

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.05.102>

УДК 616.379-008.64-002:577.2

**Т.С. Вацеба¹, Л.К. Соколова², В.В. Пушкарьов²,
О.І. Ковзун², В.М. Пушкарьов², М.Д. Тронько²**

¹ ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”

² ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Фосфорилування PRAS40 у лейкоцитах хворих на рак та діабет

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.Д. Троньком

Вивчено активність mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) у лейкоцитах хворих на рак та діабет методом імуноферментного аналізу. Показано, що у лейкоцитах хворих на рак та діабет 2-го типу фосфорилування інгібітора mTORC1 – PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa) зростає, що свідчить про активацію кінрази, яка відіграє важливу роль у формуванні інсулінорезистентності та прогресії пухлин. Проте у хворих і на рак, і на діабет фосфорилування PRAS40 та, відповідно, активність mTORC1 істотно знижується порівняно з контролем. Обговорюються механізми активації mTORC1 та її значення за умов розвитку раку та діабету.

Ключові слова: діабет 2-го типу, рак, mTORC1, PRAS40.

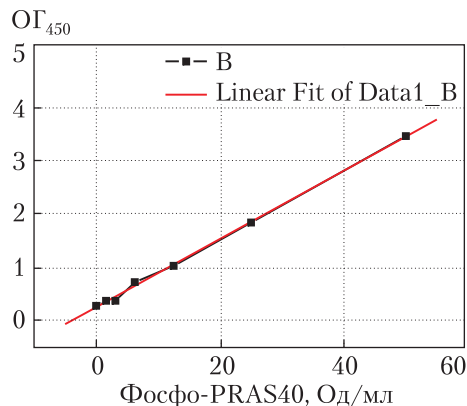
Протеїнкінназа mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) керує ростом клітин та гомеостазом, у тому числі синтезом білка, ліпогенезом, обміном глюкози, аутофагією, біогенезом лізосом, проліферацією та виживанням, у відповідь на сигнали середовища, такі як рівень амінокислот, глюкози, енергії та кисню і фактори росту [1]. Порушення регуляції каскаду PI3K-AKT-mTOR призводить до важких захворювань, таких як рак і діабет 2-го типу (Д2Т).

Субстрат Akt1-1 (AKT1S1), більше відомий як багатий на пролін субстрат Akt з масою 40 кДа (PRAS40), є компонентом сигнального каскаду PI3K/Akt/mTORC1. PRAS40 входить до складу mTORC1 і є його негативним регулятором [2]. Підвищений рівень фосфорилування PRAS40 було виявлено в кількох типах пухлин [3]. Також PRAS40 бере участь у регулюванні чутливості до інсуліну [4].

Існують дві ізоформи білка PRAS40 з довжиною поліпептидного ланцюга 276 (ізоформа А) та 256 (ізоформа В) амінокислот. На N-кінці є дві багатих проліном ділянки з ще не визначеною функцією. Далі йдуть дві короткі послідовності: TOS (TOR-сигналінг) і RAIP (названа за її послідовністю) – мотиви, що опосередковують взаємодію з mTORC1 [5]. Обидві ізоформи на карбоксильному кінці білка також містять збагачену лейцином по-

© Т.С. Вацеба, Л.К. Соколова, В.В. Пушкарьов, О.І. Ковзун, В.М. Пушкарьов, М.Д. Тронько, 2019

Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення фосфорильованого по Thr246 PRAS40



слідовність NES, що відповідає за експорт з ядра [6]. PRAS40 фосфорильється по декількох сайтах. Akt та Pim-1 фосфорильють Thr266/Thr246 (відповідно ізоформи А і В), інші сайти фосфорильовання пов'язані з mTORC1 [7].

Білок експресується повсюдно і виявляється як у цитозолі, так і в ядрі. Транспорт з ядра в цитозоль опосередковується ділянкою NES [6].

PRAS40 діє як інгібітор активності mTORC1. Його фосфорильовання призводить до дисоціації PRAS40 з Raptor в комплексі mTOR, що сприяє активації кінази mTOR [5]. Однак нокаут PRAS40 порушує фосфорильовання субстратів mTORC1 у певних типах клітин, що вказує на важливість PRAS40 для сигналіngu mTORC1 через ще не з'ясовані механізми [8].

За мету дослідження ставилося вивчення активації mTORC1 шляхом фосфорильовання PRAS40 як кінази, що бере участь у патогенезі діабету та раку.

Матеріали і методи. Дослідження проводилося на базі відділу діабетології ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”. Усі пацієнти підписували інформовану згоду на використання біоматеріалів у подальших діагностичних та наукових дослідженнях. Відразу ж після забору кров центрифугували, використовуючи Histopaque 1077 (“Sigma”, США), отримані лейкоцити промивали і заморожували при -80°C до використання. Для визначення кількості фосфо-PRAS40 (ф-Thr246) використовували набори для імуноферментного аналізу KHO0421 фірми “Invitrogen” (США). Клітини лізували в буфері для екстракції з набору, що містив інгібітори протеаз і фосфатаз. Дослідження проводилися в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів (BCA protein assay kit) фірми “Novagen” (США). Вимірювання проводили на мікропланшетному рідері фірми “Bio-tek Instruments” (США) при довжині хвилі 450 нм.

Калібрувальна крива (рис. 1) свідчить про хороше узгодження експериментальної кривої з теоретичною.

Результати експериментів наведені як $M \pm \text{Std}$, $n = 6 \div 15$. Для порівняння двох груп даних використовували t -критерій Стьюдента.

Результати і обговорення. Для дослідження були сформовані такі групи: 1, контрольна — здорові люди, репрезентативні за віком; 2 — хворі на Д2Т; 3 — хворі на рак; 4 — хворі на рак та Д2Т.

До складу лейкоцитів входять моноцити/макрофаги (до 11 % загальної кількості лейкоцитів) та лімфоцити (до 40 %), що беруть участь у процесах клітинного та гуморального імунітету. PI3K/Akt/mTORC1 — сигнальний каскад, який значною мірою визначає функціонування цих клітин крові у хворих на діабет та рак [9, 10].

Вміст фосфорильованого PRAS40 вірогідно зростає в лейкоцитах хворих на Д2Т (рис. 2, 2), що свідчить про активацію mTORC1. Кількість фосфо-PRAS40-позитивних препаратів у хворих на Д2Т становить 83,3 %, а у хворих на рак — 66,7 %.

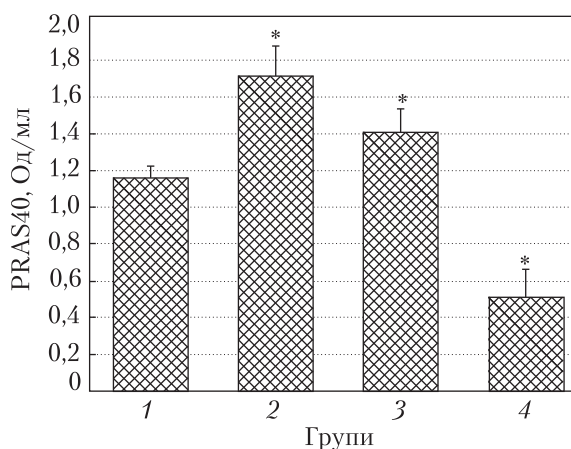


Рис.2. Кількість фосфорильованого по Тре246 PRAS40 у хворих на рак та діабет. 1 – контроль ($n = 6$); 2 – хворі на діабет 2-го типу ($n = 12$); 3 – хворі на рак ($n = 15$); 4 – хворі на рак та діабет ($n = 7$). $M \pm Std$, * – відмінності від контрольної групи вірогідні, $P < 0,05$.

Фосфорильованого PRAS40 у хворих на Д2Т, напевно, визначається співвідношенням ефектів метформіну та інсуліну, які приймали практично всі хворі. Метформін знижує активність mTORC1 але, з іншого боку, покращує сигналінг інсуліну. Інсулін активує mTORC1 через сигнальний каскад PI3K/Akt/mTORC1 і пригнічує активацію метформіном AMPK [12], яка, в свою чергу, інгібує mTORC1. Підсумковим результатом взаємодії цих препаратів та індукованих ними сигнальних механізмів, очевидно, є посилення фосфорильовання інгібітора mTORC1 – PRAS40.

У лімфоцитах хворих на рак також спостерігали посилення фосфорильовання PRAS40 (див. рис. 2, 3), а отже, і активності mTORC1. Гіперактивація mTORC1 часто відбувається на фоні спорадичного раку. У декількох типах пухлин виявлено підвищення рівня фосфорильовання PRAS40 [13], що пов'язано з посиленням активності кіназ, таких як Akt, Pim-1 та mTORC1. Прискорення трансляції, зумовлене аберантною активацією mTORC1, призводить до збільшення розміру клітин та проліферації – двох загальних ознак раку, а пошук інгібіторів mTORC1 вважається перспективним напрямом для терапії онкологічних захворювань [14]. З цієї точки зору посилення активності mTORC1 у лейкоцитах викликає значний інтерес, оскільки може слугувати діагностичним маркером захворювання.

Деякі функції PRAS40, такі як регуляція реакції нуклеолярного стресу, протеасомної активності та виживаності клітин, дають підставу припустити, що PRAS40 може брати участь у прогресії злоякісних пухлин. Фосфорильований PRAS40-Тре246 може також бути біомаркером для прогнозування чутливості до інгібіторів Akt у разі ракових захворювань [3].

Несподіваним виявилось зниження кількості фосфо-PRAS40 у лейкоцитах хворих і на рак, і на діабет (див. рис. 2, 4). Отже, у хворих останньої групи активність mTORC1 у лейкоцитах може виявитись пригніченою порівняно з контролем та, особливо, з групами хворих на діабет і рак (див. рис. 2, 2 і 3). Ймовірним поясненням такого пригнічення може бути конкуренція за спільні сигнальні механізми. Не виключена також антагоністична взаємодія між двома основними каскадами, що контролюють проліферативні процеси – PI3K/Akt та MAPK. Відомо, що сигнальний шлях MAPK/ERK також може активувати mTORC1 шляхом фосфорильовання як TSC2, так і PRAS40, що призводить до дисоціації з Raptor і сприяє активації mTORC1 [14]. Доведено також, що надлишок інсуліну на фоні Д2Т стимулює проліферативні процеси і злоякісну трансформацію через каскад Ras/MAPK/ERK1/2 [15].

Таким чином, стан фосфорилування PRAS40 у лейкоцитах може свідчити про активність mTORC1 та її субстратів, що може бути важливим для оцінки патологічного процесу та ефективності лікарських препаратів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Yang J., Nishihara R., Zhang X. et al. Energy sensing pathways: Bridging type 2 diabetes and colorectal cancer? *J. Diabetes Complications*. 2017. **31**, № 7. P. 1228–1236.
2. Wang H., Zhang Q., Wen Q. et al. Proline-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40): a novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. *Cell Signal*. 2012. **24**, № 1. P. 17–24.
3. Andersen J.N., Sathyanarayanan S., Di Bacco A. et al. Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 2010. **2**, № 43. 43ra55. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001065>
4. Wiza C., Chadt A., Blumensatt M. et al. Over-expression of PRAS40 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle. *Arch. Physiol. Biochem.* 2014. **120**, № 2. P. 64–72.
5. Oshiro N., Takahashi R., Yoshino K. et al. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J. Biol. Chem.* 2007. **282**, № 28. P. 20329–20339.
6. Havel J.J., Li Z., Cheng D., Peng J., Fu H. Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene*. 2014. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2014.91>
7. Wiza C., Nascimento E.B.M., Ouwens M.D. AKT1S1 (AKT1 substrate 1 (proline-rich)). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 2015. **19**, № 12. P. 679–683.
8. Hong-Brown L.Q., Brown C.R., Kazi A.A. et al. Alcohol and PRAS40 knockdown decrease mTOR activity and protein synthesis via AMPK signaling and changes in mTORC1 interaction. *J. Cell. Biochem.* 2010. **109**, № 6. P. 1172–1184.
9. Dituri F., Mazzocca A., Giannelli G., Antonaci S. PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2011. 947858. doi: <https://doi.org/10.1155/2011/947858>
10. De Oliveira C.E., Oda J.M., Losi Guembarovski R. et al. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis. Markers*. 2014. 126954. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/126954>
11. Пушкарев В.М., Соколова Л.К., Пушкарев В.В., Тронько Н.Д. Роль AMPK и mTOR в развитии инсулинорезистентности и диабета 2 типа. Механизм действия метформина (обзор литературы). *Пробл. ендокрин. патології*. 2016. № 3. С. 77–90.
12. Sokolova L.K., Pushkarev V.M., Belchina Y.B., Pushkarev V.V., Tronko N.D. Effect of combined treatment with insulin and metformin on 5'AMP-activated protein kinase activity in lymphocytes of diabetic patients. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2018. № 5. С. 100–104. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.05.100>
13. Jiang N., Hjorth-Jensen K., Hekmat O. et al. In vivo quantitative phosphoproteomic profiling identifies novel regulators of castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene*. 2015. **34**, № 32. P. 2764–2776. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2014.206>
14. Kim L.C., Cook R.S., Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2017. **36**, № 16. P. 2191–2201. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>
15. Пушкарев В.М., Соколова Л.К., Пушкарев В.В., Тронько Н.Д. Биохимические механизмы, связывающие диабет и рак. Действие метформина. *Эндокринология*. 2018. 23, № 2. С. 167–179.

Надійшло до редакції 28.01.2019

REFERENCES

1. Yang, J., Nishihara, R., Zhang, X. et al. (2017). Energy sensing pathways: Bridging type 2 diabetes and colorectal cancer? *J. Diabetes Complications*, 31, No. 7, pp. 1228-1236.
2. Wang, H., Zhang, Q., Wen, Q. et al. (2012). Proline-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40): a novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. *Cell Signal*, 24, No. 1, pp. 17-24.
3. Andersen, J. N., Sathyanarayanan, S., Di Bacco, A. et al. (2010). Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: personalized oncology with PI3K pathway inhibitors. *Sci. Transl. Med.*, 2, No. 43, 43ra55. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001065>

4. Wiza, C., Chadt, A., Blumensatt, M. et al. (2014). Over-expression of PRAS40 enhances insulin sensitivity in skeletal muscle. *Arch. Physiol. Biochem.*, 120, No. 2, pp. 64-72.
5. Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K. et al. (2007). The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J. Biol. Chem.*, 282, No. 28, pp. 20329-20339.
6. Havel, J. J., Li, Z., Cheng, D., Peng, J. & Fu, H. (2014). Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene*. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2014.91>
7. Wiza, C., Nascimento, E. B. M. & Ouwens, M. D. (2015). AKT1S1 (AKT1 substrate 1 (proline-rich)). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 19, No. 12, pp. 679-683.
8. Hong-Brown, L. Q., Brown, C. R., Kazi, A. A. et al. (2010). Alcohol and PRAS40 knockdown decrease mTOR activity and protein synthesis via AMPK signaling and changes in mTORC1 interaction. *J. Cell. Biochem.*, 109, No. 6, pp. 1172-1184.
9. Dituri, F., Mazzocca, A., Giannelli, G. & Antonaci, S. (2011). PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 947858. doi: <https://doi.org/10.1155/2011/947858>
10. De Oliveira, C. E., Oda, J. M., Losi Guembarovski, R. et al. (2014). CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis. Markers.*, 126954. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/126954>
11. Pushkarev, V. M., Sokolova, L. K., Pushkarev, V. V. & Tronko, M. D. (2016). The role of AMPK and mTOR in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The mechanism of metformin action (literature review). *Probl. Endocrin. Pathol.*, No. 3, pp. 77-90 (in Russian).
12. Sokolova, L. K., Pushkarev, V. M., Belchina, Y. B., Pushkarev, V. V. & Tronko, N. D. (2018). Effect of combined treatment with insulin and metformin on 5'AMP-activated protein kinase activity in lymphocytes of diabetic patients. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 5, pp. 100-104. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.05.100>
13. Jiang, N., Hjorth-Jensen, K., Hekmat, O. et al. (2015). In vivo quantitative phosphoproteomic profiling identifies novel regulators of castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene*, 34, No. 32, pp. 2764-2776. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2014.206>
14. Kim, L. C., Cook, R. S. & Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36, No. 16, pp. 2191-2201. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>
15. Pushkarev, V. M., Sokolova, L. K., Pushkarev, V. V. & Tronko, M. D. (2018). Biochemical mechanisms connecting diabetes and cancer. Effects of metformin. *Endokrynologia*, 23, No. 2, pp. 167-179 (in Russian).

Received 28.01.2019

*Т.С. Вацеба*¹, *Л.К. Соколова*², *В.В. Пушкарёв*²,
*О.И. Ковзун*², *В.М. Пушкарёв*², *М.Д. Тронько*²

¹ ГВУУ "Ивано-Франковский национальный медицинский университет"

² ГУ "Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко
НАМН Украины", Киев

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ PRAS40 В ЛЕЙКОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ И ДИАБЕТОМ

Изучена активность mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) в лейкоцитах больных раком и диабетом методом иммуноферментного анализа. Показано, что в лейкоцитах больных раком и диабетом 2-го типа фосфорилирование ингибитора mTORC1 — PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40kDa) возрастает, что свидетельствует об активации киназы, которая играет важную роль в формировании инсулино-резистентности и прогрессии опухолей. Однако у больных и раком, и диабетом фосфорилирование PRAS40 и, соответственно, активность mTORC1 существенно снижается по сравнению с контролем. Обсуждаются механизмы активации mTORC1 и ее значение при раке и диабете.

Ключевые слова: диабет 2-го типа, рак, mTORC1, PRAS40.

T.S. Vatseba ¹, L.K. Sokolova ², V.V. Pushkarev ²,
O.I. Kovzun ², V.M. Pushkarev ², M.D. Tronko ²

¹ Ivano-Frankivsk National Medical University

² V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism
of the NAMS of Ukraine”, Kiev

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

PHOSPHORYLATION OF PRAS40 IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH CANCER AND DIABETES

We have studied the activity of mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) in leukocytes of patients with cancer and diabetes by immuno-enzyme analysis. It has been shown that, in the leukocytes of patients with cancer and type 2 diabetes, the phosphorylation of the mTORC1 inhibitor – PRAS40 (proline-rich substrate 40kDa) increases, which indicates the activation of kinase, which plays an important role in the formation of the insulin resistance and tumor progression. However, in patients with cancer and diabetes, the phosphorylation of PRAS40 and, accordingly, the activity of mTORC1 are significantly reduced as compared with the control. The mechanisms of mTORC1 activation and its significance for cancer and diabetes are discussed.

Keywords: *type 2 diabetes, cancer, mTORC1, PRAS40.*