

Порівняльна характеристика експресії α та β ізоформ S6 кінази в тканинах ссавців

Л. О. Савінська¹, Р. Г. Киямова¹, П. В. Погребний², Г. В. Овчаренко¹,
І. Т. Гут^{1, 3}, В. В. Філоненко¹

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

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

³ Інститут досліджень раку Людвіга
WIP SBT, Лондон, Райдинг Хаус стрит, 91

Проаналізовано експресію α - та β -ізоформ кінази S6 рибосомного білка в різних тканинах щура. Виявлено, що експресія ізоформ кінази має чіткий тканинспецифічний характер, при якому загальний рівень експресії S6K α є дещо вищим у порівнянні з S6K β . Встановлено, що найвищі рівні експресії для α -ізоформи S6 кінази спостерігаються в мозку, а для β -ізоформи — в гонадах. При порівнянні з результатами аналізу експресії мРНК обох форм S6 кінази виявлено кореляцію з експресією S6K на білковому рівні лише в деяких випадках, що свідчить про різну ефективність трансляції мРНК даного ферменту в залежності від виду тканини.

Вступ. Процеси клітинної проліферації та злоякісної трансформації привертають увагу дослідників уже досить тривалий час. Ініціація трансляції як одна з основних регуляторних ланок білкового синтезу регулюється фосфорилуванням/дефосфорилуванням ключових компонентів апарату трансляції [1]. Одним з цих компонентів є S6 білок 40S субчастинки рибосом, фосфорилування якого зростає у відповідь на мітогенні стимули. Сигнальні шляхи, які ведуть до фосфорилування S6 білка, забезпечують ефективну диференційну трансляцію мРНК, які містять поліпиримідинову послідовність на 5'-кінці в області, що не транскрибується і викликає значне (2—3 разове) підвищення рівня білкового синтезу [3, 4]. Цей клас мРНК кодує значну кількість компонентів білоксинтезуючого апарату клітини, включаючи мРНК рибосомних білків та факторів елонгації (eEF-1 та eEF-2), і може складати до 20 % від загального вмісту мРНК у клітині. На сьогоднішній день отримано переконливі докази на користь того, що Ser/Thr-специфічне фосфорилування S6 білка *in vivo* опо-

середковується кіназою S6K [3, 5—8]. Сімейство S6 кіназ включає дві ізоформи — S6 α і β . Кожна з них представлена цитоплазматичною (α II, β II) і ядерною (α I, β I) формами, які є продуктами альтернативного сплайсингу. Вивчення ролі S6K у сигнальних шляхах проводилося в основному з використанням S6K α , оскільки дану ізоформу було клоновано більш ніж 10 років тому, а S6K β — лише недавно [9].

Нокаут-експерименти на мишах і дрозофілах показали, що S6K α є важливою для регуляції росту і проліферації [10, 11]. Роль ядерної форми S6K α в опосередкуванні G^{1/S}-переходу клітинного циклу було показано в дослідях з мікроін'єкції специфічних нейтралізуючих антитіл [5, 12—14]. У структурі S6K α , як і в S6K β , розрізняють N- та C-кінцеві некаталітичні ділянки, каталітичний домен, подовження каталітичного домену та аутоінгібіторний домен (рис. 1). Поряд з високою консервативністю амінокислотних послідовностей S6K α та S6K β впродовж каталітичного (83 %), регуляторного (80 %) та аутоінгібіторного (73 %) доменів їхні N- та C-кінцеві послідовності характеризуються відносно низьким рівнем гомології — 28 і 25 % відповідно [15].

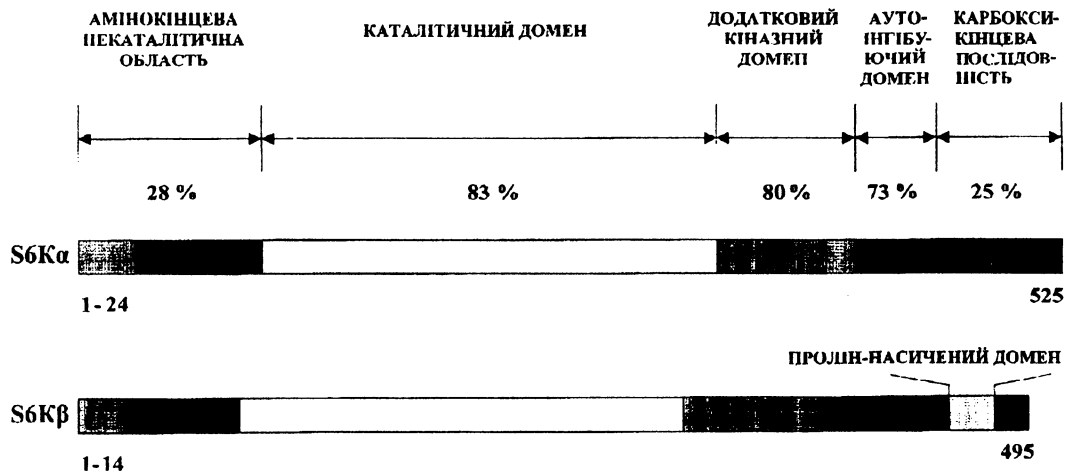


Рис. 1. Схематична порівняльна структура S6K α та S6K β кінази людини. В процентах вказано рівень гомології різних доменів S6K α та S6K β кіназ. S6K α та S6K β починаються з 24 та 14 амінокислотних залишків відповідно

Встановлено, що активація S6K α здійснюється шляхом множинного фосфорилування по трьох кластерах регуляторних центрів у відповідь на стимуляцію клітин ростовими факторами, гормонами, цитокінами [9, 16—20]. У первинній структурі S6K β дані регуляторні центри фосфорилування є консервативними, за винятком одного, що відповідає Thr444 у S6K α . Крім цього, унікальною структурною детермінантою С-кінцевої області S6K β є наявність Pro-багатої ділянки, яка може бути залучена до взаємодії з сигнальними білками, що містять SH3-домени (Src-гомологічні домени типу 3) [9]. Для S6K α характерна наявність специфічного мотиву на С-кінці, який здатний зв'язувати PDZ домен [21]. Обидві кінази фосфорилують S6 білок *in vitro* та *in vivo*, але в значній мірі відрізняються чутливістю до інгібіторної дії рапаміцину і вортманіну [15, 22].

Виходячи з вищезгаданих структурних і функціональних особливостей, можна припустити існування як спільних, так і специфічних механізмів регуляції активності S6 кіназ. Специфіка експресії S6K у різних органах і тканинах може також визначати шляхи регуляції їхньої активності. Тому метою даної роботи було вивчення експресії цитоплазматичної і ядерної форм S6K α та β в нормальних органах ссавців.

Матеріали і методи. Конструювання плазмід та експресія С-кінцевих фрагментів кіназ S6K α та S6K β . Клонування та експресія С-кінцевого фрагмента S6K α в бактеріальній системі детально описано раніше [23]. С-кінцевий фрагмент S6K β , який кодує амінокислотну послідовність 442—495,

ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Як сенсовий праймер було використано олігонуклеотидну послідовність AT-TCCATGGAGCACCACCACCACCACCTTTGA GGGGTTTGGGCCAGC, яка містить сайт рестрикції ендонуклеази *NcoI* і безпосередньо за ініціюючим метіоном має послідовність, що кодує шість гістидинів. 3'-Кінцевий праймер CGGGAA-TTCCTAGCGCCCTGGACGCCACG містив сайт упізнавання рестриктази *EcoRI*. Як матрицю використовували повнорозмірну кДНК S6K β людини, клоновану у векторі pcDNA3,1 («Invitrogen», США) раніше [9].

Подальші операції з експресії та афінного очищення С-кінцевого пептиду кінази S6K β з лізатів бактеріальних клітин проводили так само, як описано раніше для С-кінцевого пептиду кінази S6K α [23].

Отримання поліклональних антитіл до С-кінцевих пептидів S6K α та S6K β та їхнє очищення. Для імунізації використовували самців кролів вагою 2—3 кг, яким вводили очищені препарати афінно очищених рекомбінантних С-кінцевих пептидів S6K α та S6K β у повному ад'юванті Фрейнда — шість підшкірних ін'єкцій вздовж хребта по 15—20 мкг на ін'єкцію. Через 8 тижнів робили повторну імунізацію такою ж кількістю антигена в неповному ад'юванті Фрейнда. Втретє кролів імунізували через 4 тижні — 200 мкг препарату в ЗФР (забуферений фізіологічний розчин) кожному. На восьмий день після третьої імунізації сироватку крові кролів перевіряли на вміст специфічних антитіл. Титр сироватки визначали за методом ELI-

SA. Фракцію імуноглобулінів з сироватки отримували трикратним висолюванням насиченим розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 1,35 М. Після розчинення осаду і діалізу проти ЗФР антитіла чистили на ДЕАЕ-целюлозі, урівноваженій ЗФР, яка за таких умов не зв'язує імуноглобулінів. Останній етап очищення поліклональних антитіл проти рекомбінантних С-кінцевих пептидів S6K α та S6K β — афінна хроматографія на 4В сефарозі, кон'югованій з відповідними рекомбінантними пептидами, згідно з протоколом фірми «Amersham Pharmacia Biotech» (Швеція).

Приготування лізатів тканин. Експресію S6K α та S6K β ізоформ у нормальних тканинах ссавців аналізували на молодих статевозрілих щурах віком від 2,5 до 4 місяців. Після декапітації тварин щойно отримані органи заморожували в рідкому азоті та зберігали при температурі -70°C . Гомогенати тканин отримували механічним розтиранням у гомогенізаторі Поттера при 4°C з додаванням лізуючого буфера, що містив 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 1 %-й тритон Х-100 та набір інгібіторів протеаз фірми «Boehringer Mannheim» (Німеччина). Отримані лізати центрифугували при 20000 g і 4°C . Концентрацію тотального білка в отриманих супернатантах визначали колориметрично за методом Бредфорда [23].

Електрофорез білків та імуноблотинг. Електрофорез проводили у 8 %-му акриламідному гелі з подальшим електроперенесенням білків на PVDF мембрану. Вестерн-блот здійснювали, як описано раніше [24], лише як первинні антитіла використовували поліклональні антитіла проти С-кінцевих пептидів S6K α та S6K β в кількості 3 мкг/10 мл і 5 мкг/10 мл відповідно.

Результати і обговорення. Відомо, що регуляція експресії генів проходить на різних рівнях, які включають транскрипцію, сплайсинг і стабільність мРНК, а також трансляцію. Раніше нами проведено порівняльний аналіз експресії S6K α та β на рівні мРНК у тканинах людини за допомогою Нозерн-блотингу [9]. Дані дослідження показали, що мРНК обох кіназ експресується в усіх органах з незначними відмінностями в рівні їхньої експресії. Слід зазначити, що для S6K α виявлено два специфічних транскрипти (3,4 та 7,4 тис. п. н.), у той час як для S6K β — лише один розміром 2,2 тис. п. н. Це може бути пов'язано з існуванням додаткових гомологічних форм S6K. Для подальшого вивчення функціональних відмінностей та структурних особливостей двох основних ізоформ кінази S6 у представленій роботі ми порівнювали їхню експресію в різних тканинах за допомогою Вестерн-блотингу з використанням поліклональних

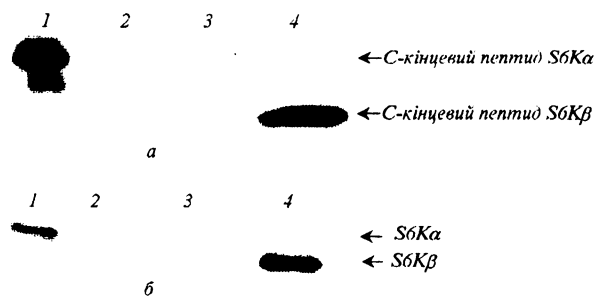


Рис. 2. Специфічність поліклональних антитіл проти С-кінцевих фрагментів S6K β та S6K α : а — імуноблотинг очищених рекомбінантних пептидів С-кінцевих фрагментів: 1, 3 — S6K α ; 2, 4 — S6K β ; первинні антитіла — поліклональні антитіла проти С-кінцевих фрагментів: 1, 2 — S6K α ; 3, 4 — S6K β ; б — імуноблотинг клітинних лізатів лінії НЕК 293, трансфікованих плазмідом, що містить: 1, 3 — повнорозмірний ген S6K α ; 2, 4 — повнорозмірний ген S6K β ; первинні антитіла — поліклональні антитіла проти С-кінцевих фрагментів: 1, 2 — S6K α ; 3, 4 — S6K β

антитіл проти S6K α та S6K β відповідно. Оскільки S6K α і S6K β характеризуються високим ступенем гомології (до 80 %), для імунізації тварин як антиген використовували рекомбінантні С-кінцеві пептиди відповідних форм кіназ, що відзначаються найменшим ступенем гомології. Для цього фрагменти ДНК, які кодують С-кінцеві ділянки S6K α та S6K β довжиною 72 та 53 амінокислотних залишки, клоновано в pET23d векторі і експресовано в клітинах *Escherichia coli*, як описано в «Матеріалах і методах».

Експресовані в бактеріальних системах білки очищували до високого ступеня гомогенності (~90 %) та використовували для імунізації тварин. Антитіла отримували за стандартними схемами і після очищення перевіряли їх на специфічність та наявність перехресного розпізнавання ізоформами K α та K β методом імуноблотингу. Отримані поліклональні антитіла, використані в подальшій роботі, мали високий ступінь афінності та специфічності (рис. 2, а). Відсутність імунологічного перехресту між S6K α та S6K β було підтверджено імуноблотингом, де як антигени було використано лізати клітин ліній НЕК 293, трансфікованих плазмідами, що містили нуклеотидні послідовності по-

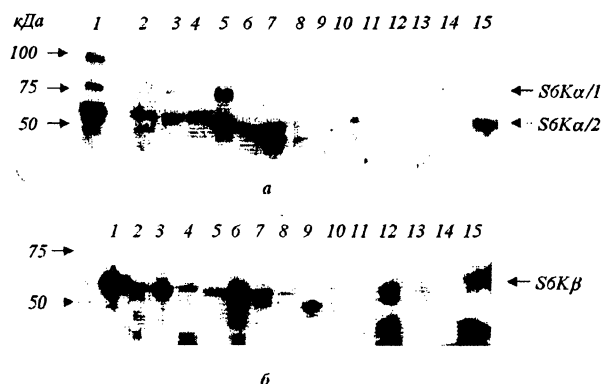


Рис. 3. Імуноблотинг тканинних лізатів різних органів щура з поліклональними антитілами проти С-кінцевих фрагментів: *a* — S6K α ; *b* — S6K β (1 — лізат клітин лінії НЕК 293, трансформованих плазмідом, що містить ген S6K α (*a*) і S6K β (*b*) людини): 2 — тимус; 3 — сім'яники; 4 — серце; 5 — мозок; 6 — яєчники; 7 — легені; 8 — передміхурова залоза; 9 — щитовидна залоза; 10 — підшлункова залоза; 11 — селезінка; 12 — нирка; 13 — печінка; 14 — кишечник; 15 — м'язи. Навантаження на трек тканинних лізатів: *a* — 40, і *b* — 80 мкг тотального білка

внорозмірних кДНК S6K α та S6K β (рис. 2, б). Це дало змогу використати ці лізати як позитивний контроль при детекції експресії обох ізоформ кінази S6 на рівні білка під час скринування тканинних лізатів щура для порівняння рівнів експресії K α та K β ізоформ кінази в нормальних тканинах ссавців. На рис. 3 представлено Вестерн-блот аналіз гомогенатів різних тканин щура на присутність S6K α та S6K β відповідно. Для аналізу використано однакову кількість білка гомогенатів різних органів (40 мкг тотального білка для S6K α та 80 мкг — для S6K β), однак результати свідчать про те, що рівень експресії для обох форм кіназ суттєво різниться в залежності від виду тканини.

У таблиці підсумовано відносний рівень експресії S6K α та S6K β в різних органах щура. Для S6K α найвищий рівень експресії виявлено для тимусу, сім'яників, серця, мозку, яєчників, легень та м'язів; дуже незначний — в передміхуровій залозі та нирках і майже не виявлено експресії в щитовидній залозі, селезінці, печінці і кишечнику. Для S6K β , окрім нижчого в незначній мірі загального рівня інтенсивності імуоферментної відповіді, спостерігався, в цілому, подібний розподіл тканиноспецифічного рівня експресії: найвища експресія — в гонадах (сім'яниках та яєчниках), дещо нижча — в тимусі, мозку, легенях, серці та м'язах і майже

Відносний рівень експресії S6K α і S6K β в різних органах щура

Орган	Білок		мРНК		
	S6K α	S6K β	S6K α		S6K β
			7,4 тис. п. н.	3,4 тис. п. н.	2,2 тис. п. н.
Тимус	+++	++	++	++	++
Сім'яники	+++	+++	+	+	+
Серце	+++	+	+++	+++	+++
Мозок	++++	+	+++	+	+
Яєчники	+	+++	+++	+	+
Легені	+	+	+	+	+
Передміхурова залоза	+	+	+	+	+++
Щитовидна залоза	+	+			
Підшлункова залоза	+	+	+++	+++	+++
Селезінка	+	+	+++	+++	+++
Нирки	+	+	+	+	+
Печінка	+	+	+	+	+
Кишечник	-	-	+	+	+++
М'язи	+++	+	++++	+++	+++

не виявлено експресії S6K β в щитовидній залозі, селезінці та кишечнику.

Порівнюючи отримані результати, знайдено такі відмінності в інтенсивності експресії S6K α та S6K β : якщо у випадку S6K α в мозку спостерігається найвища експресія ферменту в порівнянні з іншими органами, то для S6K β її можна оцінити як середню. Навпаки, в яєчниках для S6K β відмічено найвищу експресію, а для S6K α — середній її рівень.

У лізаті мозку на фоні високого рівня експресії S6K α , окрім цитоплазматичної (70 кДа) і ядерної (85 кДа) форм, спостерігалися інші, більш високомолекулярні ізоформи. Високомолекулярні, досі не ідентифіковані ізоформи S6K β , виявлено в гонадах, а також в дещо меншій мірі — в передміхуровій залозі та мозку. Експресію ядерної форми кінрази S6K α детектували також у сім'яниках та тимуці, а в серці і м'язах, де відносний рівень експресії цитоплазматичної форми S6K α був так само високим, ядерна форма була майже відсутня.

У загальну схему кореляції рівнів експресії S6K α та β не вкладалися результати, отримані на лізатах нирок та яєчників, у деяких експресія S6K β була навіть трохи вищою за аналогічну для S6K α . Наявність у зразках лізатів щитовидної залози низькомолекулярної форми S6K β може свідчити про високу активність специфічних ендогенних протеаз або іншу специфічність регуляції експресії S6K β кінрази в клітинах цього органу.

Низька імунореактивність гомогенатів деяких органів може бути наслідком високої активності протеолітичних ферментів під час отримання гомогенатів, хоча це малоймовірно, адже в лізуючих буферах були присутні щонайменше 10 інгібіторів протеаз різної специфічності.

Отримані нами результати з вивчення експресії двох форм S6 кінрази в різних тканинах свавців лише частково збігаються з результатами попереднього Нозерн-блот аналізу [17], а саме: для тимуцу, сім'яників, серця, яєчників, м'язів. У мозку поряд з низьким рівнем відповідної мРНК спостерігається високий в порівнянні з іншими тканинами рівень експресії як S6K α , так і S6K β . І, навпаки, Нозерн-блот свідчить про високий рівень мРНК S6K α та S6K β в підшлунковій залозі, селезінці та кишечнику, в той час як високого рівня експресії кіназ у цих органах нами не виявлено.

Відсутність прямої кореляції між транскрипцією РНК для S6K α та S6K β на рівні мРНК та експресією відповідних білків можна пов'язати, в першу чергу, з різною ефективністю трансляції мРНК у клітинах відповідних тканин.

Роботу частково профінансовано грантом Велкам Траст (Wellcome Trust).

L. O. Savinska, R. G. Kijamova, P. V. Pogrebnoy, G. V. Ovtsharenko, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Comparative characterization of S6 kinase α and β isoforms expression in mammalian tissues

Summary

The expression of ribosomal S6 kinase α and β isoforms has been analyzed in different rat tissues. The levels of kinase expression have been stated to show tissue-specific pattern, while the level of S6K α is higher compared to that of S6K β . The highest levels of α and β isoforms expression have been found in the brain and testes, respectively. Comparing the results of the mRNA expression analysis for both forms of S6 kinase forms we have found a correlation with respective protein levels only in a restricted number of tissues that may reflect the different effectiveness of the corresponding mRNA translation.

Л. А. Савинская, Р. Г. Киямова, П. В. Погребной, Г. В. Овчаренко, И. Т. Гут, В. В. Филоненко

Сравнительная характеристика экспрессии α и β изоформ S6 киназы в тканях млекопитающих

Резюме

Проанализирована экспрессия α - и β -изоформ киназы S6 рибосомного белка в разных тканях крысы. Выявлено, что экспрессия изоформ киназы имеет тканеспецифический характер. Установлено, что самый высокий уровень экспрессии для α -изоформы S6 киназы наблюдается в мозге, а для β -изоформы — соответственно в гонадах. При сравнении с результатами анализа экспрессии мРНК обеих форм S6 киназы обнаружена корреляция с экспрессией S6K на белковом уровне только в некоторых случаях, что свидетельствует о разной эффективности трансляции данного фермента в зависимости от вида ткани.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Morley S. J., Thomas G. Intracellular messengers and the control of protein synthesis // *Pharmacol. Ther.*—1991.—50, N 6.—P. 291—319.
2. Martin-Perez J., Thomas G. Ordered phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 after serum stimulation of quiescent 3T3 cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1983.—80, N 4.—P. 926—930.
3. 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, N 12.—P. 3693—3704.
4. Terada N., Patel H. R., Takase K., Kohno K., Nairn A. C.; Gelfond E. W. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNA encoding elongation factors and ribosomal proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1994.—91, N 24.—P. 11477—11481.
5. Lane H. A., Fernandez A., Lamb N. J. C., Thomas Y. p70 S6K function is essential for G₁ progression // *Nature*—1993.—363.—P. 170—172.
6. Banerjee P., Ahmad M. F., Grove J. R., Kozlosky C., Price D. J., Avruch J. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70 kDa S6 protein kinase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*—1990.—87, N 21.—P. 8550—8554.

7. 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, N 9.—P. 7365—7369.
8. Palen E., Trough J. A. Phosphorylation of ribosomal protein S6 by cAMP-dependent protein kinase and mitogen-stimulated S6 kinase differentially alters translation of globin mRNA // J. Biol. Chem.—1987.—262, N 8.—P. 3518—3523.
9. 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 β containing a proline-rich region // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 30061—30064.
10. Montagne J., Stewart M. J., Stocker H., Hafen E., Kozma S. C., Thomas G. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size // Science.—1999.—285, N 5436.—P. 2126—2129.
11. 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.
12. Reinhard C., Fernandez A., Lamb N. J. C., Thomas G. Nuclear localization of p85S6K. Functional requirement for entry into S6 phase // EMBO J.—1994.—13, N 7.—P. 1557—1565.
13. Law B. K., Nargaard P., Gnudi L., Kahn B. B., Poulson H. S., Moses H. L. Inhibition of DNA synthesis by a farnesyltransferase inhibitor involves inhibition of the p70(s6K) pathway // J. Biol. Chem.—1999.—274, N 8.—P. 4743—4748.
14. Simm A., Hoppe V., Karbach D., Leicht M., Fenn A., Hoppe J. Late signals from the PDGF receptors leading to the activation of 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.
15. Han J.-W., Pearson R. B., Dennis P. B., Thomas G. Rapamycin, wortmannin, and the methylxanthine SQ20006 inactivate p70 by inducing dephosphorylation of the same subset of sites // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 36.—P. 21396—21403.
16. Pearson R. B., Dennis P. B., Han J.-W., Williamson N. A., Kozma S. C., Wettenhall R. E., Thomas G. The principal target of rapamycin-induced p70S6K inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain // EMBO J.—1995.—21, N 21.—P. 5279—5287.
17. Price D. J., Mukhopadhyay N. K., Avruch J. Insulin-activated protein kinases phosphorylate a peptide inhibitor of the p70 S6 kinase // J. Biol. Chem.—1991.—266, N 25.—P. 16281—16284.
18. Ferrari S., Bannwarth W., Morley S. J., Totty N. F., Thomas C. Activation of p70 S6 is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89, N 15.—P. 7282—7286.
19. Moser B. A., Dennis P. B., Pullen N., Pearson R. B., Williamson N. A., Wettenhall R. E., Kozma S. C., Thomas G. Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70(S6K) // Mol. Cell. Biol.—1997.—17, N 9.—P. 5648—5655.
20. Pullen N., Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70S6K // FEBS Lett.—1997.—410, N 1.—P. 78—82.
21. 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, N 14.—P. 8351—8356.
22. 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 кінази рибосомного білка S6 типу β // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 5.—С. 1—7.
23. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Analyt. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
24. 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.—С. 232—238.

УДК 577.218+577.151.64
Надійшло до редакції 30.05.2000