K α виявлене в 9,68 % первинних злоякісних пухлин молочної залози, а 2,5-кратне — в 38 % пухлин, то, за нашими даними, це близько 75 % як для S6K α , так і для S6K β . Окрім різної ефективності трансляції в кожному індивідуальному випадку та відсутності чіткої кореляції рівнів експресії мРНК і білка, виявлених нами раніше для S6K α та S6K β у деяких тканинах ссавців [24], причиною цього може бути гетерогенність пухлинних тканин молочної залози. Саме тому, як видно з ілюстрацій, рівень експресії в різних зразках значно відрізняється. Цілком можливо, що в усіх пухлинних тканинах є окремі популяції клітин, які надекспресують p70S6K, проте відповідь на це може дати лише детальний імуногістохімічний аналіз зразків доброякісних та злоякісних пухлин молочної залози.

Нами вперше виявлено надекспресію S6K α в доброякісних пухлинах молочної залози, рівень якої принципово не відрізнявся від такої в злоякісних пухлинах.

Роботу частково профінансовано грантом Велкам Траст (Wellcome Trust).

L. A. Savinskaya, V. S. Usenko, V. V. Lyzogubov, P. V. Pogrebnoy, S. S. Pal'chevsky, G. V. Ovcharenko, V. S. Cheshuk, I. T. Gout, G. Kh. Matsuka, V. V. Filonenko

P70S6 kinase α and β isoforms expression in cell lines and breast tumors

Summary

P70 kinase of S6 ribosomal protein represented by α and β isoforms is among the key enzymes participating in the protein synthesis activation mediated by mitogenic signals. The expression of two p70S6 kinase isoforms in several cell lines as well as in malignant and non-malignant breast tumors was analyzed. The expression of both p70S6 kinase forms increased in all breast tumor cell lines examined. The enhanced synthesis of α and β isoforms in malignant tumors may reflect their important role in cancerogenesis. The increased levels of S6K α expression comparable in malignant and non-malignant tumors have been shown for the first time.

Л. А. Савинская, В. С. Усенко, В. В. Лизогубов, П. В. Погребный, С. С. Пальчевский, Г. В. Овчаренко, В. Е. Чешук, И. Т. Гут, Г. Х. Мацука, В. В. Филоненко

Экспрессия α - и β -изоформ p70S6K в клеточных линиях и опухолях молочной железы человека

Резюме

Одним из ключевых ферментов активации синтеза белка в ответ на митогенные сигналы является p70 киназа S6 рибосомного белка, представленная в клетке двумя изоформами — p70S6K α и p70S6K β . Впервые проанализирована экспрессия двух изоформ p70S6K в ряде клеточных линий, а также в злокачественных и доброкачественных опухолях молочной железы человека. Установлено, что во всех обследованных клеточных линиях рака молочной железы экспрессия как S6K α , так и S6K β увеличена. Отмечено значительное повышение уровня экспрессии обеих изоформ киназы в раковых опухолях, что может свидетельствовать об их участии в процессах злокачественной трансформации. Нами впервые выявлен повышенный уровень экспрессии S6K α в доброкачественных опухолях молочной железы, который существенно не отличался от такового в злокачественных.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вальовка Т. Й., Филоненко В. В., Пальчевський С. С., Великий М. М., Дробот Л. Б., Вотерфільд М., Мацука Г. Х., Гут І. Т. Функціональні та регуляторні особливості кінрази рибосомного білка S6 типу β // Біополімери і клетка.—1999.—15, № 5.—С. 1—7.
2. Kozma S. C., Ferrari S., Bassand P., Siegmann M., Totty N., Thomas G. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.—P. 7365—7369.
3. Brown E. J., Schreiber S. L. A signaling pathway to translation control // Cell.—1996.—N 86.—P. 517—520.
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, p70S6 kinase β containing a proline-rich region // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 30061—30064.
5. Lee-Fruman K., Kuo C., Lippincott J., Terada N., Blenus J.

- Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1 // *Oncogene*.—1999.—18.—P. 5108—5114.
6. *Jefferies H. B., Thomas G.* Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction // *Translational control* / Eds J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, N. Sonenberg.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1996.—P. 389—409.
 7. *Jefferies H. B., Reinhard C., Kozma S. C., Thomas G.* Rapamycin selectively repress translation of the 'polypyrimidine tract' mRNA family // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1994.—91.—P. 4441—4445.
 8. *Lane H. A., Fernandez A., Lamb N. J. C., Thomas G.* p70^{S6K} function is essential for G1 progression // *Nature*.—1993.—363.—P. 170—172.
 9. *Kozma S. C., Ferrari S., Thomas G.* Unmasking a growth factor/oncogene-activated S6 phosphorylation cascade // *Cell Signalling*.—1989.—1, N 3.—P. 219—225.
 10. *Simm A., Hoppe V., Karbach D., Leicht M., Fenn A., Hoppe J.* Late signals from the PDGF receptors leading to the activation of the p70S6-kinase are necessary for the transition from G1 to S phase in AKR-2B cells // *Exp. Cell Res.*—1998.—244, N 2.—P. 379—393.
 11. *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, N 7.—P. 4729—4738.
 12. *Shima H., Pende M., Chen Y., Fumagalli S., Thomas G., Kozma S. C.* Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase // *EMBO J.*—1998.—17, N 22.—P. 6649—6659.
 13. *Kawasome H., Papst P., Webb S., Keller G. M., Johnson G. L., Gelfand E. W., Terada N.* Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—95, N 9.—P. 5033—5038.
 14. *Pende M., Kozma S. C., Jaguet M., Oorschot V., Burcelin R., Le Marchand-Brustel Y., Klumperman J., Thorens B., Thomas G.* Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice // *Nature*.—2000.—408.—P. 994—997.
 15. *Berven L. A., Frew I. J., Crouch M. F.* Nitric oxide donors selectively potentiate thrombin-stimulated p70 (S6k) activity and morphological changes in Swiss 3T3 cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1999.—266.—P. 352—360.
 16. *Berven L. A., Crouch M. F.* Cellular function of p70S6K: A role in regulating cell motility // *Immunol. and Cell Biol.*—2000.—78.—P. 447—451.
 17. *Crouch M. F.* Regulation of thrombin-induced stress fibre formation in Swiss 3T3 cells by the 70-kDa S6 kinase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1997.—233.—P. 193—199.
 18. *Harada H., Andersen J. S., Mann M., Terada N., Kosmeyer S. J.* p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2001.—98.—P. 9666—9670.
 19. *Couch F. J., Wang X.-Y., Wu C.-J., Qian J., Jenkins R. B., James C. D.* Localization of P70S6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer // *Cancer Res.*—1999.—59, N 7.—P. 1408—1411.
 20. *Wu G. J., Sinclair C. S., Wadly R., Sayed M., Pelech S. J.* p70S6 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K and SIGMA1B genes // *Cancer Res.*—2000.—60.—P. 5371—5375.
 21. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry binding // *Analyt. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
 22. *Ausubel L. J., Krieger J. I., Hafler D. A.* Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myeline basic protein peptide 85—99 // *J. Immunol.*—1997.—159, N 5.—P. 2502—2512.
 23. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227, N 259.—P. 680—685.
 24. *Савінська Л. О., Киямова Р. Г., Погребний П. В., Овчаренко Г. В., Гут І. Т., Філоненко В. В.* Порівняльна характеристика експресії α та β ізоформ S6 кинази в тканинах ссавців // *Біополімери і клітина*.—2001.—17, № 5.—P. 374—379.
 25. *Погребной П. В., Кухаренко А. П., Тихонкова И. А., Пальчевский С. С., Савинская Л. А., Погребная А. П., Валевка Т. И., Маркеева Н. В., Солдаткина М. А., Мацука Г. Х., Гут И. Т., Филоненко В. В.* Получение и характеристика моноклональных антител против P70S6-киназы α // *Эксперим. онкология*.—1999.—21.—P. 232—238.
 26. *Salh B., Marotta A., Paape J., Ingle J. N., Roche P. C., James C. D., Couch F. J.* Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer // *Int. J. Cancer*.—2002.—98.—P. 148—154

УДК 577.218

Підійшла до редакції 17.01.02