

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ P70S6K В КЛІТИНАХ КРОВІ
ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ**»

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Білецька Аліна Анатоліївна

Керівники:
Пушкарьов В.В.,
кандидат біологічних наук, науковий
співробітник Інституту ендокринології та
обміну речовин ім. В.П. Комісаренка
НАМН України
Антонюк М.З.,
доктор біологічних наук,
професор кафедри біології НаУКМА

Рецензент
Соколова Л.К.,
д.м.н., с.н.с. Інституту ендокринології та
обміну речовин ім. В.П. Комісаренка
НАМН України

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
«__» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Патофізіологія цукрового діабету II типу	7
1.2. Внутрішньоклітинні механізми дії інсуліну	10
1.2.1. Інсулін та його рецептор	10
1.2.2. Субстрати інсулінового рецептора	12
1.2.3. Характеристика PI3K/Akt/mTOR сигнального шляху.....	13
1.2.4. Регуляція активності p70S6k.....	19
1.3. Потенційні механізми формування резистентності до інсуліну.....	25
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
2.2. Виділення моноклеарних клітин	28
2.3. Метод Бредфорда для визначення кількості білку	29
2.4. Тест ELISA для встановлення концентрації p70S6k	30
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Кількісне визначення білку методом Бредфорда	33
3.2. Визначення концентрації p70S6k та фосфо-p70S6k за допомогою імуноферментного аналізу.....	35
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	40
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Akt (PKB)	- протеїнкіназа B (<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>B</u> , PKB)
AMPK	- кіназа, яка активується АМФ (<u>A</u> MP-activated <u>k</u> inase, AMPK)
ELISA	- твердофазний імуноферментний аналіз (<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay, ELISA)
IR	- інсуліновий рецептор (<u>I</u> nsulin <u>r</u> ecceptor, IR)
IRS	- субстрат інсулінового рецептора (<u>I</u> nsulin <u>r</u> ecceptor <u>s</u> ubstrate, IRS)
MAPK	- мітоген-активована протеїнкіназа (<u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase, MAPK)
mTOR	- мішень рапаміцину у ссавців (<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin kinase, mTOR)
mTORC1	- мішень рапаміцину комплексу 1 (<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin <u>c</u> omplex <u>1</u> , mTORC1)
mTORC2	- мішень рапаміцину комплексу 2 (<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f rapamycin <u>c</u> omplex <u>2</u> , mTORC2)
p70S6k	- рибосомальна протеїнкіназа S6 70 кДа (<u>p</u> 70 ribosomal <u>S</u> 6 <u>k</u> inase, p70S6k)
PDK1	- фосфоінозитид-залежна кіназа 1 (<u>P</u> hosphoinositide- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase <u>1</u> , PDK1)
PH	- домену гомології плекстрину (<u>P</u> leckstrin <u>h</u> omology domain, PH)
PI3K	- фосфатидилінозитол 3-кіназа (<u>P</u> hospho <u>i</u> nositide <u>3</u> - <u>k</u> inases, PI3K)
Raptor	- білок, регуляторно асоційований з mTOR (<u>R</u> egulatory <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein of m <u>T</u> OR, Raptor)

- rpS6 - рибосомний білок S6 (**R**ibosomal **p**rotein S6)
- S6k - рибосомальна протеїнкіназа S6 (Ribosomal protein **S6**
kinase, S6k)
- SH2 - домен Src-гомології 2 (**S**rc-**h**omology-**2** domain, SH2)
- БСА - бичачий сироватковий альбумін
- ЦД II - цукровий діабет II типу

ВСТУП

Цукровий діабет є одним з найпоширеніших у світі хронічних захворювань. Останнім часом ця недуга стала вивчатися як соціальна проблема, що стає все більш актуальною. На форму II типу припадає близько 90-95% всіх пацієнтів з діабетом та вважається, що до 2030 року на дане захворювання страждатимуть близько 439 мільйонів людей [2].

Цукровий діабет II типу є складним гетерогенним захворюванням, яке характеризується деструкцією β -клітин підшлункової залози і резистентністю до інсуліну. Стійкість до інсуліну є патологічним станом, при якому тканини-мішені не реагують на нормальний рівень гормону. Зазвичай, пацієнти з даною формою діабету схильні до ожиріння, і глобальна епідемія пояснює різке збільшення частоти і поширення захворювання. При цукровому діабеті II типу розвиваються деякі ускладнення, які призводять до серцево-судинних захворювань, діабетичної невропатії, нефропатії, ретинопатії, раку [2,3].

Дане захворювання є однією із великих глобальних проблем в XXI столітті. Після зростання випадків захворювання на цукровий діабет II типу, основне значення в дослідженнях приділяють розумінню шляху передачі сигналів інсуліну [3].

Регуляція інсулін-опосередкованого метаболізму глюкози за допомогою PI3K/Akt/mTORC1/p70S6k є ключовим в захворюванні. Білки, які беруть участь в даному сигнальному шляху, відіграють важливу роль в молекулярних механізмах, які призводять до розвитку резистентності [17].

Рибосомальна S6 кіназа регулює різні клітинні процеси, включаючи синтез білку, виживання та ріст клітин. p70s6k є низхідним ефектором PI3K і потенційним кандидатом на негативну регуляцію субстратів інсулінового рецептору (IRS). Комплекс mTORC1 хронічно активуються після надмірного поглинання глюкози або амінокислот, таким чином p70S6k збільшує фосфорилювання IRS-1 по Ser, що негативно корелює з регуляцією передачі сигнала.

лів інсуліну. Такі фосфорилювання можуть спровокувати дисоціацію IRS від IR з інгібуванням низхідних ефекторів [34,39].

Метою роботи було дослідження активності кінцевої ланки каскаду PI3K/Akt/ mTORC1/p70S6k у мононуклеарних клітинах крові хворих на цукровий діабет 2 типу. Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Виділити мононуклеарні клітини з крові здорових та хворих на цукровий діабет 2 типу.
2. Встановити концентрацію білку в мононуклеарних клітинах крові здорових та хворих на цукровий діабет 2 типу.
3. Визначити кількість p70S6k та фосфор-p70S6k в клітинному лізаті за допомогою методу імуноферментного аналізу.

Експериментальна частина роботи виконувалася в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка НАМН України

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патофізіологія цукрового діабету II типу. Існує дві форми захворювання, інсулінозалежний цукровий діабет I типу та інсулінонезалежний діабет II типу [2].

Діабет II типу є складним гетерогенним захворюванням, яке характеризується деструкцією β -клітин підшлункової залози і резистентністю до інсуліну. Резистентність першочергово розвивається в м'язових тканинах. Це сигналізує β -клітинам утворювати більше інсуліну для підтримання гомеостазу глюкози. Робота клітин порушується, відбувається неадекватна секреція інсуліну і, як наслідок, формується гіперглікемія. У свою чергу, гіперглікемія сприяє подальшій деструкції клітин підшлункової залози [1,2,3].

Резистентність до інсуліну є поширеним патологічним станом, при якому тканини-мішені не реагують на нормальний рівень інсуліну. Рівень вперше описав метаболічний синдром. Клінічно він визначається наявністю принаймні трьох з наступних станів: гіпертонія, підвищений рівень цукру в крові натщесерце, ожиріння, низький рівень холестерину ЛПВЩ та високий рівень тригліцеридів [4].

До патогенних процесів, що призводять до розвитку гіперглікемії належать: підвищення утворення глюкози в печінці, зниження поглинання глюкози скелетними м'язами та збільшення секреції глюкагону. Інкретини є глюкагонподібними пептидами [GLP-1] та шлунковими інгібуючими поліпептидами [GIP], що звільняються з кишечника у відповідь на приймання їжі та стимулюють секрецію інсуліну. При цукровому діабеті II типу спостерігається порушення виділення інкретинів, що може розглядатися як вторинний процес розвитку хвороби. Крім того, у нирках підвищується рівень рецепторів SGLT2, що призводить до підсиленої реабсорбції глюкози [1,5].

Патологічна резистентність до інсуліну розвивається в результаті складних взаємодій генотипу і способу життя (переїдання та відсутність фізичної активності). Чутливість до інсуліну в тканинах-мішенях регулюється циркулюючими факторами. До цих факторів належать ліпіди плазми, циркулюючі гормон і адипокіни та їхні відповідні сигнальні шляхи. Резистентність характеризується зниженням чутливості до інсуліну у таких клітин: міоцити, адипоцити, гепатоцити та β -клітини підшлункової залози [5,6].

Було виявлено близько 50 генів, що пов'язані з підвищеним ризиком діабету II типу, і більшість із них призводять до дефектів функції β -клітин. За допомогою технології дослідження геномних асоціацій (GWAS) у 2007 році відбувся прорив у ідентифікації генів, які відповідальні за розвиток цукрового діабету 2 типу. Відомо, що сильний зв'язок з розвитком захворювання мають однонуклеотидні поліморфізми в генах *TCF7L2*, *SLC30A8*, *FTO*, *CDKAL1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *HHEX*, *IGF2B2*, *GCKR*, *KCNJ11*, *MTNR1B*, *PPARG2* [2,3].

Відомо, що *KCNJ11* кодує острівцеві АТФ-чутливі калієві канали; *TCF7L2* регулює експресію гена проглюкагона; *IRS-1* впливає на дію інсуліну; *MTNR1B* корелює з ендогенним лігандом – мелатоніном, який опосередковує циркадні ритми і впливає на метаболічну регуляцію; *PPARG2* контролює транскрипційний фактор для диференціювання адипоцитів; *IGF2B2* задіяний у розвитку підшлункової залози; *HHEX* впливає на розвиток β -клітин. Крім того, багато із даних локусів є терапевтичними мішенями для лікарських препаратів від ЦД II, наприклад, *KCNJ11* та *PPARG2* є мішенями для препаратів сульфонілсечовини та тіазолідиндіона відповідно [2].

На розвиток ЦД II важливе значення має спосіб життя. Зазвичай, пацієнти з діабетом II типу страждають ожирінням, і глобальна епідемія пояснює різке збільшення частоти і поширення захворювання. Не тільки ступінь ожиріння впливає на розвиток діабету, а й місце накопичення жиру. Відкладення у верхній частині тіла, включаючи вісцеральне ожиріння, пов'язані з метаболічним синдромом, діабетом II типу та серцево-судинними захворюваннями.

Відомо три механізми, що пов'язані з ожирінням і цукровим діабетом: підвищення продукції адипокінів, включаючи фактор некрозу пухлини- α , ретинол-зв'язуючий білок 4, які сприяють формуванню резистентності до інсуліну та зниженню концентрації адипонектину; мітохондріальна деструкція; відкладення жиру в печінці, скелетних м'язах [2,7,8].

Існує низка даних, які засвідчують, що вітамін D може відігравати потенційну роль у боротьбі з ЦД II. Відомо, що у пацієнтів виявлені сезонні коливання, при яких гіповітаміноз D, часто виникає зимою та викликає загострення. Дефіцит вітаміну D може негативно впливати на секрецію інсуліну безпосередньо через активацію рецептора вітаміну (VDR), або через гормони, що викликають кальціємію, а також через запалення. Крім того, вітамін впливає на чутливість до інсуліну, контролюючи потік кальцію через мембрану як у β -клітинах, так і у тканинах-мішенях [2].

При цукровому діабеті II типу розвиваються деякі ускладнення, які призводять до серцево-судинних захворювань, діабетичної невропатії, нефропатії, ретинопатії, раку [1-3]. Серцево-судинні захворювання є основними причинами смертності, потенційним механізмом якого є окисний стрес, який впливає на атерогенез і може призвести до окислення ліпопротеїдів низької щільності. Діабет може підвищувати ризик виникнення раку кишечника, печінки, сечового міхура, молочної залози, нирки. Гіперінсулінемія може підвищувати рівень IGF-1 (інсуліноподібний фактор 1), що позитивно корелює з ризиком виникнення раку. Крім того, ЦД II та рак мають багато спільних чинників ризику, таких як вік, ожиріння, малорухливий спосіб життя, куріння, а також деякі психологічні фактори [2].

Після зростання у всьому світі ЦД 2, основним напрямком досліджень є розуміння сигнальних шляхів інсуліну, що впливають на це захворювання.

1.2. Внутрішньоклітинні механізми дії інсуліну

1.2.1. Інсулін та його рецептор. Первинна структура інсуліну була виведена в середині 50-х років Фредом Сенгером. Інсулін – це поліпептидний гормон, який складається з двох ланцюгів – А і В, та має молекулярну масу 5800 Да. Відомо, що ланцюг А побудований з 21 амінокислоти, а ланцюг В із 30. Між собою ланцюги поєднані двома дисульфідними містками (А7-В7, А20-В19) [9,10,11].

Гормон синтезується β -клітинами острівців підшлункової залози у вигляді ланцюга із 110 амінокислот та має назву препроінсулін. За допомогою сигнальної пептидази, яка розташована на внутрішній поверхні мембрани ендоплазматичного ретикулуму, відбувається розщеплення сигнальної послідовності препогормону і після чого фермент розкладається [10].

Проінсулін збирається всередині ендоплазматичного ретикулуму, де відбувається швидке утворення дисульфідних зв'язків. Протягом 10-20 хв, проінсулін транспортується з ендоплазматичного ретикулуму до апарату Гольджі, де відбувається його пакування в незрілі секреторні гранули. Загалом інсулін синтезується за 120 хв. Далі відбувається розщеплення проінсуліну з утворенням нативного інсуліну та С-пептиду за допомогою тіолредуктази. Основною функцією С-пептиду є зв'язування С-кінця В-ланцюга з N-кінцем А-ланцюга інсуліну. Вивільнення інсуліну з гранул відбувається шляхом екзоцитозу при підвищенні концентрації глюкози в крові [10,11].

Рецептори інсуліну (IR) відносяться до родини тирозинкіназних рецепторів. У людини родина тирозинкіназних рецепторів налічує 60 членів, які розділені на 20 підродин, в залежності від структури та будови позаклітинних доменів [11,13].

Інсуліновий рецептор є гетеротетрамерним глікопротеїном. Рецептор складається з двох позаклітинних α -субодиниць та двох трансмембранних β -субодиниць, які зв'язані дисульфідними містками [13].

Налічують дві ізоформи рецептора (IR-A та IR-B), які відрізняються тим, що в IR-B наявні 12 амінокислот на С-кінці α -ланцюга, які відсутні в IR-A. IR-B активується в тканинах-мішенях інсуліну, таких як печінка, м'язи, жирова тканина, нирки. Активність IR-A спостерігається в тканинах плоду та пухлин [9,13].

Рецептор інсуліну синтезуються у вигляді одноланцюгового препроорецептора з сигнальним пептидом, який розщеплюється котрансляцією. Попередник рецептора глікозилюється котрансляційно, а потім складається та димеризується за рахунок шаперонів кальнексину та кальретикуліну. Далі попередник транспортується в апарат Гольджі, де відбувається розщеплення фурипротеазою з утворенням зрілого рецептору [13].

У позаклітинній ділянці інсулінового рецептора наявні два домени, які багаті на лейцин – L1 та L2. Розділяють лейцинові домени багаті цистеїном ділянки – CR. Було показано, що С-кінцева ділянка рецептора складається із трьох доменів фібронектину типу III - FnIII-1, FnIII-2, FnIII-3 [12]. FnIII-2 переривається вставкою з 120 амінокислот, яка має сайт розщеплення фурином, у такому випадку при розщепленні утворюються субодиниці α (135 кДа) і β (95 кДа). [12,13]. α – субодиниця знаходиться в позаклітинному просторі та має сайти зв'язування ліганду [13]. У β -субодиниці наявний трансмембранний сегмент, який відділяє позаклітинні ділянки FnIII-2 – FnIII-3 від внутрішньоклітинної тирозинкінази (рис. 1.1.) [12,13,14].

На поверхні інсуліну наявні два асиметричні сайти зв'язування з рецептором – S1 та S2. Гормон зв'язується з α -субодиницею своїм S2 сайтом між FnIII-1 та FnIII-2. Паралельно відбувається взаємодія S1 з L1-CR-CT. Це призводить до того, що у α -субодиниці між ділянками L2 та FnIII-1-FnIII-2 відбувається згинання таким чином, що домен L1-CR-CT протиставляється антипаралельно FnIII-1-FnIII-2 (рис. 1.1.) [12,16].

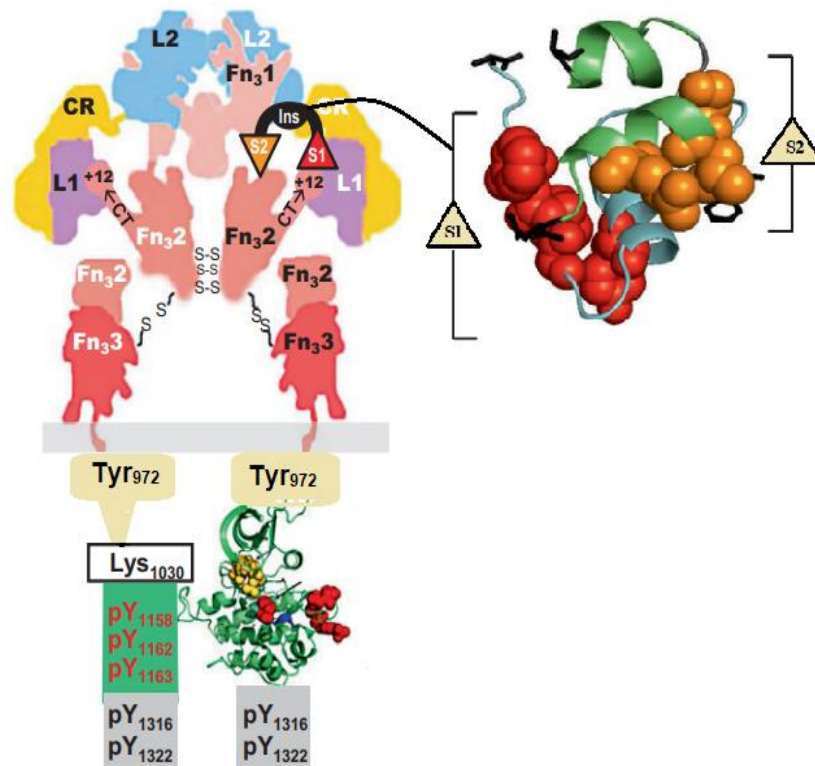


Рис. 1.1. Зв'язування інсуліну з рецептором [13].

Зв'язування інсуліну з α -субодиницею рецептора, призводить до його активації та утворення $\alpha 2\beta 2$ -комплексу в клітинній мембрані. На початкових етапах відбувається аутофосфорилування β -субодиниці по залишках Tyr-1158, Tyr-1162, Tyr-1163. Активність рецепторної тирозинкінази фосфорилує велику кількість внутрішньоклітинних субстратів [13,15,16].

1.2.2. Субстрати інсулінового рецептора. Родина субстратів інсулінового рецептора (IRS) складається з шести членів, найпоширенішими є IRS-1 та IRS-2. IRS характеризуються наявністю NH_2 -кінцевого домену гомології плекстрину (PH), домену зв'язування фосфотирозину (PTB) та COOH -кінця (рис. 1.2.) [15,19,21].

Ділянка PH та PTB мають аналогічну структуру, але функціонально вони різняться. Роль домену PH достовірно не відомо, але існує думка, що він сприяє зв'язуванню рецептора з білком. Ділянка PTB зв'язується з фосфорильованою ділянкою NPXpY в β -субодиниці IR. У COOH -кінці наявно близько 20 сайтів фосфорилування по тирозину [9,13].

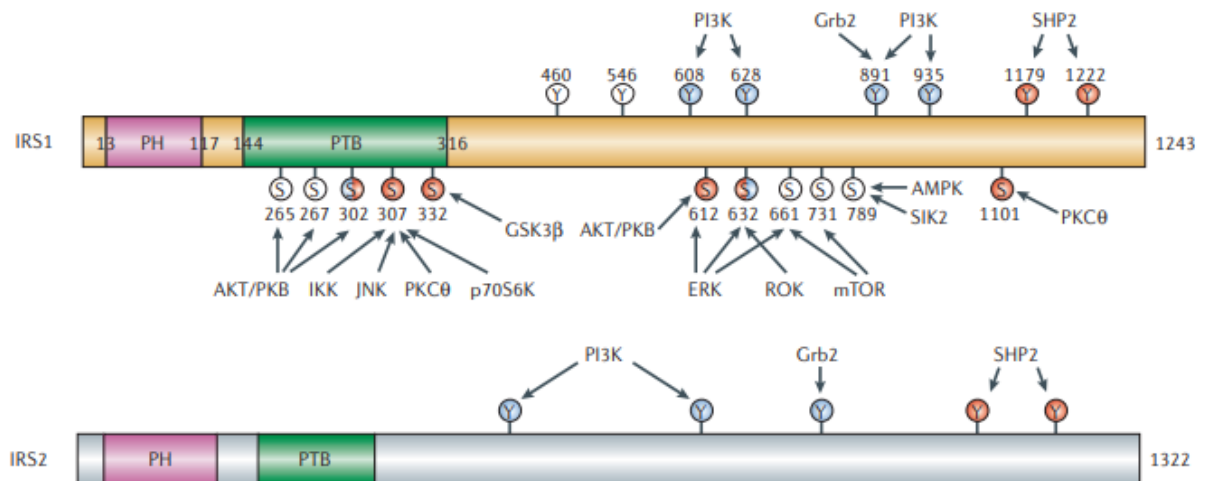


Рис. 1.2. Структура субстратів інсулінового рецептора: сині кола зображують позитивну регуляцію; червоні – негативну [19].

IRS-2 поширені в β -клітинах і гепатоцитах, а IRS-1 в ендотеліальних клітинах та судинах. При фосфорилюванні, IRS слугують у якості опорних точок для білків з доменами SH2 (Src homology-2). Деякі залишки в хвості IRS фосфорилуються і зв'язуються з доменами SH2 сигнальних білків, наприклад, з регуляторною субодиницею p85 PI3K, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) або з білком Shc (рис. 1.2) [9,13,16,19].

1.2.3. Характеристика PI3K/Akt/mTOR сигнального шляху. На початковому етапі, після зв'язування інсуліну, відбувається аутофосфорилювання рецептора з послідуочим фосфорилюванням IRS. Фосфорилювання відбувається на залишках тирозину, а потім субстрати можуть запускати два основні сигнальні шляхи. Перший шлях йде від Ras до мітоген-активованих кіназ (МАРК), що забезпечують регуляцію експресії генів, відіграють в рості та диференціюванні клітин. Ще один шлях, який запускають субстрати, шлях фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), що викликає фосфорилювання кінази Akt/PKB і відповідає за метаболічні дії інсуліну [18,22,23].

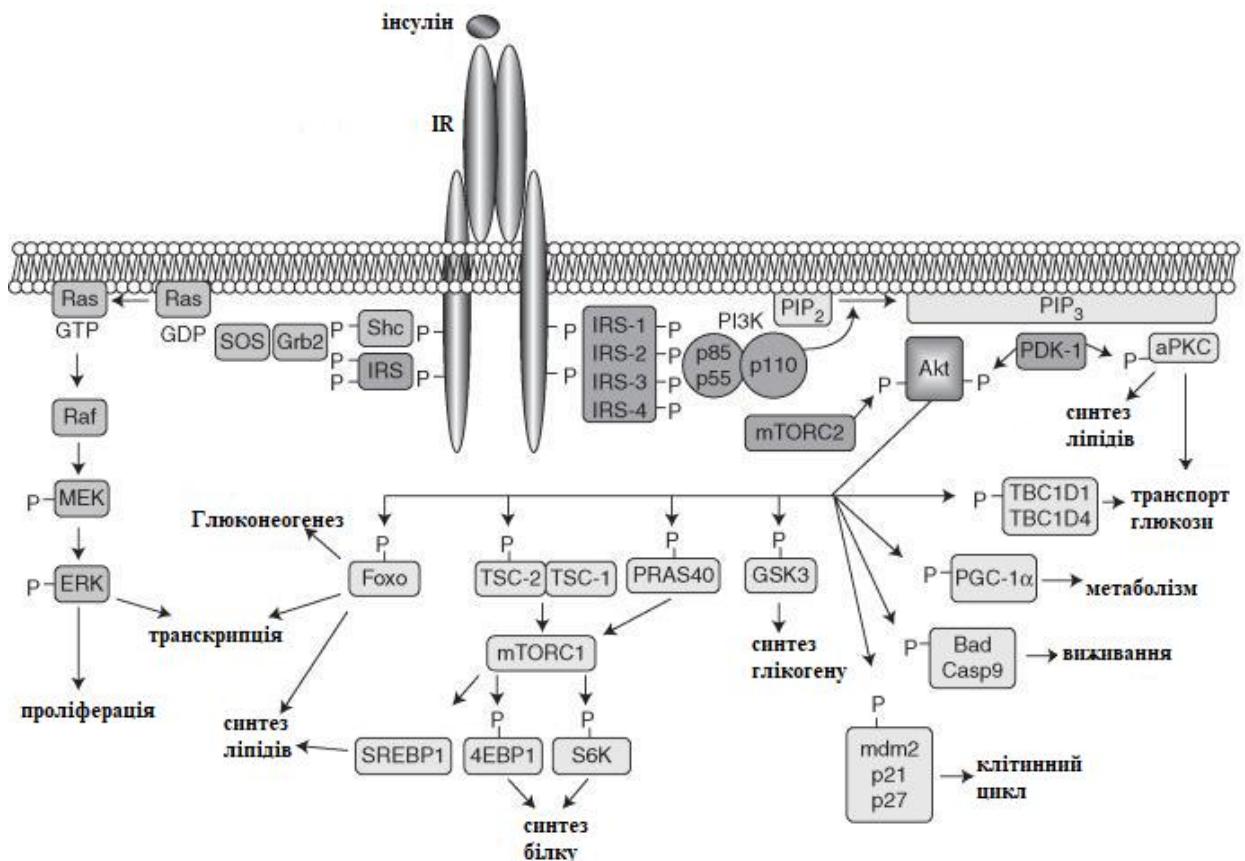


Рис. 1.3. Сигнальний шлях інсуліну. Адаптовано за [22].

Фосфоінозитид-3-кінази входять до родини ліпідкіназ та здатні фосфорилувати гідроксильну групу інозитольного кільця фосфатиділінозитолів. Кінази поділяються на 3 класи, що характеризуються наявністю гомологічних ділянок. Найкраще вивченими є PI3K, які входять до I класу та мають у своєму складі каталітичну та SH₂-вмісну регуляторну субодиниці [17,18,19].

У свою чергу, перший клас поділяється на дві підгрупи IA та IB. До складу PI3K підгрупи IA входять каталітична субодиниця p110 (α, β і δ) і регуляторна p85 (α, β). Регуляторна субодиниця p85 складається з домену Src-гомології 3 (SH₃), домену гомології BCR (BH), p110 з'єднувальної ділянки та С-кінцевого домену SH₂ (рис.1.4.). На сьогоднішній день, відомо п'ять ізоформ регуляторної субодиниці: два білки 85 кДа (p85a, p85b), два білки 55 кДа (p55a, p55g) та один білок 55 кДа (p50a) [17,21,24].

Каталітична субодиниця p110 (α, β і δ) складається з N-кінцевого p85 зв'язуючого домену, Ras-зв'язуючого домену, який містить велику кількість

проліну, домену гомології фосфатидилінозитол кінази (PIK), С-кінцевої каталітичної ділянки. Три різні ізоформи p110 (α , β і δ) відрізняються місцем розташування в тканинах. Субодиниці α і β поширені майже повсюдно, де впливають на клітинну проліферацію і передачу сигналів інсуліну, а p110 δ наявна тільки в лейкоцитах. Каталітична субодиниця PI3K зазвичай зв'язана з регуляторною, тому що у вільному стані p110 розпадається. Субстратами для PI3K I класу є фосфатидилінозитол, фосфатидилінозитол-4-фосфат і фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат [18,19].

Підклас IB структурно складається з регуляторної p101 та каталітичної p110 γ . Каталітична p110 γ характеризується відсутністю N-кінцевого зв'язуючого домену [19].

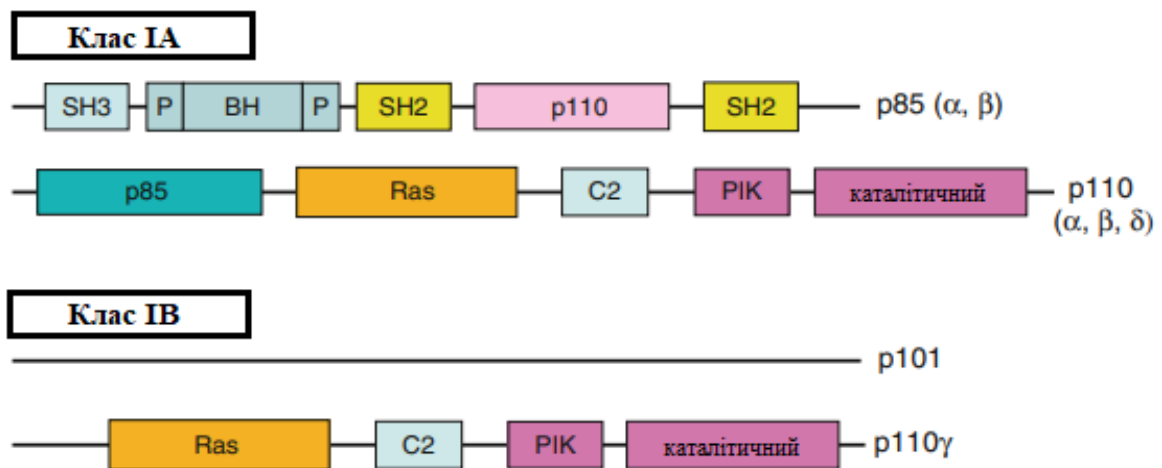


Рис.1.4. Доменна організація PI3K. Адаптовано за [25].

Відомо, що ген *Pik3r1* кодує 65-75% всіх регуляторних субодиниць (p85 α , p55 α , p50 α). *Pik3r2* кодує близько 20% (p85 β), а *Pik3r3* – p55 γ [19,20,26].

Активация PI3K відбувається шляхом зв'язування двох ділянок SH₂ регуляторних субодиниць з фосфорильованими тирозином мотивами YMPM в IRS білках. Водночас відбувається активация каталітичної субодиниці, яка починає фосфорилувати фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат (PIP₂) з утворен-

ням фосфатидилінозитол (3,4,5) – трифосфат (PIP3). Останній впливає на те, щоб Akt зв'язалася з плазматичною мембраною (рис. 1.3.) [18,22,26].

За допомогою PIP3 відбувається активація фосфоінозитид-залежної кінази 1 (PDK-1), яка своєю РН ділянкою зв'язується з мембранним PIP3. Фосфоінозитид-залежна кіназа 1 відповідальна за фосфорилування 20 членів родини AGC кіназ в серинових/треонінових залишках (Thr-308 для Akt). Фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат також активує PDK2, яка фосфорилує Akt в Ser-473 та є важливим для активації p70S6K, ферменту, який регулює синтез білку у відповідь на дію інсуліну [22,27].

Родина Akt мають схожу гомологію з протеїнкіназою А (РКА) на 68% та на 73% з протеїнкіназою С (РКС), тому Akt ще називають РКА і РКС-асоційованою кіназою. Akt/РКВ є серин/треонінкіназою, має масу приблизно 60 кДа та виступає посередниками в PI3K каскаді. Відіграє важливу роль у метаболізмі глюкози, апоптозі, проліферації клітин, транскрипції та міграції [18,26,27].

Виділяють такі підтипи Akt1, Akt2, Akt3, або їх ще називають як РКВ α , РКВ β , РКВ γ . Akt1 активуються у великій кількості тканин, тоді як Akt2 переважно в чутливих до інсуліну. Akt3 поширені в мозку, легенях, серці, нирках, скелетних м'язах. Вважається, що Akt1 виконують регуляцію ліпідного обміну і стимулюють синтез глікогену в м'язах [27,28,29].

До складу Akt входять N-кінцева регуляторна ділянка, яка ще називається доменом гомології плекстрину, також наявний кіназний каталітичний домен та C-регуляторна ділянка (рис. 1.5.) [27,28,30].

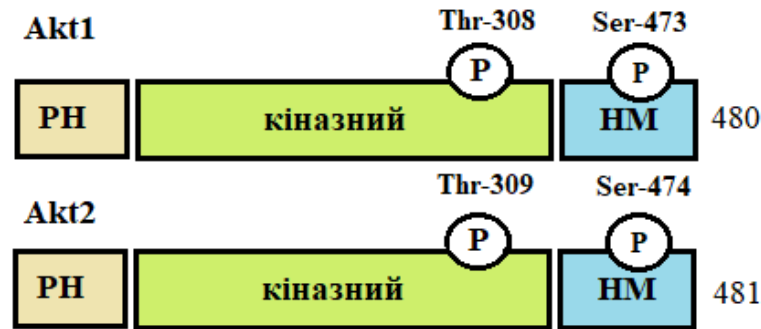


Рис. 1.4. Структурна організація Akt1 та Akt2. Адаптовано за [31].

Відомо близько 100 субстратів Akt, деякі з них особливо важливі для передачі сигналів інсуліну. Основними субстратами вважаються: кіназа глікогенсинтази - 3β (GSK3 β), що блокує інгібування синтезу глікогену; AS160 - впливає на переміщення GLUT-4; фактори транскрипції FOXO - регулюють експресію генів в печінці; p21CIP1 та p27KIP1 - блокують інгібування клітинного циклу; PDE3b - гідролізують цАМФ; TSC2 (супресор туберозного склерозу) - задіяний в регуляції mTOR [13,30].

Akt-залежна активація починається з фосфорилювання п'яти сайтів (Ser-939, Ser-981, Ser-1130, Ser-1132 та Thr-1462) на туберині (TSC2). Відомо, що TSC2 в комплексі з TSC1 (хамартин) призводить до активації RHEB-GTP (представник родини Ras-білків). Фосфорилювання за допомогою Akt призводить до інгібування TSC1, TSC2, що дозволяє накопичуватися RHEB-GTP, як наслідок, активується mTORC1 (рис. 1.3.) [13,30].

Білки mTOR належать до родини серин/треонінових протеїнкіназ та характеризуються наявністю таких доменів: N-кінцевого HEAT (huntingtin, elongation factor 3) у вигляді двох блоків, що забезпечують взаємодію між mTOR та іншими сигнальними білками; домену фокально-адгезивної кінази (FAT); рапаміцин зв'язуючого (FRB); кіназного (рис.1.5.). Відомо, що амінокислотні залишки в кіназному домені схожі з каталітичним доменом PI3K [13,30].

mTOR є каталітичною субодиницею двох білкових комплексів - mTORC1 та mTORC2. Механічна мішень рапаміцину контролює ріст клітин шляхом стимулювання анаболічних процесів, включаючи синтез білків, ліпідів, нуклеїнових кислот та шляхом пригнічення катаболічних процесів, таких як аутофагія. mTORC1 регулює концентрацію поживних речовин і інгібується рапаміцином, а mTORC2 не проявляє чутливість до поживних речовин, та не завжди інгібується рапаміцином [13,30,32].

Гомодимер mTORC1 складається з таких основних субодиниць: mTOR, рапаміцин чутливого адаптерного білку Raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec-13 protein 8), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) та Deptor (domain-containing mTOR-interacting protein) (рис.1.5.). Raptor регулює димеризацію та сублокалізацію комплексу та сприяє зв'язуванню з субстратами. PRAS40 функціонує як негативний регулятор при зв'язуванні з mTORC1 і дисоціює від комплексу у відповідь на стимуляцію інсуліном. Субодиниця mLST8 залучена в активації mTORC1 амінокислотами. Білок Deptor нещодавно був описаний як інгібітор mTOR, здатний пригнічувати як mTORC1, так і mTORC2. [33,34].

Основними регуляторами mTORC1 є поживні речовини, фактори росту та амінокислоти. Відомо, що даний комплекс контролює ріст та проліферацію клітин, сприяє синтезу білків та ліпідів. Активований комплекс регулює трансляцію білку за допомогою активації p70S6k [33,34].

Комплекс mTORC2 має у своєму складі схожі субодиниці з mTORC1, але існують деякі відмінності, замість білку Raptor у mTORC2 наявний нечутливий до рапаміцину білок Rictor (рис.1.5.). Також, наявна субодиниця Sin1 (stress-activated protein kinase-interacting protein 1), яка є важливою у формуванні комплексу та для регулювання кінетичної активності mTOR. Активований mTORC2 фосфорилує Akt по Ser-473. Також, комплекс взаємодіє з пухлинним супресором Rb. Недавні дослідження показали, що Rb інгібує активність Akt, перешкоджаючи mTORC2-опосередкованому фосфорилуванню по Ser-

473. Комплекс mTORC2 регулює виживання клітин та організацію цитоскелету [22,34].

Важливо відмітити, що активація mTORC1 регулює активність mTORC2. Комплекс mTORC1 залучений в фосфорилюванні Rictor за допомогою активації p70S6k. Фактично, рибосомальна протеїнкіназа S6 фосфорилює Rictor по Thr-1135, при цьому не впливаючи на збірку mTORC2 [34,35].

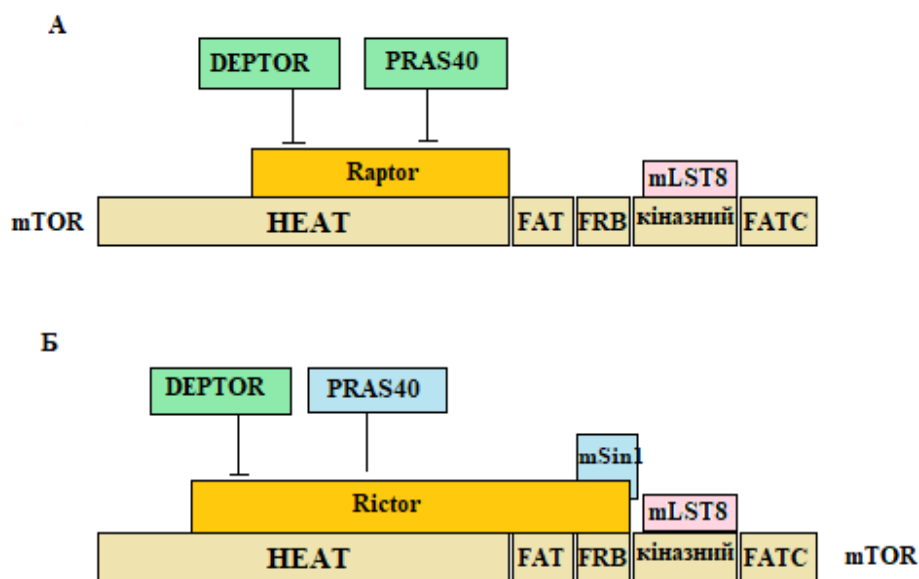


Рис. 1.5. Структурна організація комплексів mTORC1 та mTORC2. Адаптовано за [34].

1.2.4. Регуляція активності p70S6k. Дані, отримані за останні 20 років, дозволяють виявляти різноманітні фактори та мітогени, які мають здатність активувати рибосомальні протеїнкінази S6. Шлях інсуліну/IGF, де передача сигналів здійснюється через фосфатидилінозитол-3-кіназу та mTORC1, є найкраще вивченим активатором S6k1. Крім PI3K, в активації S6k1 беруть участь і інші незалежні сигнальні шляхи, такі як Ras/MAPK [36].

Відомо, що рибосомальні протеїнкінази S6 (S6k) належать до підродини AGC серин/треонін протеїнкіназ. Білки S6K разом з 4E-BP1 є основними мішеннями для mTORC1 шляху [36].

На сьогодні ідентифіковані дві форми S6k (S6k1 та S6k2), які мають схожі біологічні функції та 83 % ідентичності в кіназних ділянках. Тим не менш, відрізняються вони меншою схожістю в С-кінці (59%) та N-кінці (43%) [37,38].

S6k1 функціонує в клітині у вигляді двох ізоформ - p70 та p85, які кодуються геном *RPS6KB1*. Вважається, що p70 складається з 502 амінокислот та знаходиться в цитоплазмі, а p85 довша на 23 амінокислоти та локалізована в ядрі (містить в межах N-кінцевого подовження сигнал ядерної локалізації – NLS) (рис. 1.6.). Тим не менш, дані, які отримані нещодавно, оскаржують ядерну локалізацію p85S6k та засвічують про те, що субклітинна локалізація є цитоплазматичною, і в той час стверджують, що p70S6k є як ядерною, так і цитоплазматичною. Також, існують коротші ізоформи S6k1, які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу і регулюються фактором SRSF1. У мишей в ході сплайсингу додається три екзони (A,B,C) в межах 6 інтрона, утворюється коротка ізоформа, яка називається p31S6k1. У людей екзон В відсутній, утворюються дві короткі ізоформ - h6A та h6C [37,38].

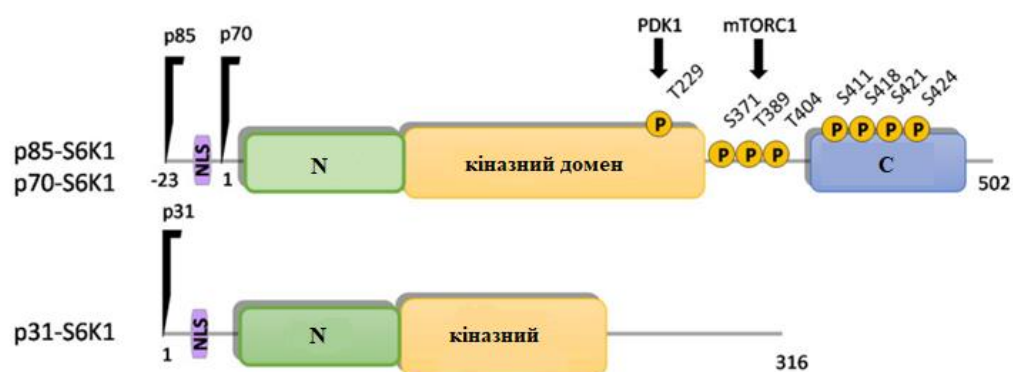


Рис.1.6. Доменна структура та сайти фосфорилювання ізоформ S6k1. Адаптовано за [37].

Кіназа p70S6 має молекулярну масу 70 кДа та містить у своєму складі такі ділянки: кислий N-кінець (містить мотив TOS), консервативну кіназну (містить Т-петлю), лінкерну (містить ТМ (turn motif) та RSPRR), аутоінгібуючу, карбоксильнотермінальну (лужний С-кінець). Наявні вісім сайтів фосфорилювання: у каталітичній ділянці – Thr-229, в лінкерній – Ser-371, Thr-389 та Ser-404, у аутоінгібуючій – Ser-411, Ser-418, Thr-421 та Ser-424 (рис.1.6.) [37,39].

Кіназа p70S6 активується різними стимулами за допомогою мультисайтового фосфорилювання. Відомо, що С-кінцева ділянка виконує аутоінгібуючу функцію і взаємодіє з N-кінцем, закриваючи при цьому кіназний домен для своїх мішеней. Каталітична активація відбувається внаслідок подвійного фосфорилювання критичних сайтів в петлі активації (Т-петля, Thr-229) і гідрофобної ділянки (НМ, Thr-389) [37,39].

Існує дві моделі поетапної активації рибосомальної S6 кінази – традиційна та альтернативна [37,39].

У традиційній моделі на першому етапі активації, за допомогою мітогенів, відбувається фосфорилювання за чотирма пролін-спрямованими сайтами С-кінцевої ділянки (Ser-411, Ser-418, Ser-421, Ser-424). Другий етап характеризується звільненням аутоінгібуючого С-домену, що забезпечує доступ mTORC1 до НМ, і таким чином, відбувається фосфорилювання по Thr-389. На третьому етапі здійснюється PDK1-опосередковане фосфорилювання Т-петлі (Thr-229). Етап фосфорилювання ТМ сайту (Ser-371) залишається невідомим (рис.1.7.) [37,39].

Активація рибосомальної протеїнкінази в альтернативній моделі має деякі відмінності у порівнянні з традиційною (рис.1.7.). На першому етапі невідома кіназа фосфорилює ТМ сайт по Ser-371. На наступних етапах відбувається фосфорилювання С-кінцевої ділянки, щоб викликати більш розслаблену конформацію. Звільнення аутоінгібуючого С-термінального домену забезпечує доступ PDK1 до Т-петлі (Thr-229), як наслідок, сприяє mTORC1-опосередкованому фосфорилюванню сайту НМ (Thr-389) [36,39].

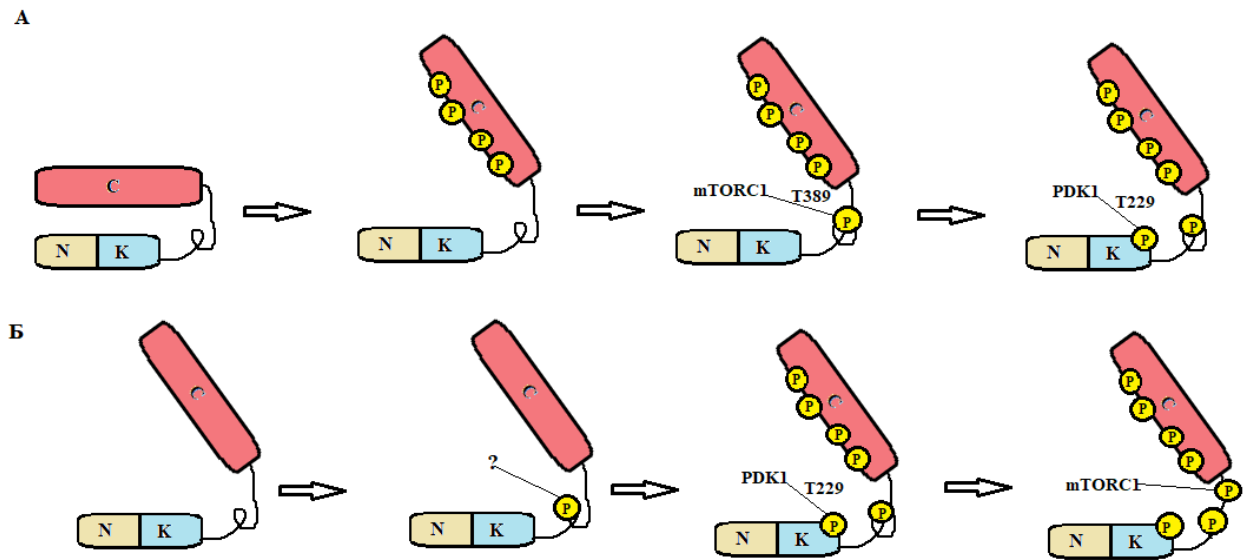


Рис.1.7. Поетапна активація p70S6k за допомогою мультисайтового фосфорилування. А-традиційна модель; Б-альтернативна модель. Адаптовано за [39].

Відомо, що N-кінцеві та С-кінцеві ділянки p70S6k відіграють важливу роль у mTORC1-опосередкованому фосфорилуванні (Thr-389). На N-кінці наявні унікальні мотиви передачі сигналів TOR (TOS), які також виявлені і в інших субстратах mTORC1 (4EBP та PRAS40) [39].

Існують і інші механізми, що лежать в основі регуляції p70S6k, наприклад, дефосфорилування, ацетилювання та убіквітінування [36,37,39].

Обробка рапаміцином, або депривація амінокислот призводить до інактивації протеїнкінази шляхом дефосфорилування в певних сайтах. Крім клітинного стресу, трансформуючих факторів, вітаміну D, до дефосфорилування призводить дія фосфатаз подібних до PP2A (protein phosphatase 2A) [36,39].

Відомо, що два фермента ацетилтрансферази – p300/CBP (response-element-binding protein-binding protein) та PCAF (p300/CBP-associated factor), взаємодіють та ацетилюють S6k1 та S6k2 як *in vitro*, так і *in vivo*. Ацетилювання p70S6k відбувається на С-кінці (Lys-516) у відповідь на мітогени та є процесом незалежним від фосфорилування [36,39,40].

У кіназному домені p70S6k наявні сайти убіквітинування. Процес убіквітинування не залежить від стану фосфорилування. Поліубіквітинування білків призводить до їх руйнування за допомогою протеасоми 26S [36,39].

Рибосомальна протеїнкіназа є важливим позитивним регулятором розміру клітин. У *Drosophila* наявна одна форма білку S6k (dS6k). Таким чином, більшість dS6k-нульових мух демонстрували ембріональну летальність, а ті, що вижили мали малі розміри тіла. Також, дані особини мали малу тривалість життя, а самки були стерильними [41,42].

Ще одним доказом того, що рибосомальна протеїнкіназа задіяна при регуляції розміру тіла є те, що S6k1–нульові миші народжувалися із зменшеними розмірами всіх органів та у таких мишей спостерігалася гіперінсулінемія. Вивчення β -клітин підшлунквої залози у мишей показало, що вони були значно меншими, ніж у однопометних особин дикого типу. Це підкреслює важливість передачі сигналів та демонструє, як дефекти клітинного росту можуть впливати на клітинну функцію [39,41,42].

До S6k належать субстрати, які беруть участь в синтезі білків та нуклеїнових кислот, в регуляції зворотного зв'язку сигнальної трансдукції і клітинному метаболізмі та субстрати, що діють як супресори пухлин (рис. 1.8.) [39,41].

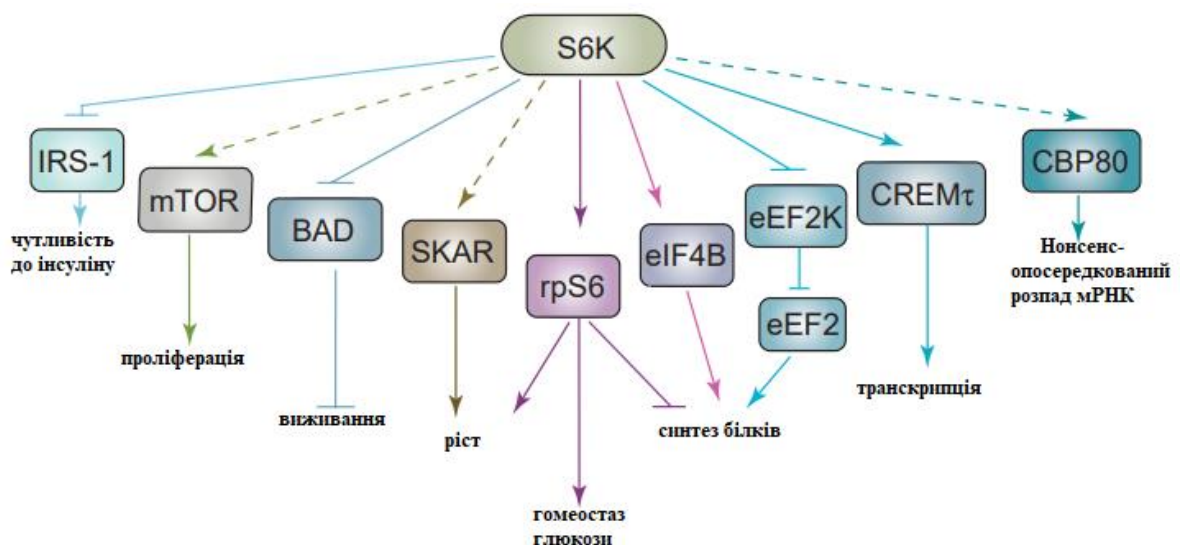


Рис. 1.8. Субстрати S6k. Адаптовано за [41].

Основною мішенню S6k є рибосомальний білок S6, компонент субодиниці рибосоми 40S. Кіназа p70S6 здійснює упорядковане фосфорилування gpS6 на 5 С-кінцевих серинових залишках: Ser -236 > Ser -235 > Ser -240 > Ser -244 > Ser -247 [37,39].

У голодуючих клітинах S6k стабільно асоціюється з фактором ініціації трансляції eIF3. Після активації протеїнкіназа дисоціюється і в свою чергу фосфорилує субодиниці 40S на gpS6. eIF4B є фактором, який збільшує АТ-Фазну активність гелікази eIF4A, яка розмотує структуру в 5' - UTR та стабілізує лінійну мРНК. Фосфорилування eIF4B сприяє асоціації *in vitro* з eIF4A. Крім того, протеїнкінази фосфорилують PDCD4 (Programmed cell death 4) (Ser-67). Білок PDCD4 зв'язує eIF4A через домени MA3, перешкоджаючи зв'язуванню eIF4A з eIF4G у комплексі ініціації трансляції. Стимулювання мітогенами S6k1-залежне фосфорилування сприяє убіквітинуванню PDCD4 за допомогою E3 убіквітинлігази β -TRCP, що знижує стабільність білку. Таким чином, S6k можуть впливати на активність гелікази eIF4A безпосередньо двома різними шляхами фосфорилування, націлених на eIF4B та PDCD4 [37,39].

Важливою функцією протеїнкінази є контроль зворотного зв'язку. S6k фосфорилують mTOR на Thr-2446 та Ser-2448, але функціональна значимість цих сайтів фосфорилування невідома. Також, кіназа фосфорилує два компонента комплексу mTORC2, а саме Rictor та SIN1 (stress-activated -APK-interacting protein 1). Існує думка, що S6k таким чином діють шляхом інгібування Akt. Даний молекулярний механізм, відіграє важливу роль в інсуліно-резистентному стані [37,38,39].

Інший механізм зворотного зв'язку здійснюється за допомогою субстратів інсулінового рецептору (IRS-1 та IRS-2). Фосфорилування субстратів по Ser залишках сприяє виключенню сигналу, відбувається деградація білку або зменшується взаємодія з рецептором. Збільшення чутливості до інсуліну у мишей з дефіцитом S6k1 корелює зі зменшенням фосфорилування IRS-1 Ser / Thr. Із-за множинних сайтів фосфорилування на IRS-1 важко продемонст-

рувати, які саме сайти безпосередньо націлені на S6k. Проте, враховуючи результати отримані *in vitro*, Ser-307 та Ser-1101 IRS-1, ймовірно, є прямими субстратами S6k1 [37,38,39].

Рибосомальні протеїнкінази S6k можна розглядати як анаболітичні перемикачі для метаболічних програм, в той час як АМР-активовані протеїнкінази (АМРК) функціонують як катаболічні. Перші активуються в умовах достатньої кількості їжі, а другі – голодуванні та підвищенні відношення АМФ/АТФ. S6k сприяють накопиченню надлишку поживних речовин і навпаки, АМРК стимулюють окислення жирних кислот, шляхом контролювання активності ацетил-КоА-карбоксилази. Відомо, що АМРК інгібує передачу сигналів mTORC1 безпосередньо фосфорилуючи Raptor та TSC2. Рибосомальні протеїнкінази здатні інгібувати активність АМРК, напряду фосфорилуючи каталітичну α -субодиницю [37,38].

Крім АМРК, іншим основним регулятором метаболічної програми у відповідь на голодування є коактиватор PGC1 α (PPAR α). Основною функцією є зв'язування з різними факторами транскрипції для підсилення експресії генів, які беруть участь в мітохондріальному біогенезі, окисленні жирних кислот та гліюконеогенезі. У складі PGC1 α наявний домен з декількома сайтами фосфорилування для протеїнкіназ AGC. Нещодавно було припущено, що у PGC1 α по Ser-569, Ser-573 відбувається фосфорилування за допомогою S6k1 [37,38].

1.3. Потенційні механізми формування резистентності до інсуліну. Як уже зазначалося, при нормальному фізіологічному стані підвищений рівень глюкози та амінокислот, після приймання їжі, стимулює секрецію інсуліну β -клітинами. Інсулін починає діяти, зв'язується з рецептором і після активації відбувається фосфорилування субстратів інсулінового рецептору (IRS-1 та IRS-2) по тирозинових залишках. Зв'язування субстратів з PI3K призводить до активації Akt, яка контролює метаболічну дію інсуліну, інактивує гліюгенсинтазу 3, щоб забезпечити синтез гліюгену, а також транслокацію

транспортера глюкози (GLUT4) на плазматичну мембрану. Крім того, Акт активують mTORC1, які у свою чергу стимулюють p70S6k фосфорилувати залишки серину в IRS. Як наслідок, перешкоджаючи асоціації IRS з рецептором інсуліну [6,43].

Білки IRS піддаються сериновому фосфорилуванню у відповідь на дію інсуліну, цитокінів, вільних жирних кислот. Існує близько 70 потенційних сайтів серинового фосфорилування та даний процес збільшується в інсулінорезистентному стані [19,20,44].

Список IRS-кіназ, що залучені у розвитку резистентності до інсуліну, постійно росте одночасно зі списком потенційних сайтів фосфорилування Ser/Thr в білках. IRS-кіназ можна розділити на дві групи. До першої належать ті, що є медіаторами передачі сигналів інсуліну та негативно регулюють IRS при довготривалій стимуляції інсуліном (наприклад, mTOR/p70s6k, MAPK та PKC). Інша група складається із кіназ, які активуються зв'язаними шляхами для інгібування дії інсуліну (наприклад, GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta), IKK β (IkB kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), AMPK) [15,19,20].

Кіназа mTOR та p70s6k є низхідними ефекторами PI3K і потенційними кандидатами на негативну регуляцію IRS. Коли mTORC1 хронічно активується після надмірного поглинання глюкози або амінокислот, p70S6k збільшує фосфорилування IRS-1 по Ser-307, що негативно корелює з регуляцією передачі сигналів інсуліну. Потенційні Ser залишки, які регулюються p70S6k розташовані в РТВ домені IRS. Такі фосфорилування можуть спровокувати дисоціацію IRS від IR з інгібуванням низхідних ефекторів [6,45,46].

Миші, нокаутовані по *IRS-1*, мали дефект дії інсуліну переважно в м'язах та аномалії у рості тіла через стійкість до IGF1. Порушення передачі сигналу у печінці спостерігалось у мишей, що були нокаутовані по *IRS-2*, та аномалії у рості спостерігалось тільки в β -клітинах підшлункової залози. Ці дослідження по нокауту показують, що білки IRS складають критичний вузол і делеція кожної ізоформи має різні біологічні наслідки [19,20,49].

Миші, які мали дефіцит p70S6k, залишалися чутливими до інсуліну, внаслідок втрати петлі негативного зворотного зв'язку від кінази до IRS-1. Не відбувалося фосфорилювання сайтів, які залучені у резистентності (Ser-307 та Ser-636/639). Нещодавно було ідентифіковано ще один сайт IRS-1, який фосфорилюється кіназою при перенавантаженні поживними речовинами та при ожирінні (Ser-1101) [20,48].

Постає питання, чи покращує чутливість до інсуліну інгібування даних кіназ в стані резистентності? У дослідженнях *in vivo* короткотривала дія рапаміцином, інгібітором mTOR, призводило до покращення дії інсуліну. З іншого боку, довготривале лікування рапаміцином, навпаки, збільшувало інсулінрезистентність у *Psammomys obesus*. Це може бути внаслідок підвищення активності кіназ, як відповідь на стрес у м'язах та острівцях [20,49].

Можлива альтернативна активація Akt за рахунок фосфорилювання залишку Ser-473. Цю реакцію каталізує mTOR, перебуваючи в складі комплексу mTORC2 [6,28]. Активація mTORC2 стимулює утворення внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК), які підсилюють фосфорилювання і активацію Akt. Іншим шляхом інсулінонезалежної активації mTORC1 слугує виключення його інгібітора - кінази АМКР. Це відбувається при харчовому перевантаженні, накопиченні в клітинах АТФ і відповідному зниженні АМФ. Активація mTORC1 відбувається також при запаленні і стресі. Таким чином, майже всі фізіологічні механізми розвитку в тій чи іншій мірі замикаються на активації mTORC1 і його безпосередній мішені – p70S6k [19].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктами дослідження слугували мононуклеарні клітини з периферичної крові. Досліджували наступні групи: 1-контрольна, $n = 8$ – здорові люди, репрезентативні за віком; 2 – пацієнти, що хворіють на цукровий діабет II типу, $n = 14$. Всі суб'єкти впродовж трьох днів дотримувалися звичайної дієти і не займалися фізичними навантаженнями. Хворі приймали комбіноване лікування інсуліном та метформіном. На момент збору крові, рівень глікогемоглобіну в крові хворих був у межах 7,4-9,2%.

Експеримент проводився в ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» у відділі фундаментальних та прикладних проблем ендокринології. Збір біоматеріалу проводився тільки після письмової згоди пацієнтів.

2.2. Виділення мононуклеарних клітин

Першим етапом роботи є збір крові та виділення мононуклеарних клітин (PBMC). Виділення PBMC від цільної крові виконували методом центрифугування в градієнті щільності з використанням Histopaque - 1077 «Sigma-Aldrich» (США).

Кров збирали з ліктьової вени в стерильні пробірки об'ємом 15 мл, в які попередньо вносили гепарин (20-25 ОД гепарину на 1 мл крові). Під час роботи, уникали охолодження та збовтування крові. Гепаринізовану кров об'ємом 10 мл розводили вдвічі ізотонічним розчином. У якості ізотонічного розчину використовували натрій-фосфатний буфер (PBS) «Medicago AB».

До складу натрій-фосфатного буферу входять: NaCl – 0,14 М, KCl – 0,0027 М, PO_4^{-3} – 0,010 М, pH – 7,4.

Розведену кров нашаровували на розчин Histopaque-1077 в співвідношенні 1:3 (1 частина Histopaque-1077 і 3 частини розведеної крові).

Histopaque-1077 – це стерильний розчин полісахарози 57 г/л, діатризоату натрію 90 г/л та має щільність 1,076–1,078 г / мл, рН в межах 8,8-9.

Проводили центрифугування (мікроцентрифугою Hermle Z-300) при кімнатній температурі протягом 30 хв при 400 об/хв. Під час центрифугування еритроцити та гранулоцити проходять через Histopaque та осідають на дно, а мононуклеарні клітини збираються в інтерфазне кільце (рис.2.1.). Мононуклеари відбирали в окрему пробірку та відмивали 5 мл ізотонічного розчину. Для осадження клітин центрифугували 15 хв 400 об/хв. Осад розчиняли в 1 мл ізотонічного розчину та центрифугували 5000 об/хв протягом 15 хв.



Рис. 2.1. Диференціальне центрифугування в градієнті щільності

2.3. Метод Бредфорда для визначення кількості білку

Метод Бредфорда є швидким та точним для оцінки концентрації білку. Базується на зв'язуванні барвника Coomassie Blue G250 з білком [47,50].

Метод Бредфорда виконували з використанням таких реагентів: барвник Coomassie Blue G250 «Sigma-Aldrich» (США), бичачий сироватковий альбумін (BSA) «Sigma-Aldrich» (США), етанол, фосфорна кислота.

До складу реагенту Бредфорда входять:

- Coomassie Blue G250 - 50 мг
- Етанол – 25 мл
- H_3PO_4 (85%) - 50 мл
- H_2O до 500 мл

Для приготування реагенту Бредфорда зважували 50 мг кумасі та розчиняли в 25 мл 96% етанолу, додавали 50 мл 85% розчину фосфорної кислоти. Отриманий розчин доводили водою до 500 мл та профільтровували. Реактив повинен зберігатися в холодильнику в колбі із темного скла з притертою пробкою.

Отримані моонуклеарні клітини лізували за допомогою буферу для лізису клітин, який входив до набору InstantOne ELISA™. За основу брали послідовні розведення бичачого сироваткового альбуміну (1мг/мл). Згідно адаптованого протоколу, додавали по 1 мкл, 3 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 15 мкл до 100 мкл води. Оптичну густину яких використовували для будування калібрувальної кривої.

Таблиця 2.1

Приготування розчину білку для будування калібрувального графіку

№	Кількість вихідного білку в мкл	Кількість H ₂ O в мкл
1	1	99
2	3	97
3	5	95
4	10	90
5	15	85

До білків невідомої концентрації та послідовно розведених зразків БСА додавали по 1 мл реагенту Бредфорда. У якості контролю використовували дистильовану воду.

Реакція починається, коли реагент Бредфорда взаємодіє з амінокислотами, це і призводить до утворення синього кольору, аналіз оптичної густини проводили за допомогою спектрофотометра СФ-46 при довжині хвилі 595 нм.

2.4. Тест ELISA для встановлення концентрації p70S6k

Тест ELISA InstantOne «Invitrogen», (США) використовується в експериментах для оцінки фосфорилювання вибраних білків сигнального шляху.

Це тест, який базується на використанні традиційного сендвіч-формату ELISA, але дозволяє одночасно додавати зразки та реагенти.

На першому етапі клітини центрифугували та лізували за допомогою 1x буферу для лізису клітин. Після, інкубували при 37°C протягом двох годин.

Суміш для лізису клітин у своєму складі містить буфер для лізису та розчин Enhancer. Буфер для лізису містить комбінацію миючих засобів, інгібіторів фосфатаз, солей. Розчин Enhancer додається в 5x буфер для отримання універсальної суміші, яку можна наносити на різні клітини та тканини. Суміш для лізису (5x) використовується для неадгезивних клітин. Суміш (1x) використовується для лізису прилиплих клітин або неадгезивних, які були зібрані центрифугуванням.

До 96-лункової планшетки додавали по 50 мкл суміші клітин, лунки якої попередньо оброблені антитілами до p70S6k та фосфо-p70S6k. Після додавання суміші лізованих клітин, вносили коктейль первинних та вторинних антитіл, окремо для p70S6k та фосфо-p70S6k. У якості негативного контролю - буфер для лізису клітин 1x (InstantOne ELISA™). Інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі на шейкері для мікропланшетів (300 об/хв).

Антитіло «захоплення» та антитіло «виявлення» змішували у рівних кількостях, таким чином отримували коктейль антитіл.

Приєднання білку до пластинки є ключовим в ELISA. Цей процес пасивний, так що білкові розчини в легко приготованих буферних розчинах можна додавати на пластикові поверхні і прикріплення відбувається після періоду інкубації при кімнатній температурі. Найчастіше використовують пластикові мікропланшети, які мають 96 лунок та розмір близько 5 мм і діаметр 8 мм.

Наступним етапом було вимивання білку, що не прикріпився. Після інкубації залишок незв'язаного антигену змивали за допомогою 200 мкл буферу для промивання 1x (InstantOne ELISA™). Буфер для промивання у своєму складі містить суміш буферних солей та м'якого миючого засобу.

Для прояву реакції використовували 100 мкл реагенту виявлення (InstantOne ELISA™) в кожному лунку. Проводили інкубацію 30 хв на шейкері для мікропланшетів (300 об/хв).

На даному етапі додається розчин з хромогенною хімічною речовиною, який є безбарвним при відсутності активності ферменту на субстраті. Оскільки існує фермент, зв'язаний з антитілом, субстрат каталізується викликаючи зміну кольору. Швидкість зміни кольору пропорційна кількості ферменту в комплексі.

Ферментативний каталіз зупиняли стоп-розчином, який додавали в кожному лунку по 100 мкл. Активність зупиняється внаслідок зміни рН реакції або денатурації ферменту. Наприклад, це може бути розчин, який містить в своєму складі 1 М сірчаної кислоти.

Для зчитування оптичної густини використовували спектрофотометричний планшет-рідер (Bio-tek Instruments) при довжині хвилі 450 нм.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Кількісне визначення білку методом Бредфорда

Метод Бредфорда використовується для швидкої кількісної оцінки білку в клітинному лізаті. Аналіз базується на зв'язуванні барвника з білком, що призводить до утворення синього кольору.

У якості стандарту використовували розведення БСА з концентрацією 1 мг/мл, додавали по 1 мкл, 3 мкл, 5 мкл, 10 мкл, 15 мкл до 100 мкл води. До отриманого розчину білку додавали 1 мл реактиву Бредфорда і вимірювали на спектрофотометрі оптичну густину при довжині хвилі 595 нм.

Після визначення оптичної густини на отриманих значеннях будували калібрувальну криву. На осі абсцис відкладали концентрацію, по осі ординат – значення екстинкції.

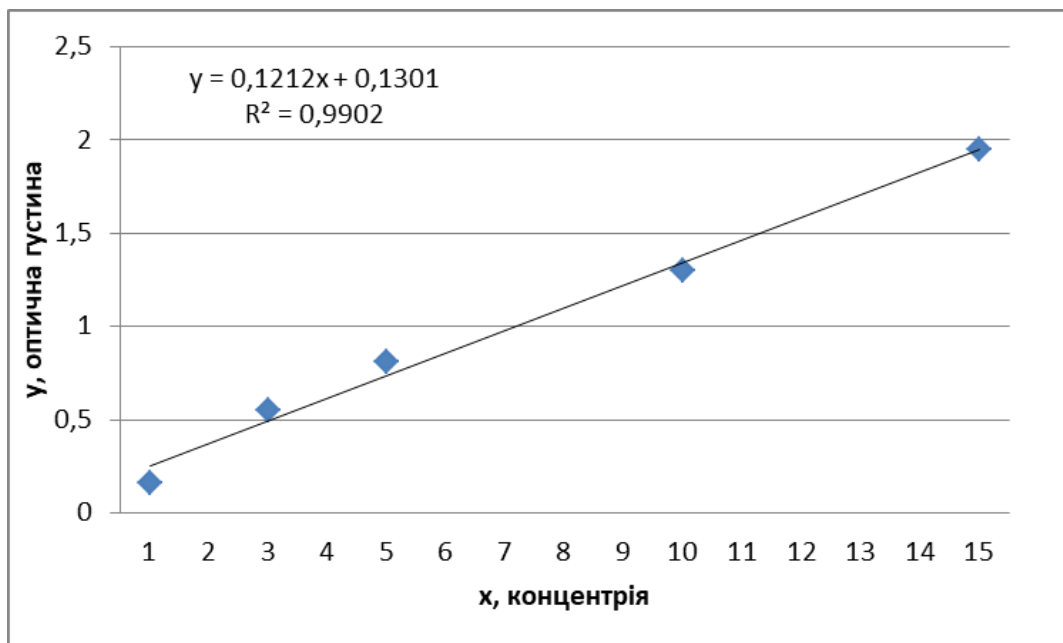


Рис. 3.1. Калібрувальна крива для визначення кількості білку

Таблиця 3.1

Концентрація білку в лізаті моноклеарних клітин, мкг/мл

№	Здорові	№	Хворі на цукровий діабет 2 типу		
1	1,60	1	1,57	9	0,47
2	1,60	2	1,26	10	1,30
3	0,95	3	0,47	11	0,85
4	0,69	4	0,21	12	0,68
5	0,77	5	1,74	13	0,81
6	1,40	6	1,12	14	0,65
7	0,92	7	1,11		
8	0,93	8	1		

Аналіз відмінностей між двома незалежними вибірками по кількісним показникам, розподіл яких не відповідав нормальному, проводили з використанням У критерію Вілкоксона Манна-Уїтні. Емпіричне значення ($U=69$) перевищувало теоретичне, таким чином, отримані результати свідчать про те, що при рівні значущості 0,05 різниці між вибірками не спостерігається. Параметри статистично описували у вигляді медіани.

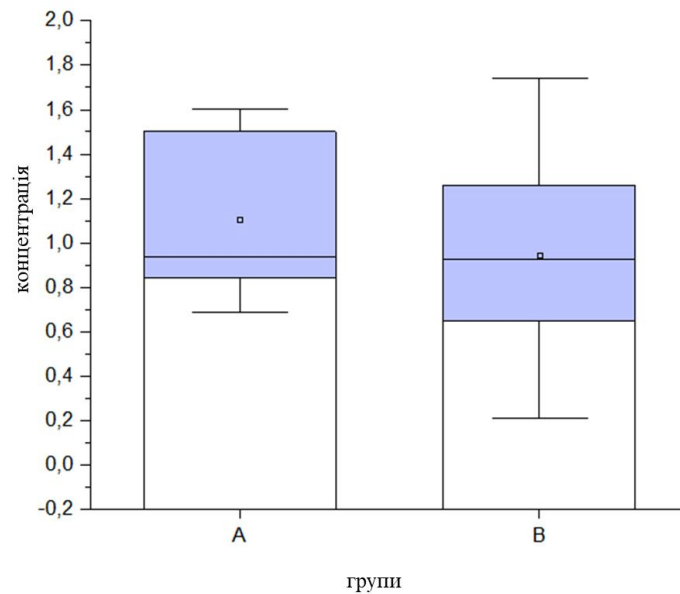


Рис. 3.2. Концентрація білку в клітинному лізаті; А – контрольна група (n = 8); В – хворі на цукровий діабет 2 типу (n = 14);

Отже, концентрація білку в здорових людей складала близько 0,94 мкг/мл, а в хворих на цукровий діабет II типу – 0,92 мкг/мл. Тому, кількість білку, яка містилася в лізаті моноклеарних клітин була достатньою для проведення тесту ELISA InstantOne.

3.2. Визначення концентрації p70S6k та фосфо-p70S6k за допомогою імуноферментного аналізу

Рівень білків p70S6k та фосфо-p70S6k (Thr-389) вимірювали за допомогою ELISA InstantOne. Аналіз проводили відповідно до інструкції набору. Розведення стандартного білку, що входив до набору ELISA InstantOne, використовували для налаштування калібрувальної прямої.

Після трьохкратного вимірювання кожної лунки на планшет-рідері, вираховували середнє значення поглинання для кожного та будували стандартну криву, середнє значення оптичної густини (y) порівнювали з відомою концентрацією стандартного білку (x).

Один із зразків мав значення оптичної густини, що виходила за межі стандартної кривої. Тому, щоб отримати точний результат, даний зразок роз-

водили перед проведенням аналізу. Концентрацію, отриману із стандартної кривої, множили на коефіцієнт розведення.

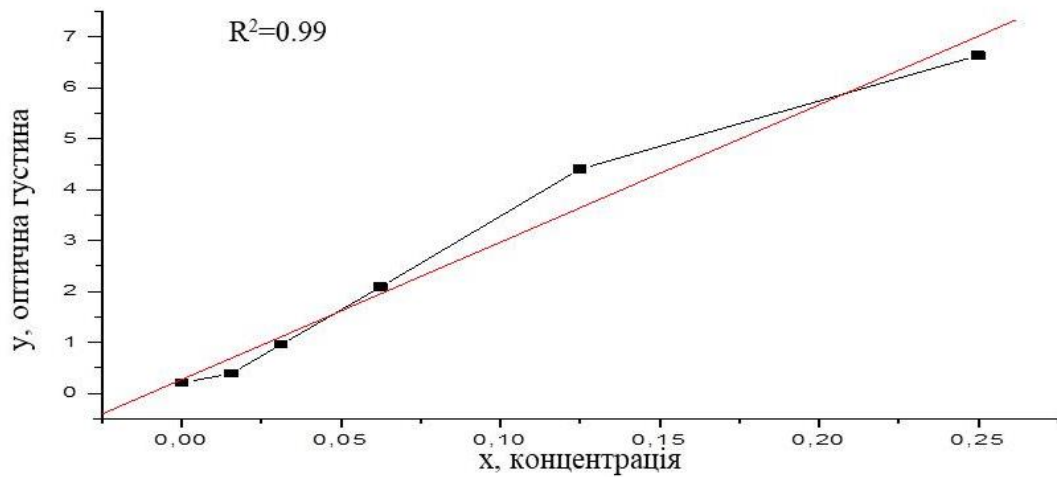


Рис. 3.3. Стандартна крива для p70S6k

Кожна точка на графіку представляє середнє значення трьох паралельних розведеннь.

Таблиця 3.2

Концентрація p70S6k в лізаті моноклеарних клітин, у.о.

№	Здорові	№	Хворі на цукровий діабет 2 типу		
1	0,01443	1	0,01569	9	0,01998
2	0,00686	2	0,01164	10	0,01961
3	0,00903	3	0,03033	11	0,01548
4	0,00647	4	0,05676	12	0,02804
5	0,00568	5	0,01755	13	0,01251
6	0,01263	6	0,02415	14	0,03381
7	0,00675	7	0,04371		
8	0,0066	8	0,01678		

Використовуючи критерій Шаріпо-Уїлка встановили, що розподіл у вибірках не відповідає нормальному. Для порівняння показників між двома незалежними вибірками використовували У критерій Вілкоксона Манна – Уїтні при рівні значущості 0,05. Оскільки емпіричне значення було менше за табличне ($U_{\text{емп.}} = 4$), то різниця між концентрацією p70S6k здорових та хворих на цукровий діабет є значною. Параметри описової статистики приводимо у вигляді медіани.

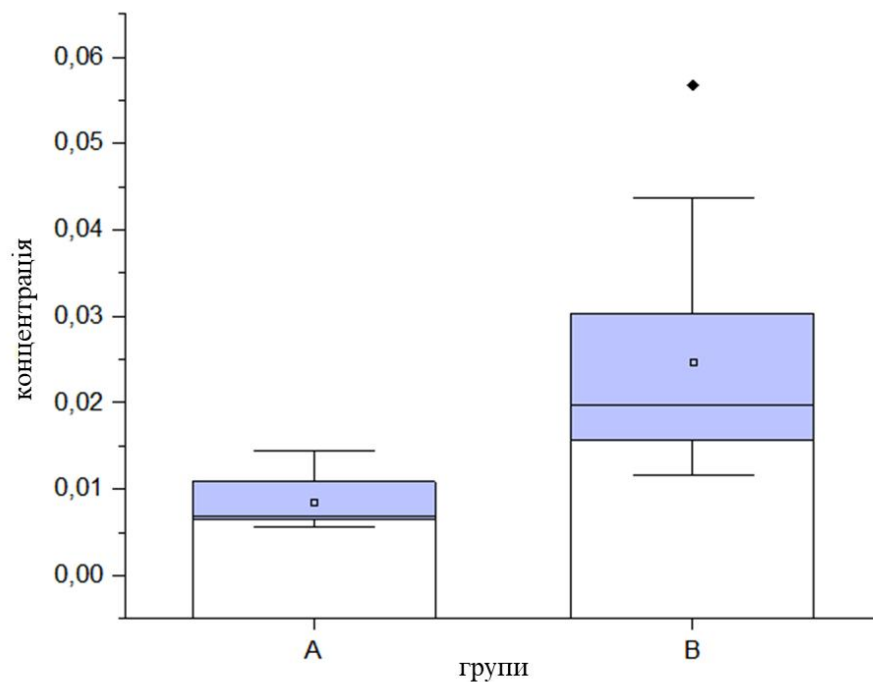


Рис. 3.4. Концентрація p70S6k в мононуклеарних клітинах; А – контрольна група (n = 8); В – хворі на цукровий діабет 2 типу (n = 14);

Отримані дані показують, що концентрація загальної p70S6k в здорових людей була в межах 0,008 у.о, а в хворих на цукровий діабет - 0,019 у. о.

Аналогічно визначали вміст білку для фосфор-p70S6k з використанням другого коктейлю антитіл.

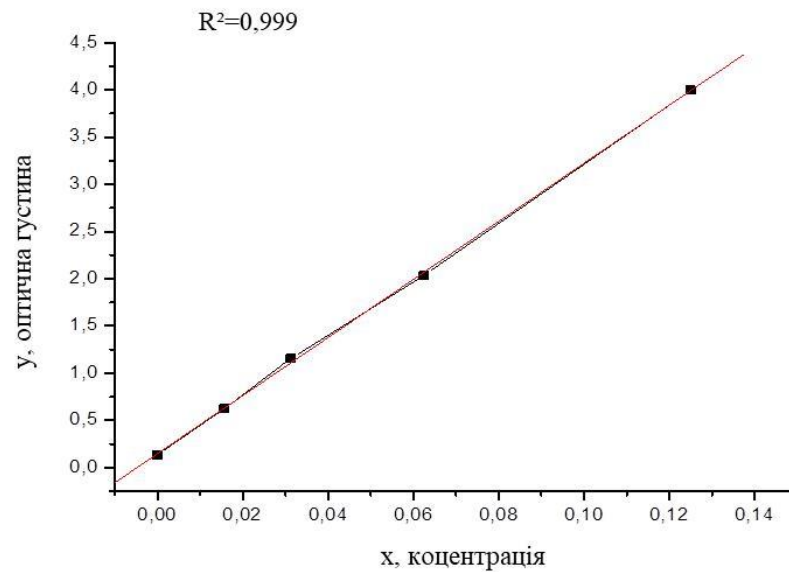


Рис. 3.5. Стандартна крива для фосфор-p70S6k

Таблиця 3.3

Кількість фосфо-p70S6k в мононуклеарних клітинах крові, у.о.

№	Здорові	№	Хворі на цукровий діабет 2 типу		
1	0,0067	1	0,00908	9	0,01291
2	0,00492	2	0,00957	10	0,03138
3	0,00539	3	0,02459	11	0,01216
4	0,00207	4	0,04244	12	0,01371
5	0,00439	5	0,01094	13	0,01557
6	0,00983	6	0,01197	14	0,02551
7	0,00103	7	0,01143		
8	0,00395	8	0,0081		

Розподіл досліджуваної ознаки в першій вибірці є нормальним, а в другій - ненормальним (для перевірки використовували критерій Шаріпо-Уїлка). Оскільки одна із вибірок розподілена ненормально, то застосовували непараметричний критерій. Щоб оцінити достовірності відмінностей між двома не-

залежними вибірками використовували У критерій Вілкоксона Манна - Уїтні. У даному випадку емпіричне значення було менше за табличне ($U_{\text{емп.}} = 3$, $p < 0,05$), тому різниця між концентрацією фосфо-p70S6k здорових та хворих на цукровий діабет є значною.

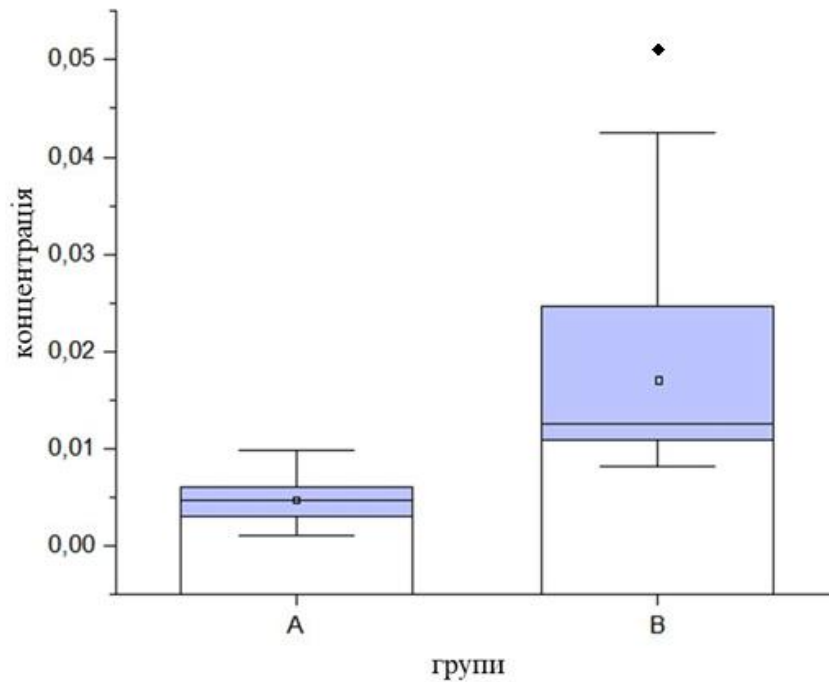


Рис. 3.6. Концентрація фосфор-p70S6k в мононуклеарних клітинах; А – контрольна група (n = 8); В – хворі на цукровий діабет 2 типу (n = 14);

Таким чином, концентрація фосфор-p70S6k у контрольної групи складала близько 0,004 у.о., а хворих – 0,012 у.о.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень, у хворих на цукровий діабет спостерігалось збільшення кількості p70S6k в клітинах крові у декілька разів, що вказує на зростання активації кінази та її стабільності.

На підвищення активності кінази в хворих, крім хвороби, можуть впливати препарати – метформін та інсулін. У кінцевому результаті, взаємодія цих препаратів та індукування ними сигнальних механізмів, очевидно, впливає на посилення роботи p70S6k. Через хворобу відбуваються більш глибокі зміни в клітинах – на рівні транскрипції, про що свідчить збільшення не тільки активності, але і кількості p70S6k [17].

PI3K/Akt/mTOR/p70S6K – сигнальний каскад, який відіграє важливу роль у функціонуванні клітин крові при ЦД II. p70S6k задіяна у деяких клітинних процесах: синтезу білка, проліферації та виживанні клітин, транскрипції гена клітинного циклу, диференціації адипоцитів. Тому, передача сигналів mTOR/p70S6k є дуже важливим в патогенезі цукрового діабету II типу [17].

На mTORC1 впливає багато факторів, такі як енергетичний статус, рівень O_2 , цитокіни, АФК. Гіперактивація mTORC1 регулює передачу сигналів інсуліну через субстрати інсулінового рецептора (IRS). Комплекс, при високоенергетичній дієті, інгібує субстрати інсулінового рецептору через p70S6k (Thr-389). Фосфорилування IRS по серинових залишках призводять до дисоціації субстратів від рецептору і подальшого пригнічення PI3K. Список IRS-кіназ, що залучені у розвитку резистентності до інсуліну, постійно росте одночасно зі списком потенційних сайтів фосфорилування Ser/Thr в білках. Відомо декілька основних сайтів IRS-1, що піддаються впливу кіназ - Ser-307 та Ser-636 Ser-639, Ser-1101 [34].

Оскільки фосфорилування по Ser-307 IRS-1 складає критичну стадію в контролі передачі сигналів інсуліну, важливо знати, чи є p70S6k причетною у формуванні резистентності. М. Ueno з колегами у своїй роботі [51] за до-

помогою вестерн-блоту оцінювали активність mTOR/p70S6k у печінці, скелетних м'язах та жировій тканині тварин з гіперінсулінемією [51].

Готували екстракти печінки щурів, яким вводили фізіологічний розчин (-) та інсулін (+). Проводили імуноблотінг з анти-IR, анти-фосфо-Akt, анти-mTOR, анти-фосфо-p70S6k антитілами. Результати скануючої денситометрії виражали в умовних одиницях та у вигляді середнього значення $\pm$ стандартне відхилення. Порівняння між групами проводили з використанням параметричного двостороннього ANOVA, де при $p < 0,05$ відмінності розглядалися як статистично значущі [51].

Спостерігалось, що індуковане інсуліном фосфорилування IR по тирозину було знижене в печінці тварин з гіперінсулінемією (контроль [C]: 100 ± 4 ; гіперінсулінемія [H]: 68 ± 4 , $p < 0,05$; $n = 8$). Не було різниці в активності IR в м'язах контрольних та хворих щурів. Проаналізували індуковане інсуліном по серину фосфорилування Akt з використанням анти-фосфо-Akt антитіл, де рівень фосфорилування був знижений в печінці з гіперінсулінемією в порівнянні з контрольною групою (C: 100 ± 3 ; H: 62 ± 4 , $p < 0,05$; $n = 8$). Фосфорилування mTOR (C: 100 ± 7 ; H: 144 ± 18 , $p < 0,05$; $n = 8$) та фосфорилування по серину p70S6k (C: 100 ± 9 ; H: 240 ± 21 , $p < 0,05$; $n = 8$) були вище у тварин з гіперінсулінемією [51].

Автори прийшли до висновку, що збільшення Ser/Thr фосфорилування IRS, виступає в якості одного із основних причин резистентності до інсуліну, що викликана різними агентами. Дане дослідження показує, що підвищена активність фосфорилування шляху mTOR/p70S6k збільшує вплив на IRS-1 по залишках серину та модулює резистентність до інсуліну у щурів з гіперінсулінемією. Цікаво, що шлях IR/IRS-1/PI3K/Akt пригнічується в печінці та м'язах тварин з гіперінсулінемією, а p70S6k, що знаходиться нижче Akt/mTOR, проявляє підвищену активність [51].

Але існує інша думка, наприклад, Meenu Rohini Rajan та співавтори у своїй роботі [52] стверджують, що p70S6k навряд чи є протеїнкіназою, яка

фосфорилує IRS-1 по серину у відповідь на інсулін в адипоцитах людини [52].

Спочатку автори проаналізували час фосфорилування IRS-1 по Ser-307 у відповідь на високу концентрацію інсуліну і порівняли з фосфорилуванням S6 по серину Ser-235/236. Фосфорилування IRS-1 по Ser-307 було швидким, квазістаціонарний рівень фосфорилування було досягнуто через 5 хв. Напротивагу, фосфорилування Ser-235/236 S6 показало певну затримку в часі, яка тривала 5 хвилин, після чого фосфорилування повільно збільшувалося, досягаючи квазістаціонарного рівня через 30 хвилин. Крім того, для перевірки чи обмежувалося фосфорилування S6 вихідною активацією S6k1, визначали час фосфорилування для S6K1 по Thr-389, що теж відображало затримку в часі. Таким чином, автори дійшли до висновку, що відмінності в динаміці фосфорилування IRS-1 по Ser-307 та S6 по Ser-235/236, S6k1 по Thr-389 дозволяють припустити, що IRS-1 не фосфорилується на Ser-307 за допомогою S6k1 [52].

Таким чином, зміна кількості p70S6k в мононуклеарних клітинах крові може вказувати на глибокі та системні процеси на рівні контролю транскрипції, що має важливе значення для оцінки прогресування захворювання та ефективності лікарських засобів.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу Бредфорда встановили, що вміст білку в клітинному лізаті здорових та хворих на цукровий діабет був однаковий.
2. Використовуючи імуноферментний аналіз визначили, що концентрація p70S6k в клітинах крові хворих на цукровий діабет у три рази більша, ніж у контрольної групи.
3. З'ясували, що концентрація фосфор-p70S6k у пацієнтів з цукровим діабетом майже в два з половиною рази більша, ніж у здорової групи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cowan, J. Overview of Type 2 Diabetes. Essentials of SGLT2 Inhibitors in Diabetes. 2016; 1–12.
2. Yanling Wu, Yanping Ding, Yoshimasa Tanaka, Wen Zhang. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci*. 2014; 11(11):1185-1200.
3. Ralph A. DeFronzo¹, Ele Ferrannini, Leif Groop, Robert R. Henry. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015; 15019.
4. Pei Shi Ong, Louis Z. Wang, Xiaoyun Dai, Sheng Hsuan Tseng. Judicious Toggling of mTOR Activity to Combat Insulin Resistance and Cancer: Current Evidence and Perspectives. 2016.
5. Jorge Berlanga-Acosta, Pedro López-Saura, Isabel Guillen-Pérez , Gerardo Guillen-Nieto, Boris Acevedo-Castro. Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Biological Overview from Pathways to Organelles and its Translation toward a Torpid Wound Healing Process. Berlanga-Acosta et al., *J Diabetes Metab* 2013.
6. Elmus G. Beale. Insulin signaling and insulin resistance. *Investig Med*. 2013 Jan; 61(1): 11–14.
7. Robert H. Eckel, Steven E. Kahn, Ele Ferrannini, Allison B. Goldfine, David M. Nathan. Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? *J Clin Endocrinol Metab*, June 2011, 96(6):1654–1663.
8. Cecilia Brännmark, Elin Nyman, Siri Fagerholm, Linnéa Bergenholm, Eva-Maria. Insulin Signaling in Type 2 Diabetes. Experimental and modeling analyses reveal mechanisms of insulin resistance in human adipocytes. *J biol chem*. 2013; 288(14): 9867–9880.
9. O. Escribano, N. Beneit, C. Rubio-Longás, A. R. López-Pastor, A. Gómez-Hernández. The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications. *Journal of Diabetes Research*. 2017; 1403206.2.

10. Steiner, D. F. The Biosynthesis of Insulin. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. 2008; 31–49.
11. Michael Weiss, Donald F Steiner, M.D., Louis H Philipson, M.D., Ph.D. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. 2014.
12. Croll T. I., Smith B. J., Margetts M. B., Whittaker J., Weiss M. A. Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain: Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain. 2016; 24(3), 469–476.
13. White M. F. Mechanism of Insulin Action. *Textbook of Diabetes*. 2016 ;114–132.
14. Saltiel A. R., Pessin J. E. Mechanisms of Insulin Action. 2007; 978-0-387-72204-7.
15. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*. 2013; 220(2), T1–T23.
16. Kido Y., Nakae J., Accili D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; 86(3), 972–979.
17. Yu J. S. L., Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. 2016;143(17), 3050–3060.
18. Ewa Świdarska, Justyna Strycharz, Adam Wróblewski, Janusz Szemraj, Józef Drzewoski. *Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake*. 2018.
19. Taniguchi C. M., Emanuelli B., Kahn C. R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006; 7(2), 85–96.
20. Sigalit Boura-Halfon, Yehiel Zick. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. 2008; 296(4):E581-91.

21. Håkan K.R. Karlsson, Juleen R. Zierath, Susan Kane, Anna Krook, Gustav E. Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects. 2005; 54(6):1692-1697.
22. Jérémie Boucher, André Kleinridders, C. Ronald Kahn. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. 2014; 6(1): a00919.
23. Huang Xingjun, Guihua Liu, Jiao Guo, Zhengquan Su. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. 2018; 14(11):1483-1496.
24. Asano T., Fujishiro M., Kushiyaama A., Nakatsu Y., Yoneda M., Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation on Insulin Action and Its Alteration in Diabetic Conditions. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2007; 30(9), 1610–1616.
25. Plo I. PI3K Signaling. Encyclopedia of Cancer, 2011.
26. Angelo Maffei, Giuseppe Lembo, Daniela Carnevale. PI3Kinases in Diabetes Mellitus and Its Related Complications. 2018; 19(12): 4098.
27. Somayeh Alsadat Hosseini Khorami, Ariyo Movahedi, Mutalib Mohd Sokhini. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in Diabetes. Annals of Medical and Biomedical Sciences. 2015; 1(2):46-55.
28. Xingjun Huang, Guihua Liu, Jiao Guo, Zhengquan Su. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. 2018, 6;14(11):1483-14.
29. Zhengyi Zhang, Huadong Liu, Jiankang Liu. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance. 2017; Volume 156,107092.
30. Muhammad Ali, Shazia Anwer Bukhari, Han-Woong Leero. Upstream signalling of mTORC1 and its hyperactivation in type 2 diabetes (T2D). BMB Reports. 2017; 50(12): 601-609.
31. Alberto M. Martelli, Giovanna Tabellini, Daniela Bressanin, Andrea Ognibene, Kaoru Goto. The emerging multiple roles of nuclear Akt. Biochimica et Biophysica Acta 1823. 2012; 2168–2178.
32. Joungmok Kim, Kun-Liang Guan. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. Nature Cell Biology. 2019.

33. Christian C. Dibble, Lewis C. Cantley. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*. 2015; 25(9), 545–555.
34. Meena Jhanwar-Uniyal , John V. Wainwright, Avinash L. Mohan, Michael E. Tobias. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in Biological Regulation* 72 (2019) 51–62.
35. Masaaki Sato, Nodi Dehvari, Anette I. Öberg, Olof S. Dallner, Anna L. Sandström. Improving Type 2 Diabetes Through a Distinct Adrenergic Signaling Pathway Involving mTORC2 That Mediates Glucose Uptake in Skeletal Muscle. 2014; 63(12): 4115-4129.
36. Bahrami-B, F., Ataie-Kachoie P., Pourgholami M. H., Morris, D. L. p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. *Journal of Clinical Pathology*. 2014; 67(12), 1019–1025.
37. Mariana R. Tavares, Isadora C.B., Pavan, Camila L. Amaral, Leticia Meneguello. The S6K protein family in health and disease. *Life Sciences* 131 (2015) 1–10.
38. Pende M., Treins C. Ribosomal protein S6 and S6 kinases. *Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine*. 2014; 345–362.
39. Sheikh Tahir Majeed, Rabiya Majeed, Ghazia Shah, Khurshid I Andrabi. S6 Kinase: A Compelling Prospect for Therapeutic Interventions. 2018.
40. K A Martin, S S Schalm, A Romanelli, K L Keon, J Blenis. Ribosomal S6 Kinase 2 Inhibition by a Potent C-terminal Repressor Domain Is Relieved by Mitogen-Activated Protein-Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase-Regulated Phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7892-8.
41. Ruvinsky I., Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006; 31(6), 342–348.
42. Fenton, T. R, Gout I. T. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2011; 43(1), 47–59.

43. A Krook, M Björnholm, D Galuska, X J Jiang, R Fahlman, M G Myers, Jr. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. 2000; 49(2):284-292.
44. Kangduk Choi, Young-Bum Kim. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. 2010; 25.2.119.
45. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. 2009; 296(4):581–591.
46. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*; 2009, 9(6):753-762.
47. Kruger N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. 2009; 17–24.
48. DJ Price, Grove JR, V Calvo, J Avruch, BE Bierer. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase
49. Yehiel Zick. Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A Molecular Basis for Insulin Resistance. 2005; (268), pe4.
50. Brunelle E., Le A. M., Huynh C., Wingfield K. (2017). Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye: An Application for Forensic Fingerprint Analysis. *Analytical Chemistry*. 2017; 89(7), 4314–4319.
51. M. Ueno, J. B. C. Carvalheira, R. C. Tambascia, R. M. N. Bezerra, M. E. Amaral. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70S6K pathway. 2005; *Diabetologia* volume 48, p. 506–518.
52. Meenu Rohini Rajan., Siri Fagerholm., Cecilia Jonsson., Preben Kjølhede, Maria V. Turkina. Phosphorylation of IRS1 at Serine 307 in Response to Insulin in Human Adipocytes Is Not Likely to be Catalyzed by p70 Ribosomal S6 Kinase. 2013; *PLoS ONE* 8(4): e59725.