

Функціональні та регуляторні особливості кінази рибосомного білка S6 типу β

Т. Й. Вальовка, В. В. Філоненко¹, С. С. Пальчевський¹, М. М. Великий,
Л. Б. Дробот², М. Вотерфілд³, Г. Х. Мацука¹, І. Т. Гут^{1, 3}

Львівський державний університет ім. І. Франка
Вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

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

² Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

³ Інститут Людвіга по вивченню рака
WIP8BT, Лондон, 91, Райдінг Хауз Стріт, Англія

Нещодавно клоновано нову форму кінази рибосомного білка S6, названу р70S6 кіназа β , амінокислотна послідовність якої має високий ступінь гомології з відомою р70S6 кіназою α . В роботі представлено результати порівняльного аналізу кінетики активації сироваткою α - і β -форм S6 кінази, експресованих у клітинах HEK293. Виявлені відмінності вказують на різний в часовому відношенні прояв їхньої функціональної активності in vivo. Інкубація трансфікованих клітин з імуносупресором рапаміцином пригнічує індуковану сироваткою активацію як р70 α 2, так і р70 β 2 кіназ. Пригнічення р70 β 2 відбувається за низьких концентрацій рапаміцину. Одночасно β 2-форма кінази є менш чутливою до високих концентрацій інгібітора у порівнянні з р70 α 2. Отримані дані дозволяють припустити існування диференціальних механізмів модуляції сигнальних шляхів, що опосередковують активацію α - і β -форм S6 кінази.

Вступ. Активація трансляції є необхідною метаболічною подією відповіді клітини на вплив ростових факторів, гормонів, цитокінів, а також фоболових ефірів та онкогенів. Процес ініціації 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 [2]. На сьогоднішній день отримано переконливі докази на користь того, що Ser/Thr-специфічне фосфорилування S6 білка in vivo опосередковується р70S6 кіназою [3—7]. У свою чергу, посилення фосфорилування S6 білка забезпечує ефективну дифе-

ренційну трансляцію мРНК, які містять поліпіридиновою послідовність на 5'-кінці в області, яка не транскрибується [7, 8]. Цей клас мРНК кодує значну кількість компонентів білок-синтезуючого 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 [9]. Крім цього, показано, що активація згаданої кінази є необхідною не лише для індукції білкового синтезу, але й для регуляції клітинного циклу. Інактивація р70S6 кінази шляхом мікроін'єкції нейтралізуючих антитіл [10, 16] чи інкубації з імуносупресором рапаміцином [11—13] супроводжується зупинкою багатьох типів клітин у G1 фазі клітинного циклу [14].

Донедавна було відомо тільки одну форму р70S6 кінази, яка експресується в клітинах у вигляді двох ізоформ — р70 α 1 і р70 α 2. Ці дві ізоформи ферменту кодуються одним геном і є результатом

© Т. Й. ВАЛЬОВКА, В. В. ФІЛОНЕНКО, С. С. ПАЛЬЧЕВСЬКИЙ,
М. М. ВЕЛИКИЙ, Л. Б. ДРОБОТ, М. Д. ВОТЕРФІЛД,
Г. Х. МАЦУКА, І. Т. ГУТ, 1999

альтернативного сплайсингу мРНК та використання альтернативних центрів початку трансляції [15]. p70 α 1 (525 амінокислотних залишків) відрізняється від p70 α 2 (502 амінокислотних залишки) лише наявністю N-кінцевого фрагмента, який містить шість послідовних залишків Arg безпосередньо після початкового Met і визначає ядерну локалізацію даної ізоформи [16, 17].

В останні роки здійснюються інтенсивні пошуки сигнальних молекул, потенційних регуляторів p70S6 кінази, а також вивчення сигнальних шляхів, які ведуть до активації цього ферменту. Встановлено, що активація p70S6 кінази *in vivo* зумовлена фосфорилуванням залишків Ser і Thr, які згруповані в три кластери. Перший кластер охоплює Ser434, Ser441, Thr444, Ser447 і Ser452, які локалізовані в псевдосубстратному аутоінгібіторному домені [4, 20—22]. Показано, що фосфорилування залишків Ser і Thr у цьому кластері є першим етапом у процесі активації p70S6 кінази. Експерименти *in vitro* свідчать про те, що кінази, які активуються мітогенами (Erk1 та Erk2), Cdc2, та кінази, що активуються за участю стресових факторів, p38, здатні фосфорилувати S6 кіназу в цьому кластері. Другий кластер містить Ser394 і Thr412, які знаходяться в районі, що з'єднує між собою каталітичний домен і C-кінцеву область [18, 19]. Фосфорилування цих амінокислотних залишків призводить до конформаційних змін у структурі кінази, які відкривають третій регуляторний кластер і спричиняють часткову активацію кінази. Третій кластер включає Thr252, який локалізується в активуючій петлі кіназного домену, і його фосфорилування обумовлює повну активацію кінази. Цікаво, що делеція C-кінцевої області не впливає суттєвим чином на здатність вкороченого мутанту p70 Δ CT104, стабільно експресованого в клітинах NIH 3T3, активуватися у відповідь на сироватку, в той час як заміна залишків Thr252, Ser394 і Thr412 на Ala зумовлює повну інактивацію ферменту [19, 23, 24].

Використання імуносупресора рапаміцину, який безпосередньо пригнічує TOR кіназу (відому ще як RAFT чи FRAP), та специфічних інгібіторів PI3'-кінази (вортманіну і LY294002) дозволило ідентифікувати сигнальні шляхи, причетні до активації p70S6 кінази, і показати, що вони не залежать від індукції мітогенного сигналу через MAPK сигнальний шлях [25—28]. Дослідження останніх років вказують на те, що PI3'-кіназний шлях активації p70S6 кінази використовує PDK1 як нижче розташований сигнальний ефектор. Відомо, що PDK1 фосфорилує Thr252 *in vivo* та *in vitro*. Це призводить до часткової активації p70S6 кінази

[29]. За даними Барнет і співавт. [30], другий критичний залишок Thr412 є специфічним субстратом для рапаміцин-чутливої TOR кінази. Продемонстровано також, що TPA-індукована активація p70S6 кінази, яка здійснюється за участю PKC, може блокуватися рапаміцином. Все це вказує на участь TOR/FRAP-залежного шляху в трансдукції сигналу [33].

Слід також відзначити, що фосфорилування залишків Thr252 і Thr412 є чутливим до дії імуносупресора рапаміцину, який безпосередньо інактивує mTOR кіназу, та специфічних інгібіторів PI 3'-кінази [25—28].

Таким чином, згідно з наявними експериментальними даними, повна активація p70S6 кінази є результатом послідовного фосфорилування ферменту за участю множинних, відносно незалежних Ser/Thr-специфічних протеїнкіназ.

Недавно було клоновано нову форму p70S6 кінази (p70S6K β), амінокислотна послідовність якої впродовж каталітичного і аутоінгібіторного доменів має високий ступінь гомології з уже відомою p70S6 кіназою α [31]. Ця форма кінази також представлена двома ізоформами: ядерною p70S6K β 1 (495 амінокислотних залишків) і цитоплазматичною p70S6K β 2 (482 амінокислотних залишки). В структурі p70 β , як і в p70 α , розрізняють N- та C-кінцеві некаталітичні райони, каталітичний домен, подовження каталітичного домену та аутоінгібіторний домен (рис. 1). Поряд з високою консервативністю амінокислотних послідовностей p70 α і p70 β впродовж каталітичного (83 %), регуляторного (80 %) і аутоінгібіторного (73 %) доменів, їхні N- та C-кінцеві послідовності характеризуються відносно низьким рівнем гомології — 28 і 25 % відповідно [31].

Як вказувалося вище, p70 α зазнає множинного фосфорилування по трьох кластерах регуляторних центрів у відповідь на стимуляцію клітин ростовими факторами [33]. Ці центри фосфорилування є також висококонсервативними в p70 β і представлені кластером Ser/Thr-Pro мотивів в аутоінгібіторному псевдосубстратному домені (Ser423, Ser430, Ser436, Ser441 у p70 β 1, які відповідають Ser434, Ser441, Ser447 і Ser452 у p70 α 1) [20, 22]. Наступний кластер локалізований в подовженні каталітичного домену і включає Ser383 і Thr401, що відповідають Ser394 і Thr412 у p70 α 1 [18, 34]. Третій представлений Thr241, що відповідає Thr252, який розташований в активуючій петлі p70 α 1 [18, 19].

Поряд з гомологією регуляторних центрів фосфорилування слід відмітити відсутність у p70 β одного з центрів фосфорилування, якому в струк-

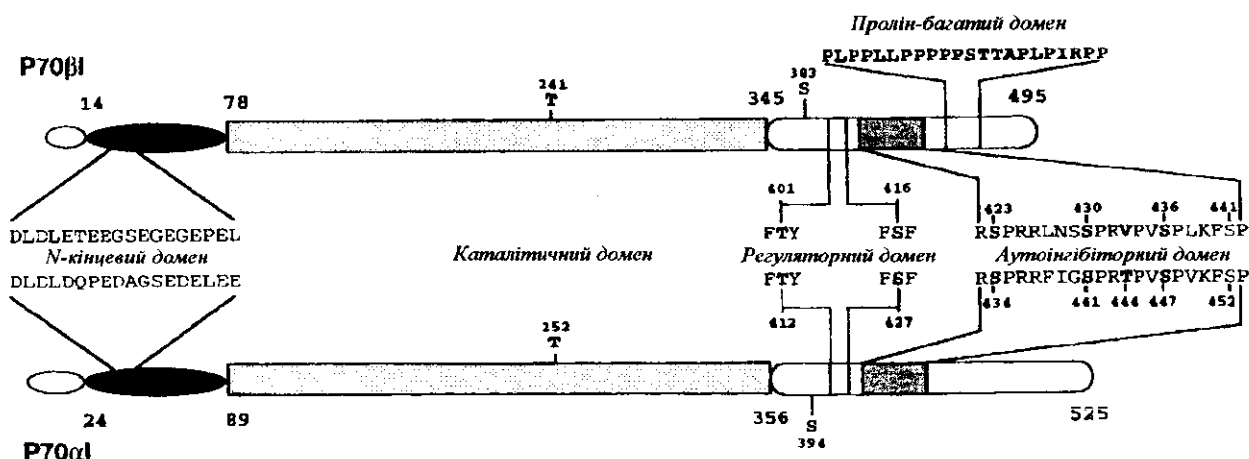


Рис. 1. Порівняльна характеристика α та β ізоформ p70S6 кінрази

турі p70 α відповідає Thr444. Крім цього, унікальною структурною детермінантою С-кінцевої області p70 β є наявність Pro-багатого району, який може бути залучений до взаємодії з сигнальними білками, що містять SH3-домени (Src-гомологічні домени типу 3) [31]. Все це дає підстави припустити існування регуляторних відмінностей в активації цих двох форм S6 кінрази.

Встановлено, що p70S6K β здатна фосфорилувати S6 білок *in vitro*. З огляду на ці відомості в даній роботі було проведено порівняльний аналіз функціональних і регуляторних особливостей двох форм p70S6 кінрази у відповідь на стимуляцію клітин сироваткою.

Матеріали і методи. Конструювання плазмід. Для того щоб клонувати p70 α 2 і p70 β 2 в *pcDNA3.1* експресуючий вектор, кДНК послідовності обох форм модифікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи наступні праймери: з 5'-кінця p70 α 2 (містить центр упізнання рестриктазою *Bam*HI і безпосередньо за ініціюючим Met послідовність, що кодує EE-tag епітоп (MEFMPME)) — GAA TTC GGA TCC GCC ACC ATG GAG TTC ATG CCG ATG GAG AGG CAG GAG TGT TTG ACA TAG AC; з 3'-кінця p70 α 2 (*Eco*RI) — CGG GAA TTC TCA TAG ATT CAT ACG CAG GTTG; з 5'-кінця p70 β 2 (*Bam*HI, EE-tag) — AATTCCG GATCC GCC ACC ATG GAG TTC ATG CCG ATG GAG GCG GCC GTG TTT GAT TTG GAT; з 3'-кінця p70 β 2 (*Eco*RI) — CGG GAA TTC CTA GCG CCC TGG ACG CCC ACG. Наявність EE-tag епітопа в послідовності p70 α і β

дозволяє проводити біохімічний аналіз експресованих кіназ, використовуючи специфічні моноклональні антитіла проти даного епітопа.

Ампліфіковані кДНК клонували у вектор *pcDNA3.1* по центрах упізнання ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI і *Eco*RI. Нуклеотидну послідовність клонованих фрагментів перевіряли за допомогою автоматичного сиквенатора ABI 377 (Applied Biosystem).

Культивування і тимчасова трансфекція клітин. Клітини лінії HEK293 (клітини ембріональної нирки людини) культивували в середовищі DMEM, що містило 10 % телячої ембріональної сироватки («Life Technologies, Inc.», США), 2 мМ L-глутамін та антибіотики пеніцилін і стрептоміцин. Перед трансфекцією клітини HEK293 культивували на чашках Петрі діаметром 10 см до досягнення 70 % конфлюенту. Клітини трансфікували плазмідною ДНК (5 мкг ДНК на чашку) з використанням ліпоектаміну («Life Technologies, Inc.») згідно з протоколом компанії. Через 20 год після трансфекції клітини переводили на безсироваткове середовище і після 24-год голодування стимулювали, інкубуючи їх у середовищі DMEM з 10 % сироватки протягом зазначеного періоду часу. В експериментах з використанням рапаміцину клітини інкубували в присутності зростаючих концентрацій цього інгібітора протягом 15 хв перед стимуляцією. Контрольні клітини інкубували в присутності 0,1 % диметилсульфоксиду, оскільки в ньому був розчинений рапаміцин.

Отримання клітинних лізатів та імунопре-

ципітація $p70S6$ кінази. Стимуляцію клітин зупиняли двохразовим відмиванням ЗФР (забуференим фізіологічним розчином), охолодженим до $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клітини лізували в буфері лізису, що містив 50 mM Hepes, $\text{pH } 7,5$, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM пірофосфат натрію, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF (фенілметилсульфонілфторид, «Sigma», США), 3 mM бензамідин («Sigma»), 50 мкг/мл лейпептину («Boehringer Mannheim», ФРГ) і 50 мкг/мл апротиніну («Sigma»). Отримані лізати витримували протягом 25 хв на льодовій бані і центрифугували (25 хв , 12000 об/хв) для осадження детергентнерозчинної фракції. Супернатант лізатів клітин врівноважували за кількістю загального білка і інкубували з анти-EE моноклональними антитілами і білок-G-сефарозою («Pharmacia», Швеція) при температурі $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 год . Осаджені імунні комплекси відмивали три рази буфером лізису, що містив $0,5\text{ M}$ NaCl, та двічі — кіназним буфером (40 mM Hepes, $\text{pH } 7,4$, 20 mM MgCl_2 , 20 mM β -глицерофосфат, 1 mM ДТТ). Отримані імунопреципітати використовували в S6 кіназній реакції.

Визначення $p70S6$ кіназної активності. S6 кіназну активність визначали в імунопреципітатах, використовуючи як субстрат 80S рибосоми, очищені з гомогенату печінки щура [32]. S6 кіназну реакцію ініціювали додаванням кіназного буфера, що містив 20 мкМ [γ - ^{32}P] АТФ (5 мкКі на пробу) («Amersham Pharmacia Biotech», Англія), 20 мкг білка 80S субчастинок рибосом, 1 мкМ інгібітор сАМР-залежної протеїнкінази (PKI, «Calbiochem», США). Реакційну суміш інкубували протягом 30 хв при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакцію зупиняли додаванням 5-кратного буфера Леммлі для проб і прогрівали при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв . Продукти реакції розділяли електрофорезом у $12,5\%$ -му поліакриламідному гелі і визначали рівень фосфорилування S6 білка за допомогою PhosphorImager (Molecular Dynamics). S6 кіназну активність виражали в $\text{імн} \cdot \text{хв}^{-1} \text{ }^{32}\text{P}$, включеного в S6 білок.

Результати та обговорення. Відомо, що α -форма $p70S6$ кінази активується при відповіді клітини на дію мітогенних факторів, зокрема інсуліну, епідермального фактора росту (EGF) і сироватки [13]. Показано, що активація $p70\alpha$, стимульована агоністами, носить двохфазний характер [35–37]. Першій фазі відповідає пік швидкої активації, тоді як пізня активація є повільною і поступово переходить у плато. Поряд з цим виявлено, що в різних клітинних лініях час появи швидкого піка активації може варіювати від 10 до 60 хв . Наприклад, ранній пік активації $p70S6$ кінази в клітинах гепатоми (Hep G2) та ембріональної нирки людини

(HEK293) припадає на 20 – 30 хв [30, 38], тоді як у фібробластах хом'яка (CCL 39) швидка активація досягає максимуму на 10 -ту хв [37].

У даній роботі здійснено порівняльний аналіз динаміки активації $p70\alpha2$ і $p70\beta2$ форм S6 кінази в клітинах HEK293 у відповідь на стимуляцію сироваткою. Для цього клітини HEK293 трансфікували рекомбінантним вектором *pcDNA3.1*, що містив послідовності $p70\alpha2$ і $p70\beta2$. Після 24 -год голодування клітини стимулювали сироваткою протягом вказаного періоду часу. Експресовані форми S6 кінази імунопреципітували анти-EE-tag моноклональними антитілами, а отримані імунні комплекси використовували в S6 кіназній реакції *in vitro*. Отримані нами результати вказують на двохфазний характер активації обох форм S6 кінази (рис. 2). Профіль кривої активації $p70\alpha2$ добре узгоджується з опублікованими раніше даними по активації ендогенної $p70\alpha S6$ кінази. Ранній пік активації $p70\alpha2$ припадає на 20 -ту хв і переходить у повільну інактивацію. Тривала фаза пізньої активації починається після 60 хв і спостерігається впродовж наступних 2 год інкубації клітин у середовищі з 10% сироватки.

За даними Венг і співавт. [39], перша фаза активації-інактивації $p70\alpha$ кінази при стимуляції СНО-IR клітин інсуліном корелює з фосфорилуванням—дефосфорилуванням залишків Thr412 і Thr252. На відміну від $p70\alpha2$ ранній пік активації $p70\beta2$ спостерігається вже на 10 -ту хв і характеризується стрімким зростанням і наступним спадом. Нами був виявлений також другий незначний пік активації $p70\beta$ кінази на 60 -й хв, який спостерігався в трьох незалежних експериментах.

Нами виявлено також, що профіль кривих, які описують кінетику активації EE-tag $p70\alpha$ і $p70\beta$, експресованих у клітинах HEK293 у відповідь на стимуляцію клітин сироваткою, суттєво відрізняється (рис. 2). На відміну від $p70\alpha$, максимум активності якої припадає на 20 -ту хв стимуляції, активація $p70\beta$ носить більш ранній характер і максимум кіназної активності спостерігається вже на 10 -ту хв. У випадку $p70\beta$ інактивація кінази відбувається у дві стадії: швидка інактивація на 20 -й хв та повільна інактивація після годинної інкубації в присутності сироватки.

Важливо наголосити, що максимум активності $p70\alpha$ збігається в часі з першою стадією інактивації $p70\beta$, що вказує на різний в часовому відношенні прояв їхньої функціональної активності *in vivo*. Очевидно, що виявлені відмінності в кінетиці активації α - і β -форм $p70S6$ кіназ можуть свідчити про здатність $p70\beta$ забезпечувати ранню відповідь клітини на мітогенний стимул, у той час як $p70\alpha$

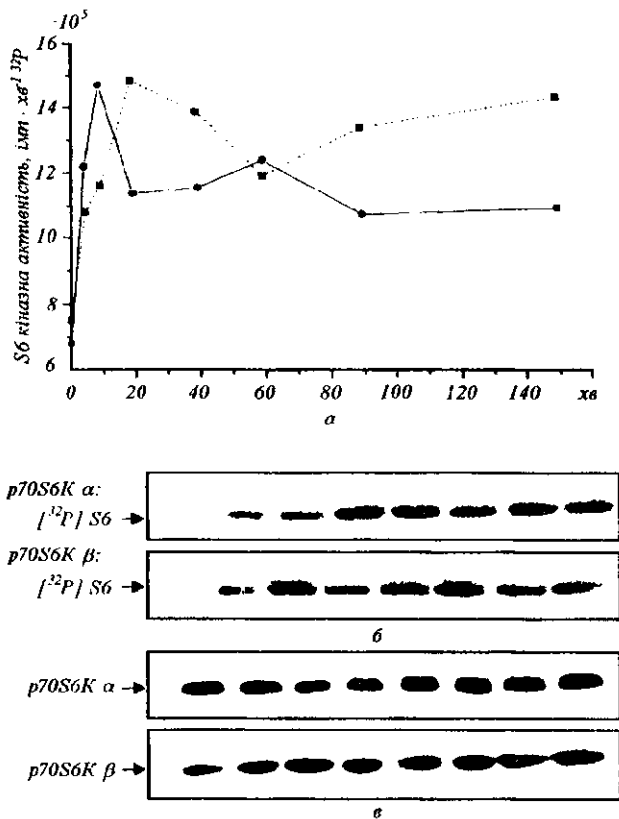


Рис. 2. Кінетика активації α - і β -форм кінрази рибосомного білка S6 в умовах стимуляції клітин сироваткою: а, б — динаміка зміни рівня фосфорилування S6 білка, представлена графічно та радіоавтографами відповідно (а: 1 — p70S6K α ; 2 — p70S6K β); в — рівень експресії обох форм кінрази, визначений за допомогою імуноблотингу з антитілами до EE-tag епітопа. Трансфекцію клітин лінії HEK293 здійснювали векторами pcDNA3.1 EE-tag p70 α 2 і pcDNA3.1 EE-tag p70 β 2. S6 кіназну активність аналізували, як це описано в розділі «Матеріали і методи»

здійснює більш пізню регуляцію стану фосфорилування S6 білка і, не виключено, процесу біосинтезу білка в цілому.

Відомо, що p70S6 кінза є чутливою до дії імуносупресора рапаміцину [11—13]. Нами було досліджено вплив різних концентрацій рапаміцину на ступінь пригнічення кіназної активності цитоплазматичних α 2- і β 2-форм p70S6 кінрази. Як видно з рис. 3 і 4, рапаміцин у концентрації 2 нМ пригнічує активність p70 β 2 на 55 % у порівнянні з контролем, тоді як зазначена концентрація інгібітора суттєво не впливає на активність p70 α 2. Однак при збільшенні концентрації рапаміцину

чутливість обох форм ферменту до інгібітора проявляє протилежну тенденцію. При концентрації рапаміцину 20 нМ інгібування активності p70 α складає близько 80 %, а p70 — лише 64 %. Ця різниця стає ще вираженішою при збільшенні концентрації рапаміцину до 200 нМ (інгібування p70 α становить 96,4 %, а p70 β — 72 %).

Таким чином, нами встановлено, що пригнічення активності α 2- і β 2-форм p70S6 кінрази залежить від концентрації рапаміцину в культуральному середовищі і ця залежність є різною для досліджених форм ферменту. Активність p70 β 2 ефективніше пригнічується низькими концентраціями рапаміцину, що не властиво для p70 α 2, однак при вищих концентраціях β -форма є менш чутливою до його впливу в порівнянні з α -формою.

Виявлені відмінності щодо чутливості обох форм p70S6 кінрази до інгібуючого впливу рапаміцину можуть бути пов'язані зі специфікою їхньої активації через TOR/FRAP-залежний сигнальний шлях. Відсутність одного з рапаміцинчутливих ре-

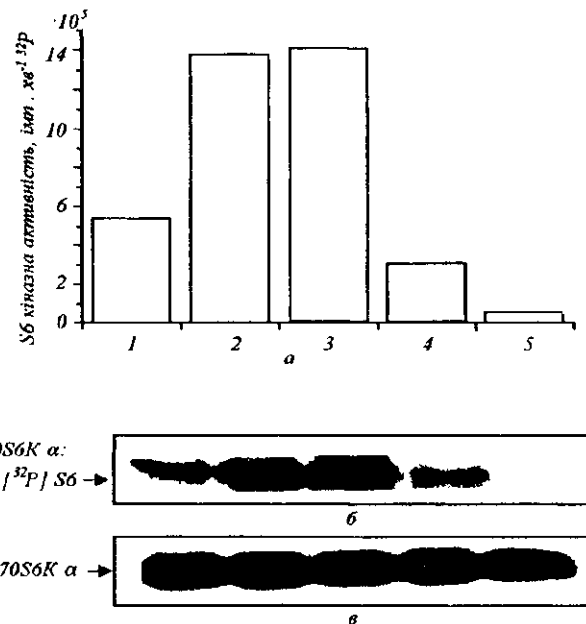


Рис. 3. Вплив різних концентрацій рапаміцину на активність α -форми кінрази рибосомного S6 білка: а — без стимуляції сироваткою (1); з додаванням 10 % сироватки (2); інкубація протягом 15 хв з рапаміцином в концентрації 2 (3), 20 (4) і 200 нМ (5); б — радіоавтографічно представлене фосфорилування S6 білка; в — визначення рівня експресії α -форми S6 кінрази за допомогою імуноблотингу з антитілами до EE-tag епітопа. S6 кіназну активність аналізували, як це описано в розділі «Матеріали і методи». Трансфекцію клітин лінії HEK293 здійснювали вектором pcDNA3.1 EE-tag p70S6 α 2

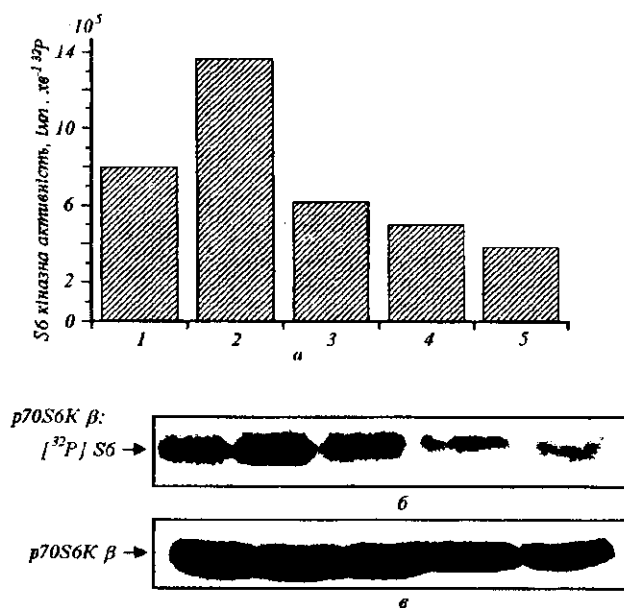


Рис. 4. Вплив різних концентрацій рапаміцину на активність β-форми кінрази рибосомного S6 білка: а — без стимуляції сироваткою (1); з додаванням 10 % сироватки (2); інкубація протягом 15 хв з рапаміцином в концентрації 2 (3), 20 (4) і 200 нМ (5); б — радіоавтографічно представлене фосфорилування S6 білка; в — визначення рівня експресії α-форми S6 кінрази за допомогою імуноблотингу з антитілами до EE-tag епітопа. S6 кіназну активність аналізували, як це описано в розділі «Матеріали і методи». Трансфекцію клітин лінії HEK293 здійснювали вектором pcDNA3.1 EE-tag p70S6β2

гуляторних центрів у структурі p70β (аналог Thr444 у p70α) може бути вірогідним поясненням цих відмінностей.

У майбутньому було б важливо дослідити вплив заміни Val433 → Thr на чутливість мутанту p70β до рапаміцину та вортманіну.

Т. И. Вальовка, В. В. Филоненко, С. С. Пальчевский, М. М. Великий, Л. Б. Дробот, М. Вотерфилд, Г. Х. Машука, И. Т. Гут

Функциональные и регуляторные особенности киназы рибосомного белка S6 типа β

Резюме

Недавно клонирована новая форма киназы рибосомного белка S6, названная p70S6 киназа β, аминокислотная последовательность которой имеет высокую степень гомологии с известной p70S6 киназой α. В работе представлены результаты сравнительного анализа кинетики активации сывороткой α2- и β2-форм S6 киназы, экспрессированных в клетках HEK293. Установленные отличия указывают на разное в часовом отношении проявление их функциональной активно-

сти in vivo. Инкубация трансфицированных клеток с иммуносупрессором рапаміцином угнетает индуцированную сывороткой активацию как p70α2, так и p70β2 киназ. Угнетение p70β2 происходит при низких концентрациях рапаміцина. Одновременно β2-форма киназы менее чувствительна к высоким концентрациям ингибитора по сравнению с p70α2. Полученные данные дают основание предположить существование дифференциальных механизмов модуляции сигнальных путей, которые опосредуют активацию α- и β-форм S6 киназы.

T. Valovka, V. Filonenko, S. Palchevsky, M. Velikiy, L. Drobot, M. Waterfield, G. Matsuka, I. Gout

Functional and regulatory properties of p70S6 kinase β

Summary

A novel ribosomal S6 kinase, termed p70S6 kinase β, has been recently identified. It is highly homologous to known p70/p85 S6 kinase (p70S6 kinase α) in catalytic, kinase extension and auto-inhibitory domains, but differs significantly in the regulatory N- and C-terminal regions. Here we report the kinetics of serum-induced activation of cytoplasmic isoforms of p70S6 kinase α and β (p70α2 and p70β2) in transiently transfected HEK293. Both kinases exhibit biphasic activation upon serum stimulation, but differ in the appearance of peaks of their S6 specific activity. We also found that p70α2 and p70β2, when overexpressed in HEK293 cells, are sensitive to the immunosuppressant rapamycin. However, p70β2 kinase is more sensitive to low concentrations of rapamycin, when compared with p70α2. At the same time, high concentrations of rapamycin are inhibitory to a higher extent towards p70α2, than p70β2 kinase. Taken together, our results indicate that p70β2 kinase is activated earlier in response to serum and is less sensitive to high concentration of rapamycin, in comparison to p70α2. These differences indicate the existence of alternative signalling mechanisms, involved in the regulation of p70β2 kinase.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Morley S. J., Thomas G. Intracellular messengers and the control of protein synthesis // Pharmacol. Ther.—1991.—50, N 6.—P. 291—319.
- 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.
- Chung J., Kuo C. J., Crabtree G. R., Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kDa S6 protein kinases // Cell.—1992.—69, N 7.—P. 1227—1236.
- 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.
- 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.
- Palen E., Traugh 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.
- 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.
- 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.
9. Nasmyth K. Retinoblastoma protein. Another role rolls in // Nature.—1996.—382, N 6586.—P. 28—29.
10. Lane H. A., Fernandez A., Lamb N. J. C., Thomas G. p70^{S6K} function is essential for G1 progression // Nature.—1993.—363, N 6425.—P. 170—172.
11. Price D. J., Grove J. R., Calvo V., Avruch J., Bierer B. E. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase // Science.—1992.—257, N 5072.—P. 973—977.
12. Ferrari S., Pearson R. B., Silgmann M., Kozma S. C., Thomas G. The immunosuppressant rapamycin induced inactivation of p70^{S6K} through dephosphorylation of a novel set of sites // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 22.—P. 16091—16094.
13. Chou M. M., Blenis J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signaling // Curr. Opin. Cell. Biol.—1995.—7, N 6.—P. 806—914.
14. Kanda S., Hodgkin M. N., Woodfield R. J., Wakelam J. O., Thomas G., Cleasson-Welsh L. Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells // J. Biol. Chem.—1997.—272, N 37.—P. 23347—23353.
15. Grove J. R., Banerjee P., Balasubramanyam A., Coffey P. J., Price D. J., Avruch J., Woodgett J. R. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini // Mol. Cell. Biol.—1991.—11, N 11.—P. 5541—5550.
16. Reinhard C., Fernandez A., Lamb N. J., Thomas G. Nuclear localization of p85^{S6K}: functional requirement for entry into S6 phase // EMBO J.—1994.—13, N 7.—P. 1557—1565.
17. Coffey P. J., Woodgett J. R. Differential subcellular localization of two isoforms of p70 S6 protein kinase // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1994.—198, N 2.—P. 780—786.
18. Han J.-W., Pearson R. B., Dennis P. B., Thomas G. Rapamycin, wortmannin, and the methylxanthine SQ20006 inactivate p70^{S6K} by inducing dephosphorylation of the same subset of sites // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 36.—P. 21396—21403.
19. 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, N 21.—P. 5279—5287.
20. 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.
21. Mukhopadhyay N. K., Price D. J., Kyriakis J. M., Pelech S., Sanghera J., Avruch J. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase // J. Biol. Chem.—1992.—267, N 5.—P. 3325—3335.
22. Ferrari S., Bannwarth W., Morley S. J., Totty N. F., Thomas G. Activation of p70^{S6K} 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.
23. Weng Q.-P., Andrabhi K., Klippel A., Kozlowski M. T., Williams L. T., Avruch J. Phosphatidylinositol 3'-kinase signals activation of p70 S6 kinase *in situ* through site-specific p70 phosphorylation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92, N 12.—P. 5744—5748.
24. Sugiyama H., Papst P., Gelfond E. W., Terada N. p70 S6 kinase sensitivity to rapamycin is eliminated by amino acid substitution of Thr 229 // J. Immunol.—1996.—157, N 2.—P. 656—660.
25. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90, N 13.—P. 5889—5892.
26. Grews C. M., Erikson R. L. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to MEK of it all // Cell.—1993.—74, N 2.—P. 215—217.
27. Davis R. J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 20.—P. 14553—14556.
28. Marshall C. J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase // Curr. Opin. Gen. Dev.—1994.—4, N 1.—P. 82—89.
29. Alessi D. R., Kozlowski M. T., Weng Q.-P., Morrice N., Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro* // Curr. Biol.—1997.—8, N 2.—P. 69—81.
30. Burnett P. E., Barrow R. K., Cohen N. A., Snyder S. H., Sabatini D. M. RAFT phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95, N 4.—P. 1432—1437.
31. 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.
32. Thomas G., Gordon J., Rogg H. N¹-Acetylcysteine a previously unidentified labile component of the small subunit of eukaryotic ribosomes // J. Biol. Chem.—1978.—253.—P. 1101—1105.
33. Pullen N., Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70S6K // FEBS Lett.—1997.—410, N 1.—P. 78—82.
34. 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.
35. Susa M., Olivier A. R., Fabbro D., Thomas G. EGF induces biphasic S6 kinase activation: late phase is protein kinase C-dependent and contributes to mitogenicity // Cell.—1989.—57, N 5.—P. 817—824.
36. Susa M., Vulevic D., Lane H. A., Thomas G. Inhibition or down-regulation of protein kinase C attenuates late phase p70S6K activation induced by epidermal growth factor but not by platelet-derived growth factor or insulin // J. Biol. Chem.—1992.—267, N 10.—P. 6905—6909.
37. Kahan C., Seuwen K., Meloshe S., Pouyssegur J. Coordinate biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblast. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylate cyclase inhibition // J. Biol. Chem.—1992.—267, N 19.—P. 13369—13375.
38. Chung J., Grammer T. C., Lemon K. P., Kazlanskas A., Blenis J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6 activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase // Nature.—1994.—370, N 6484.—P. 71—75.
39. Weng Q.-P., Kozlowski M., Belham C., Zhang A., Comb M. J., Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation *in vivo* // J. Biol. Chem.—1998.—273, N 26.—P. 16621—16629.