

УДК 577.2.04

Чен Ч.Х.<sup>1,2</sup>, Шайкенов Т.<sup>1</sup>, Петерсон Т.Р.<sup>3,4</sup>, Аимбетов Р.<sup>1,5</sup>, Ли С.В.<sup>1,2</sup>, Ву Ч.<sup>1</sup>,  
Лин Х.К.<sup>1,2</sup>, Бисенбаев А.К.<sup>5</sup>, Сарбасов Д.Д.<sup>1,2</sup>

### GSK3 $\beta$ -ЗАВИСИМОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РИКТОРА ПО Ser1235 РЕГУЛИРУЕТ КЛЕТОЧНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

<sup>1</sup>Department of Molecular and Cellular Oncology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA;

<sup>2</sup>The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX 77030, USA;

<sup>3</sup>Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA 02142, USA;

<sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA;

<sup>5</sup>Кафедра генетики и молекулярной биологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

*У эукариот ростовые факторы стимулируют анаболические процессы и регулируют клеточный рост и пролиферацию посредством активации сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt. Фосфорилирование киназы гликоген синтазы 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) киназой Akt ингибирует ферментативную активность GSK3 $\beta$ , стимулируя синтез гликогена. GSK3 $\beta$  в свою очередь ингибирует Akt, подавляя киназную активность mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) путем стресс-зависимого фосфорилирования одного из компонентов mTORC2 - риктора - по сайту Ser1235. В данной работе мы показали, что данный сайт фосфорилирования играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации и опухолевого роста.*

#### Введение

Сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*) и Akt является хорошо изученной системой регуляции таких важных процессов, как пролиферация, метаболизм и апоптоз [1]. Akt - основной эффектор PI3K - один из важнейших регуляторных белков, находящийся на пересечении разных сигнальных путей, контролирующих ключевые функции клетки. Akt является известным субстратом mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) [2], регуляция которого чувствительна к ростовым факторам и сигнальным ответам на стресс. Нарушение регуляции Akt под действием разных стрессовых факторов часто наблюдается в патогенезе таких болезней, как диабет и рак.

Киназа гликоген синтазы 3 (GSK3, *glycogen synthase kinase 3*) подавляет активность гликоген синтазы (GS, *glycogen synthase*) путем ее фосфорилирования по сайту Ser641. Активность GSK3 в свою очередь контролируется Akt через ингибирующий сайт Ser9.

Наши предыдущие исследования показали, что стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР) приводит к активации GSK3 и подавлению киназной активности mTORC2. Также нами было установлено, что указанное подавление коррелирует с фосфорилированием одного из компонентов mTORC2 - риктора - по сайту Ser1235 и что данное фосфорилирование зависит от GSK3. В настоящей работе мы показали, что данный сайт фосфорилирования играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации и опухолевого роста.

#### Материалы и методы

С процедурами культивирования клеток, продукции ретровирусов и инфекции можно ознакомиться в источнике [3].

##### Опухолевые аллографты.

Клетки MEF, конститутивно экспрессирующие дикий тип или S1235A- или S1235D-формы риктора трансформировали сверхэкспрессией H-Ras. Белковые экстракты клеточных линий содержали равное количество риктора и H-Ras, что определяли при помощи Вестерн блоттинга. Клетки MEF ( $5 \times 10^6$  на мыш) прививали подкожно в верхний боковой участок шестинедельных иммунодефицитных голых мышей ( $n = 5$  для каждой группы). Опухоли измеряли через 15 дней. Объем опухоли определяли по стандартной формуле  $L \times W^2 \times 0.5$ , где L - длинная ось, а W - короткая ось в миллиметрах.

#### Результаты и обсуждение

В результате наших предыдущих исследований мы установили, что предотвращение GSK3 $\beta$ -зависимого фосфорилирования риктора по Ser1235 повышает способность mTORC2 фосфорилировать Akt по Ser473. Поскольку Akt регулирует клеточную пролиферацию, мы заключили, что мутант риктора S1235A способен в большей степени стимулировать размножение клеток по сравнению с риктором дикого типа или его S1235D-мутантом. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали скорости пролиферации нокаутных по риктору клеток MEF, стабильно экспрессирующих риктор дикого типа или его фосфо-мутанты. Скорость пролиферации MEF, экспрессирующих риктор дикого типа, была в 2.27 раз выше, чем в негативном контроле, но на 30% ниже, чем у клеток с S1235A-риктором (Рис. 1А). Клетки, экспрессирующие S1235D-риктор, делились

медленнее обеих линий (в 1.83 раза быстрее негативного контроля и на 50% медленнее клеток с риктором дикого типа) (Рис. 1А). Тот факт, что клеточные линии, экспрессирующие S1235A-форму риктора, пролиферируют в два раза быстрее по сравнению с клетками, экспрессирующими S1235D-мутант, говорит о том, что сайт Ser1235 важен в GSK3 $\beta$ -опосредованной регуляции клеточной пролиферации.

Для подтверждения наших результатов в *in vivo*-модели, мы изучили влияние фосфорилированности риктора по Ser1235 на подкожный опухолевый рост. Для создания прививаемых опухолей мы трансформировали клетки MEF, экспрессирующие дикий или мутантный типы риктора, сверхэкспрессией онкогена Ras. Мыши, которым прививались трансформированные клетки с S1235A-риктором, обладали более крупными опухолями по сравнению с мышами, привитыми клетками с риктором дикого типа. Клетки, экспрессирующие S1235D-форму риктора, развивались в опухоли меньшего, по сравнению с клетками с диким и S1235A- типами, размера (Рис. 1А и С).

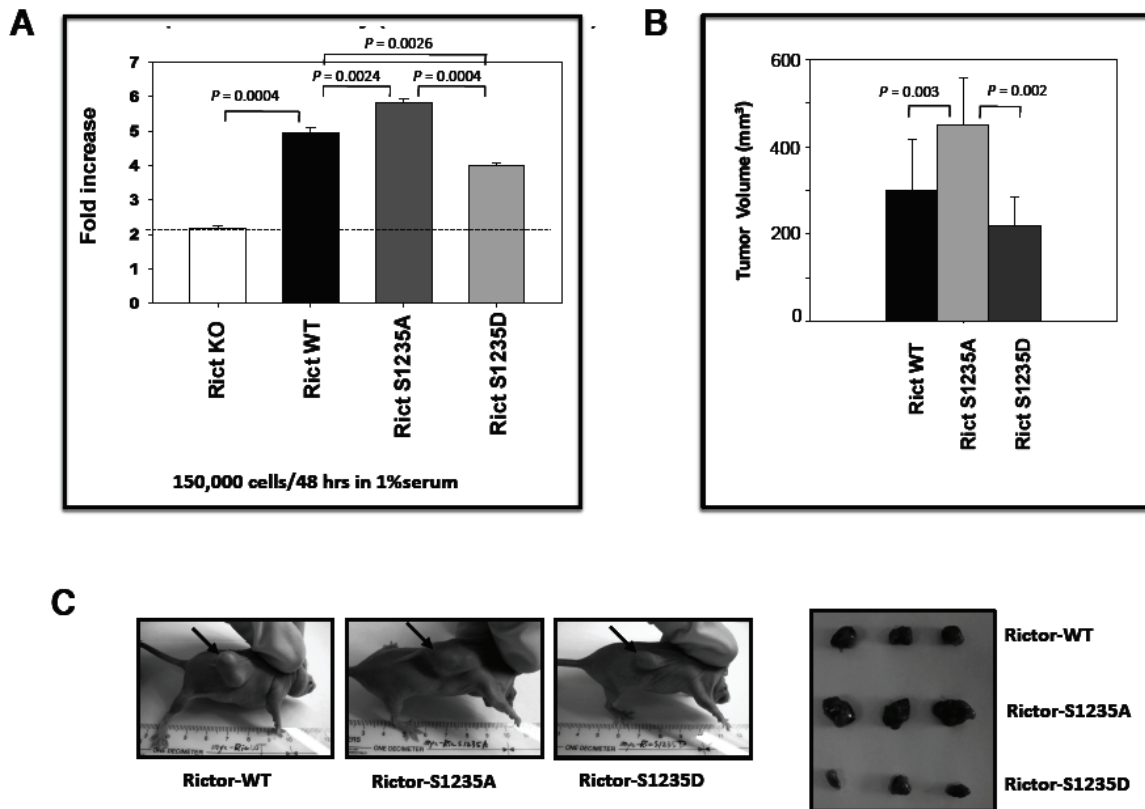


Рисунок 1 - Фосфорилирование риктора по Ser1235 ингибирует клеточную пролиферацию и опухолевый рост. (А) Риктор дикого типа или его фосфо-мутанты реинтродуцировались в нокаутные по риктору клетки MEF путем лентивирусной инфекции. Измерение скорости пролиферации проводилось путем подсчета клеток спустя 48 часов инкубации в условиях низкого содержания сыворотки в среде. (В) Нокаутные по риктору клетки MEF, стабильно экспрессирующие риктор дикого типа или его фосфо-мутанты, были трансформированы путем сверхэкспрессии онкогенной формы H-Ras и прививались подкожно шестинедельным иммунодефицитным голым мышам (n = 5 на каждую группу, 5 × 10<sup>6</sup> клеток на мышь). Размер опухолей измерялся через 15 дней. Количественное выражение объемов опухолей представлено на гистограмме. Фотографии опухолей представлены в панели (С).

Таким образом мы показали, что сайт фосфорилирования риктора Ser1235 играет важную роль в процессах клеточной пролиферации и опухолевого роста.

#### Литература

- 1 Shaw R.J., Cantley L.C., Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430 (2006).
- 2 Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101 (2005).
- 3 Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101 (2005).

### Тұжырым

Эукариоттарда өсу факторлары анаболитикалық үрдістерді жандандырады, сонымен қатар фосфоинозитид 3-киназа (PI3K) және Akt сигналдық жүйелері арқылы клетканың ұлғаюы мен пролиферациясын реттейді. Гликоген синтаза 3β (GSK3β) киназасының Akt әсерінен фосфорлануы GSK3β белсенділігін тежейді, нәтижесінде гликоген синтезі артады. Клеткалық стресс барысында GSK3β mTORC2 комплексінің негізгі компоненті рикторды Ser1235 бойынша фосфорлайды. Осы жұмыста біздер бұл сайттың жасуша пролиферациясы және ісіктің өсуі үшін маңызды екенін айқындадық.

### Summary

Growth factor signaling promotes anabolic processes and stimulates cell growth, proliferation, and survival by activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. Akt phosphorylation of GSK3β inhibits its enzymatic activity and stimulates glycogen synthesis. GSK3β itself is a negative regulator of Akt that acts by controlling mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), one of the activating kinases of Akt. Under stress conditions the mTORC2 component rictor is highly phosphorylated by GSK3β on its Ser-1235 site. This phosphorylation event caused inhibition of the mTORC2 kinase activity. In this paper we show that this phosphorylation site is important for cell proliferation and tumor growth.

УДК 577.2.04

Чен Ч.Х.<sup>1,2</sup>, Шайкенов Т.<sup>1</sup>, Петерсон Т.Р.<sup>3,4</sup>, Аимбетов Р.<sup>1,5</sup>, Ли С.В.<sup>1,2</sup>, Ву Ч.<sup>1</sup>,  
Лин Х.К.<sup>1,2</sup>, Бисенбаев А.К.<sup>5</sup>, Сарбасов Д.Д.<sup>1,2</sup>

### GSK3β-ЗАВИСИМОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РИКТОРА ПО Ser1235 ПРЕПЯТСТВУЕТ СВЯЗЫВАНИЮ Akt С mTORC2

<sup>1</sup>Department of Molecular and Cellular Oncology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA;

<sup>2</sup>The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX 77030, USA;

<sup>3</sup>Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA 02142, USA;

<sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA;

<sup>5</sup>Кафедра генетики и молекулярной биологии, Казахский Национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

*У эукариот ростовые факторы стимулируют анаболические процессы и регулируют клеточный рост и пролиферацию посредством активации сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt. Фосфорилирование киназы гликоген синтазы 3β (GSK3β) киназой Akt ингибирует ферментативную активность GSK3β, стимулируя синтез гликогена. Известно, что GSK3β в свою очередь ингибирует Akt подавляя киназную активность mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) путем стресс-зависимого фосфорилирования одного из компонентов mTORC2 - риктора - по сайту Ser1235. В данной работе мы показали, что данное фосфорилирование нарушает связывание mTORC2 с его субстратом - Akt.*

### Введение

Фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*) и Akt являются участниками важного сигнального пути, задействованного в регуляции таких процессов, как пролиферация, метаболизм и апоптоз [1]. Связывание ростовых факторов с их рецепторами на внешней поверхности плазматической мембраны инициирует димеризацию и взаимное фосфорилирование рецепторов по остаткам тирозина. Связывание регуляторной субъединицы PI3K – p85 – с фосфо-сайтами цитоплазматического домена димеризованного рецептора приводит к активации данной киназы, основной функцией которой является превращение фосфатидилинозитол-4,5-фосфатов в фосфатидил-3,4,5-фосфаты (PIP3), т. е. проявление липидкиназной активности. PIP3 стимулирует перемещение Akt: PH (*pleckstrin homology*)-домен Akt обеспечивает связывание с PIP3, в результате которого Akt оказывается на плазматической мембране, где фосфорилируется по остаткам Thr308 и Ser473 киназой PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) [3, 4] и mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) соответственно [5].

mTOR - это протеинкиназа, функционирующая в качестве центрального звена важного консервированного сигнального пути. Биохимические исследования выявили, что mTOR и взаимодействующие с ним белки mLST8 и DEPTOR существуют как минимум в виде двух разных комплексов. Связывание раптора (rapTOR, regulatory associated protein of mTOR) с mTOR определяет первый, чувствительный к питательным веществам, комплекс (mTORC1), который регулирует синтез белка путем фосфорилирования S6 киназы 1 (S6K1) и eIF4E-связывающего белка 1 (4E-BP1). Второй комплекс, mTORC2, образуется при присоединении к mTOR белков риктор (rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR) и SIN1 (*stress-activated protein kinase*