

Субклітинна локалізація S6K1 і S6K2 форм кінази рибосомного білка S6 у тиреоцитах щурів за умов дво- та тривимірної культури

А. І. Хоруженко, О. В. Чередник, В. В. Філоненко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Бул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

a.i.khoruzhenko@imbg.org.ua

За умов моношарової культури тиреоцитів щура відбувається внутрішньоклітинний перерозподіл S6K1/2, які поряд з цитоплазмою детектуються у ядрах клітин. Метою роботи було дослідити зв'язок між активацією процесів міграції, проліферації, втрати фолікулярної організації тиреоцитів за різних умов культивування та субклітинною локалізацією S6K1/2. Виявлено загальне зростання вмісту S6K1/2 у проліферуючих клітинах. У тиреоцитах, культивованих у вигляді фолікулів, внутрішньоклітинна локалізація S6K1/2 не змінюється відносно нормальної тканини. Субклітинну релокалізацію S6K1/2 відзначено лише для окремої популяції клітин, що за певних причин втратили фолікулярну організацію і відповідно функціональну активність. Отже, зміна субклітинної локалізації S6K1/2 у культивованих тиреоцитах безпосередньо пов'язана зі зміною рівня диференціації на відміну від проліферації та міграції цих клітин.

Ключові слова: кіназа рибосомного білка S6, тиреоцити, рівень диференціації.

Вступ. Головна функція щитовидної залози як ендокринного органа полягає у продукуванні тиреоїдних гормонів, які відіграють важливу роль в обміні речовин організму людини та тварин. Основною структурною і функціональною одиницею щитовидної залози є фолікул, що складається із замкненого на себе одношарового призматичного або кубічного епітелію, апікальна частина якого утворює люмен, заповнений колоїдом, що містить глікопротеїн тиреоглобулін. Саме фолікулярна організація тиреоцитів забезпечує багатостадійний процес синтезу тиреоїдних гормонів. На культивованих тиреоцитах показано, що втрата фолікулярної організації та деполаризація призводять до зни-

ження вмісту тиреоглобуліну і дедиференціювання цих клітин [1, 2].

Роботу щитовидної залози регулюють кілька чинників, головним із яких є гіпофізарний тиреотропний гормон (ТТГ). Продемонстровано, що вплив ТТГ на клітини щитовидної залози здійснюється через фосфатидилінозитол-3 кіназний (РІЗК) шлях внутрішньоклітинної передачі сигналу [3]. На культивованих тиреоцитах показано наявність взаємодії між рецептором ТТГ та регуляторною р85 - субодиницею РІЗК. Зазначалося, що ТТГ стимулює взаємодію між рецептором ТТГ і РІЗК, яка призводить до РІЗК- та протеїнкіназа А (РКА)-залежної транслокації фосфоліпід-залежної кінази (PDK1). Через РІЗК-, PDK1- і РКА-залежні шляхи ТТГ стимулює кіназу рибосомного білка

S6K, що в свою чергу впливає на проліферацію *in vitro* та функціональну активність фолікулярних клітин *in vivo* [4].

S6K належить до AGC родини серин/треонінпротеїнкіназ, до якої входять протеїнкіназа С, протеїнкіназа В, SGKs, і 90-кДа рибосомна кіназа S6 [5]. Існують дві форми S6 кінази – S6K1 і S6K2, кожна з яких має цитоплазматичну (S6K1 II і S6K2 II) і ядерну (S6K1 I та S6K2 I) ізоформи [6]. Показано, що активація S6K регулюється внаслідок фосфорилування/дефосфорилування у відповідь на різні позаклітинні стимули, серед яких ростові фактори, цитокіни та гормони. Наразі не виявлено прямих високоспецифічних інгібіторів S6K. Численні дослідження вказують на те, що PI3K- і mTOR-сигнальні шляхи є ключовими для повної активації S6K1.

Раніше експресію S6K аналізували на пухлинах щитовидної залози людини, нормальній тканині та на клітинних лініях [7–9]. Відзначено надекспресію цих кіназ у папілярних карциномах порівняно з нормальною тканиною. Дослідження виконували, використовуючи Вестерн-блот аналіз та імуногістохімічну техніку, що дозволило виявити цитоплазматичну локалізацію S6K1 у нормальній тканині та при папілярній карциномі щитовидної залози людини.

Нами показано, що на гістологічних зрізах щитовидної залози щурів S6K1 і S6K2 знайдено переважно у цитоплазмі клітин [10]. Під час культивування ізольованих фолікулів щитовидної залози за умов моношарової культури при розпластуванні фолікулів і відповідно при втраті фолікулярної організації тиреоцитів поряд з цитоплазматичною спостерігається позитивна імуноцитохімічна реакція у ядрах клітин. Спочатку S6K1/2 позитивні ядра тиреоцитів з'являються по краю колонії клітин, а з часом позитивна реакція визначається в ядрах усіх інших клітин [10]. Це стало підставою для припущення про зв'язок процесів активації міграції з внутрішньоклітинним перерозподілом згаданих кіназ. З іншого боку, відомо, що S6K бере участь у контролі над процесом проліферації [11]. У попередньому дослідженні не виявлено кореляції між експресією антигену Ki-67 та появою S6K-позитивних ядер тиреоцитів [10]. Тому питання про

роль S6K1/2 у регуляції проліферації тиреоцитів потребує подальшого вивчення. Крім того, встановлено, що при культивуванні фолікулів за умов двовимірної культури протягом 10 діб вміст тиреоглобуліну у тиреоцитах суттєво зменшується [10]. Це свідчить про можливий зв'язок між зниженням рівня функціональної активності тиреоцитів *in vitro* та зміною внутрішньоклітинної локалізації S6K1 і S6K2.

Отже, процес культивування тиреоцитів супроводжується активацією процесів міграції, проліферації клітин і зміною тканинної структурної організації та функціональної активності, що меншою мірою стосується культивування фолікулів у тривимірних умовах [2].

Метою цієї роботи було дослідити зв'язок зазначених процесів із вмістом та внутрішньоклітинним розподілом S6K1/2 у культивованих за різних умов тиреоцитах. Це поєднує як одержання моношарових культур, так і тривимірних культур із збереженням фолікулярної організації тиреоцитів, а також використання методу вивчення процесів міграції клітин на полікарбонатних фільтрах з подальшим імуноцитохімічним аналізом [2, 12]. Наявність проліферуючих клітин та тиреоглобуліну визначали за допомогою імунопероксидазного та імуофлуоресцентного методів.

Матеріали та методи. Реагенти. Реагенти для культивування та хемілюмінесцентний реагент отримували від «Sigma» (США), антитіла до тиреоглобуліну (Tg) та Ki-67 – від «Dako» (Данія); антитіла до мітоген-активованих протеїнкіназ Phospho-p42-44MAPK – «BioLabs» (США). Поліклональні та моноклональні антитіла до S6K1/2 та топоізомерази отримано у нашій лабораторії. Трансвели з діаметром пор полікарбонатної мембрани 8 мкм одержано від «Costar» (США).

Отримання культур тиреоцитів. Суспензію фолікулів щитовидної залози щурів лінії Wistar готували за методом, описаним раніше [10]. Тканину щитовидної залози подрібнювали, інкубували із сумішшю ферментів колагеназа/диспаза з додаванням інгібітора трипсину протягом 2 год за температури 37 °С. Після цього додавали поживне середовище (RPMI-1640, 17 % FCS, 4 мМ глутамін, 50 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину,

1 мкг/мл амфотерицину В). Дезагрегований матеріал фільтрували через нейлоновий фільтр з діаметром пор 180 мкм та збирали на нейлоновий фільтр з діаметром пор 30 мкм. Ізольовані фолікули відмивали поживним середовищем та центрифугували. Для отримання моношарових культур фолікули переносили в чашки Петрі, культури агрегатів фолікулів одержували на чашках, попередньо вкритих 1 %-ю агарозою. Культивування проводили при $t = 37^\circ\text{C}$ у вологій атмосфері з 7 %-м CO_2 .

Міграція тиреоцитів через трансвелі. Суспензію фолікулів вмішували у верхню камеру трансвелів у поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 1 % альбуміну сироватки людини, 4 мМ глутаміну та суміші антибіотиків. У нижню камеру вмішували поживне середовище з 20 % FCS для стимуляції хемотаксису тиреоцитів. Культивування тривало упродовж 4 діб, середовище у нижній і верхній камерах змінювали щодня. Фільтри фіксували метанолом протягом 5 хв, клітини у верхній камері знімали за допомогою ватного тампона, залишаючи лише клітини, які промігрували на нижню поверхню фільтра.

Імуноцитохімічний та імуногістохімічний аналіз. Наявність Tg і локалізацію S6K1 та S6K2 визначали непрямим імунопероксидазним методом на парафінових зрізах культивованих агрегатів фолікулів, моношарових культурах та на тиреоцитах, культивованих у трансвеллах. Гістологічні зрізи депарафінізували і зневоднювали. Ендогенну пероксидазу пригнічували 3 %-м розчином H_2O_2 протягом 30 хв. Після блокування неспецифічного зв'язування за допомогою 10 % FCS зрізи інкубували з первинними моноклональними антитілами (S6K1, 1:50; S6K2, 1:200; Tg, 1:100) протягом 90 хв за $t = 37^\circ\text{C}$. Інкубація з вторинними антитілами, міченими пероксидазою, тривала 1 год за $t = 37^\circ\text{C}$. Для проявлення реакції використовували розчин 3,3-діамінобензидинтетрахлоїду.

При проведенні подвійної імунохімічної реакції спочатку перший антиген (Tg, 1:100; MAPK, 1:50 або Ki-67, 1:50) виявляли за допомогою імуноферментного методу, використовуючи вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому. Одразу після цього наявність S6K1 і S6K2 визначали імунофлуоресцентним методом за допомогою вторинних ан-

титіл, мічених FITC. Для зниження фону автофлуоресценції препарати інкубували протягом 30 хв у 10 мМ CuSO_4 та 50 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, рН 5,0. Контрольні препарати відрізнялися вилученням первинних антитіл до першого та другого антигенів.

Усі досліди повторювали не менше 3 разів. Мікроскопічні дослідження здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DM1000 (Німеччина).

Результати і обговорення. Для визначення наявності S6K1 та S6K2 у проліферуючих клітинах проведено подвійну імуноцитохімічну реакцію на моношарових культурах тиреоцитів. Згадану методику відпрацьовували на клітинах лінії MCF-7, яким притаманний високий рівень експресії кіназ рибосомного білка S6. Отримані результати свідчать, що після 3 діб культивування суспензії фолікулів за умов моношару кількість проліферуючих клітин, позитивних стосовно Ki-67 антигену, є доволі незначною. На 6-й і 10-й дні кількість Ki-67 позитивних клітин суттєво зростала. У цих тиреоцитах відзначено посилену реакцію на S6K1 і S6K2 (рис. 1, б, з, див. уклейку). Окрім того, за допомогою подвійної імуноцитохімічної реакції у тиреоцитах проаналізовано локалізацію активованих MAP кіназ і S6K1/S6K2. Як і в разі антигену Ki-67 показано, що в клітинах, позитивних стосовно фосфорильованих MAP-кіназ (рис. 1, д, е, див. уклейку), спостерігається посилена реакція на S6K1/S6K2 (рис. 1, е, ж, див. уклейку). Таким чином, на первинній культурі тиреоцитів щура продемонстровано зростання вмісту S6K1/S6K2 у проліферуючих клітинах.

Отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо залучення S6K до регуляції процесу проліферації. Так, при стимуляції ендотеліальних клітин людини до проліферації ангіопоетином I зафіксовано активацію S6K1 і MAPK [13]. Крім того, активацію білкового синтезу, опосередковану S6K у клітинах васкулярного ендотелію людини, спостерігали як ключовий етап у проходженні клітинного циклу [14]. У штучно викликаних пухлинах мишей, продукуючих TSH, відзначено активацію S6K при аберантному рості гіпофізу [15]. Проте, як показано нами раніше, зміна субклітинної локалізації досліджуваних кіназ не пов'язана безпосередньо з проліферацією тиреоцитів [10].

Для визначення локалізації S6K1 і S6K2 у мігруючих тиреоцитах щура використано трансвели. Культивування вели протягом 4 діб. Тривалий термін культивування підбрано експериментально з огляду на те, що перш ніж подолати пористу мембрану фолікули мають прикріпитися до неї та розпластатися. У контрольній серії дослідів для уникнення стимуляції хемотаксису вміст сироватки у верхній і нижній камерах був однаковим. Клітини на мембранах фіксували метанолом і імуноцитохімічним методом визначали субклітинну локалізацію S6K1 і S6K2. На нижньому боці фільтра виявлено колонії клітин, які промігрували, – як суцільні, так і такі, у яких відсутня центральна частина. Цей факт дає підставу для припущення, що клітинам, розташованим по краях, на відміну від таких, локалізованих у центрі, властива більша рухливість. У клітин, які промігрували на нижню поверхню мембрани, а також у тих, які залишилися на верхній поверхні, локалізація S6K1 і S6K2 була виявлено цитоплазматичною (рис. 2, див. уклеюку).

Наразі в літературі відсутні дані щодо субклітинної локалізації S6K1/2 у мігруючих клітинах. Проте є свідчення про участь PI3K-сигнального шляху та S6K у процесі міграції. У нещодавно опублікованих роботах продемонстровано, що пригнічення mTOR рапаміцином призводить до інактивації цього шляху, що в кінцевому підсумку дозозалежним чином гальмує міграцію клітин лінії NUGC4, які походять з карциноми шлунка [16]. З наведеними вище даними узгоджуються результати авторів роботи [17], проведеної на клітинах раку яєчника. Показано, що конститутивно активна форма S6K1 спричиняла індукцію інвазивного та міграторного фенотипу клітин. Крім того, активація S6K1 зумовлювала підвищення рівня експресії та протеолітичної активності матриксних металопротеїназ, зокрема MMP-9 [17]. Отримані нами результати не виключають можливості активації зазначених кіназ у цитоплазмі тиреоцитів, але вказують на те, що поява S6K1 і S6K2 у ядрах не пов'язана безпосередньо з процесом міграції клітин.

Раніше нами показано, що дедиференціація тиреоцитів у моношаровій культурі супроводжується субклітинною релокалізацією S6K1 і S6K2 [10]. Тому ми дослідили субклітинну локалізацію S6K1/2 у

тиреоцитах за умов культивування фолікулів на шарі агарози, коли фолікули утворювали між собою агрегати та зберігалася тканинна організація клітин щитовидної залози. Оскільки частина фолікулів при виділенні руйнувалася, такі фолікули спадалися, внаслідок чого агрегати мали ділянки з втраченою фолікулярною структурою. Агрегати фолікулів фіксували та імуногістохімічно визначали локалізацію вказаних кіназ на 3-, 6- та 10-ту добу культивування (рис. 3, див. уклеюку). Показано, що в ділянках із збереженою фолікулярною структурою S6K1 і S6K2 локалізуються переважно у цитоплазмі тиреоцитів.

Варто зазначити, що збереження або втрата фолікулярної організації при культивуванні за тривимірних умов корелювали з функціональним станом тиреоцитів, який визначали за вмістом тиреоглобуліну у клітинах (рис. 4, а, в, див. уклеюку). Так, клітини у складі фолікулів були позитивними щодо тиреоглобуліну, проте частина клітин, що втратила первинну гістологічну організацію, не містила тиреоглобуліну, тобто рівень їхньої функціональної активності був зниженим. Було проведено подвійне імуногістохімічне визначення наявності у клітинах тиреоглобуліну та S6K1/S6K2. У клітинах, які містили тиреоглобулін, S6K1 і S6K2 мали переважно цитоплазматичну локалізацію, як і у вихідній тканині щитовидної залози щура. Після 10 діб культивування у популяції клітин, що не зберегли фолікулярної організації і відповідно не містили тиреоглобуліну, мала місце позитивна реакція на S6K1/2 у ядрах тиреоцитів, як і в разі тривалого культивування тиреоцитів за умов моношарових культур (рис. 4, див. уклеюку). Крім того, у тиреоглобулін-негативних клітинах відзначено посилену реакцію на S6K1/2 порівняно з тими, що містили тиреоглобулін. Отримані дані дають підставу для припущення, що кінази рибосомного білка S6 – S6K1 і S6K2 залучені до процесу контролю над диференціацією тиреоцитів. За умови штучно викликаного дедиференціації відбувається релокалізація вказаних кіназ у порівнянні з нормальною тканиною щитовидної залози. Роль S6K у процесах диференціювання вивчали раніше на нервових клітинах, нейтрофілах та інших типах клітин [18, 19]. Так, виявлено, що пригнічення S6K1 гальмує

диференціації нервових клітин. Слід зазначити, що в нашій лабораторії вже показано наявність позитивної реакції на S6K2 у ядрах клітин карциноми молочної залози людини, якої не спостерігається в нормальній тканині. Крім того, встановлено, що кількість S6K1/2, детектованих у ядрах злоякісних клітин, значно більша в пухлинах низького рівня диференціації [20].

Висновки. Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що проліферація та міграція клітин щитовидної залози *in vitro* не пов'язані безпосередньо із зміною локалізації S6K1 і S6K2. З іншого боку, показано наявність зв'язку між проліферацією клітин та зростанням вмісту досліджуваних кіназ. У результаті проведених експериментів виявлено залежність між субклітинною локалізацією S6K1/2 та функціональним станом тиреоцитів, що може бути корисним при розробці препаратів, які модулюють функцію щитовидної залози при її патології.

A. I. Khoruzhenko, O. V. Cherednyk, V. V. Filonenko

Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in rat thyrocytes under conditions of two- and three-dimensional culture

Summary

The aim of this work was to study the link between activation of processes of migration, proliferation, loss of thyrocyte follicle organization at different culture conditions and subcellular localization of S6K1/2. The subcellular redistribution of S6K1/2 takes place in the rat thyrocyte monolayer culture where S6K1/2 was detected not only in the cytoplasm but in the nuclei of cells as well. In addition, the content of S6K1/2 in proliferating cells was increased. The subcellular localization of S6K1/2 in thyrocytes cultivated as follicles was similar to that observed in normal thyroid tissue. Subcellular relocation of S6K1/2 was detected only in certain cellular population, which for some reasons lost follicle organization and, consequently, functional activity. Thus, the changes in subcellular localization of S6K1/2 in cultivated thyrocytes are directly related to the level of differentiation, unlike proliferation and migration of these cells.

Keywords: ribosomal protein S6 kinase, thyrocytes, level of differentiation.

A. И. Хоруженко, О. В. Чередник, В. В. Филоненко

Субклеточная локализация S6K1 и S6K2 форм киназы рибосомного белка S6 в тиреоцитах крысы в условиях двух- и трехмерной культуры

Резюме

В условиях монослойной культуры тиреоцитов крысы происходит внутриклеточное перераспределение S6K1/2, которые наряду с цитоплазмой детектируются в ядрах клеток. Цель

работы состояла в изучении связи между активацией процессов миграции, пролиферации, потери фолликулярной организации тиреоцитов при разных условиях культивирования и субклеточной локализацией S6K1/2. Обнаружено общее повышение содержания S6K1/2 в пролиферирующих клетках. В тиреоцитах, культивируемых в виде фолликулов, внутриклеточная локализация S6K1/2 не изменялась по сравнению с нормальной тканью. Субклеточная релокализация S6K1/2 отмечена лишь для отдельной популяции клеток, которые по различным причинам теряли фолликулярную организацию и соответственно функциональную активность. Таким образом, изменение субклеточной локализации S6K1/2 в культивируемых тиреоцитах непосредственно связано с изменением уровня дифференциации в отличие от пролиферации и миграции этих клеток.

Ключевые слова: киназа рибосомного белка S6, тиреоциты, уровень дифференциации.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Westermarck B., Heldin N., Westermarck K. Structural and functional properties of thyroid follicle cell in culture // *Acta Physiol. Scand. Suppl.*—1990.—**592**.—P. 15–24.
2. Khoruzhenko A. New approaches for thyrocyte cultivation *in vitro* with retention of their follicular organization // *Exp. Oncol.*—2002.—**24**.—P. 99–104.
3. Medina D., Santisteban P. Thyrotropin-dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems // *Eur. J. Endocrinol.*—2000.—**143**.—P. 161–178.
4. Suh J. M., Song J. H., Kim D. W., Kim H., Chung H. K., Hwang J. H., Kim J. M., Hwang E. S., Chung J., Han J. H., Cho B. Y., Ro H. K., Shong M. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase, Akt/protein kinase B, FRAP/mammalian target of rapamycin, and ribosomal S6 kinase 1 signaling pathways by thyroid-stimulating hormone (TSH) and stimulating type TSH receptor antibodies in the thyroid gland // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**, N 24.—P. 21960–21967.
5. Valovka T., Verdier F., Cramer R., Zhyvoloup A., Fenton T., Rebholz H., Wang M., Gzhegotsky M., Lutsyk A., Matsuka G., Filonenko V., Wang L., Proud C., Parker P., Gout I. Protein kinase c phosphorylates ribosomal protein S6 kinase beta II and regulates its subcellular localization // *Mol. Cell. Biol.*—2003.—**23**, N 3.—P. 852–863.
6. Ruvinsky I. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size // *Trends Biochem. Sci.*—2006.—**31**, N 6.—P. 342–8.
7. Miyakawa M., Tsushima T., Murakami H., Wakai K., Isozaki O., Takano K. Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and Akt in papillary thyroid cancer tissues // *Endocrinol. J.*—2003.—**50**, N 1.—P. 77–83.
8. Lyzogubov V., Usenko V., Khojaenko Yu., Lytvyn D., Soldatkina M., Rodnin N., Filonenko V., Pogribniy P. Immunohistochemical analysis of p70S6 kinase in a human thyroid tissue upon pathology // *Exp. Oncol.*—2003.—**25**, N 4.—P. 304–306.
9. Coulonval K., Vandeput F., Stein R., Kozma S., Lamy F., Dumont J. Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin // *Biochem. J.*—2000.—**348**, N 2.—P. 351–358.

10. Khoruzhenko A. I., Cherednyk O. V., Filonenko V. V. Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in primary monolayer culture of rat thurocytes // Біополімери і клітина.–2008.–**24**, № 1.–P. 35–40.
11. Ouyang W., Li J., Ma Q., Huang C. Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells // Carcinogenesis.–2006.–**27**, N 4.–P. 864–873.
12. Vuillermoz B., Khoruzhenko A., D'Onofrio M. F., Ramont L., Venteo L., Perreau C., Antonicelli F., Maquart F. X., Wegrowski Y. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression // Exp. Cell Res.–2004.–**296**, N 2.–P. 294–306.
13. Kanda S., Miyata Y., Mochizuki Y., Matsuyama T., Kanetake H. Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells // Cancer Res.–2005.–**65**, N 15.–P. 6820–6827.
14. Vinals F., Chambard J. C., Pouyssegur J. p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation // J. Biol. Chem.– 1999.–**274**, N 38.–P. 26776–26782.
15. Lu C., Willingham M., Furuya F., Cheng S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling promotes aberrant pituitary growth in a mouse model of thyroid-stimulating hormone-secreting pituitary tumors // Endocrinology.– 2008.–**149**, N 7.–P. 3339–3345.
16. Hashimoto I., Koizumi K., Tatematsu M., Minami T., Cho S., Takeno N., Nakashima A., Sakurai H., Saito S., Tsukada K., Saiki I. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells // Eur. J. Cancer.–2008.–**44**, N 7.–P. 1022–1029.
17. Zhou H. Y., Wong A. S. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells // Endocrinology.–2006.–**147**, N 5.–P. 2557–2566.
18. Kanayasu-Toyoda T., Yamaguchi T., Oshizawa T., Kogi M., Uchida E., Hayakawa T. Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells – a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide- or retinoic acid- treated HL-60 cells // Arch. Biochem. Biophys.–2002.–**405**, N 1.–P. 21–31.
19. McNeill H., Craig G. M., Bateman J. M. Regulation of neurogenesis and epidermal growth factor receptor signaling by the insulin receptor/target of rapamycin pathway in *Drosophila* // Genetics.–2008.–**179**, N 2.–P. 843–853.
20. Savinska L., Lyzogubov V., Usenko V., Ovcharenko G., Gorbenko O., Rodnin N., Vudmaska M., Pogribnij P., Kyymova R., Panasyuk G., Nemazanyy I., Malets M., Palchevskyy S., Gout I., Filonenko V. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 expression in human breast tumors // Exp. Oncol.–2004.–**26**, N 1.–P. 24–30.

УДК 577.25, 591.87, 611.44
Надійшла до редакції 15.05.08

Рис. 1 до статті А. І. Хоруженко та співавт.

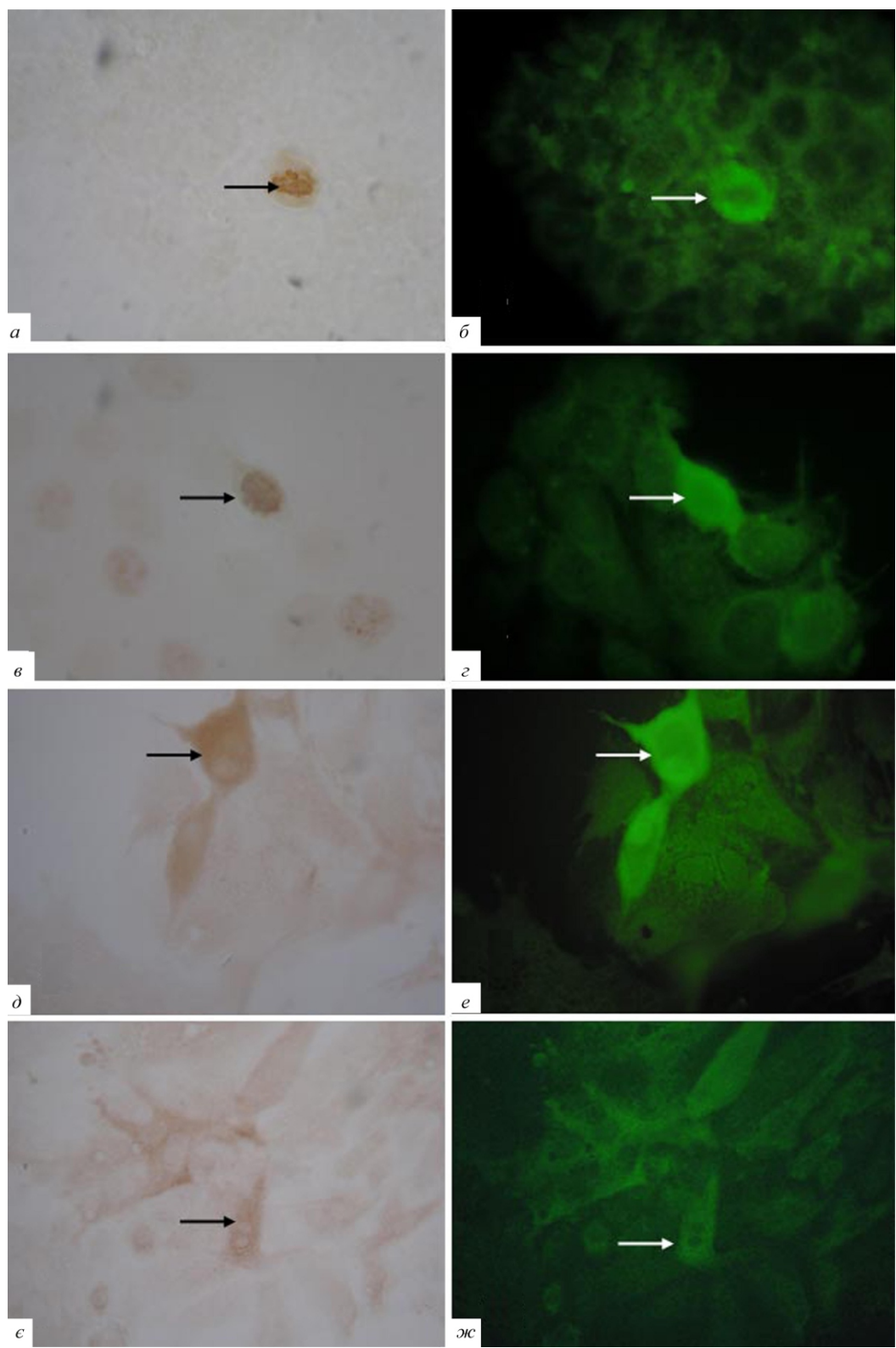


Рис. 1. Подвійне імунохімічне визначення Ki-67, MAPK, S6K1 і S6K2 в тиреоцитах щура за умов моношарової культури: а, в, д, є – імунопероксидазна реакція; б, г, е, жс – імунофлуоресцентна реакція (а, в – визначення антигену Ki-67; б, г – визначення S6K1 і S6K2 відповідно у тих же тиреоцитах, обидві стрілки вказують на одну й ту саму клітину; д, є – визначення MAPK; е, жс – визначення S6K1 і S6K2 відповідно у тих же тиреоцитах, обидві стрілки вказують на одну й ту саму клітину). Збільшення 10 40

Рис. 2 до статті А. І. Хоруженко та співавт.

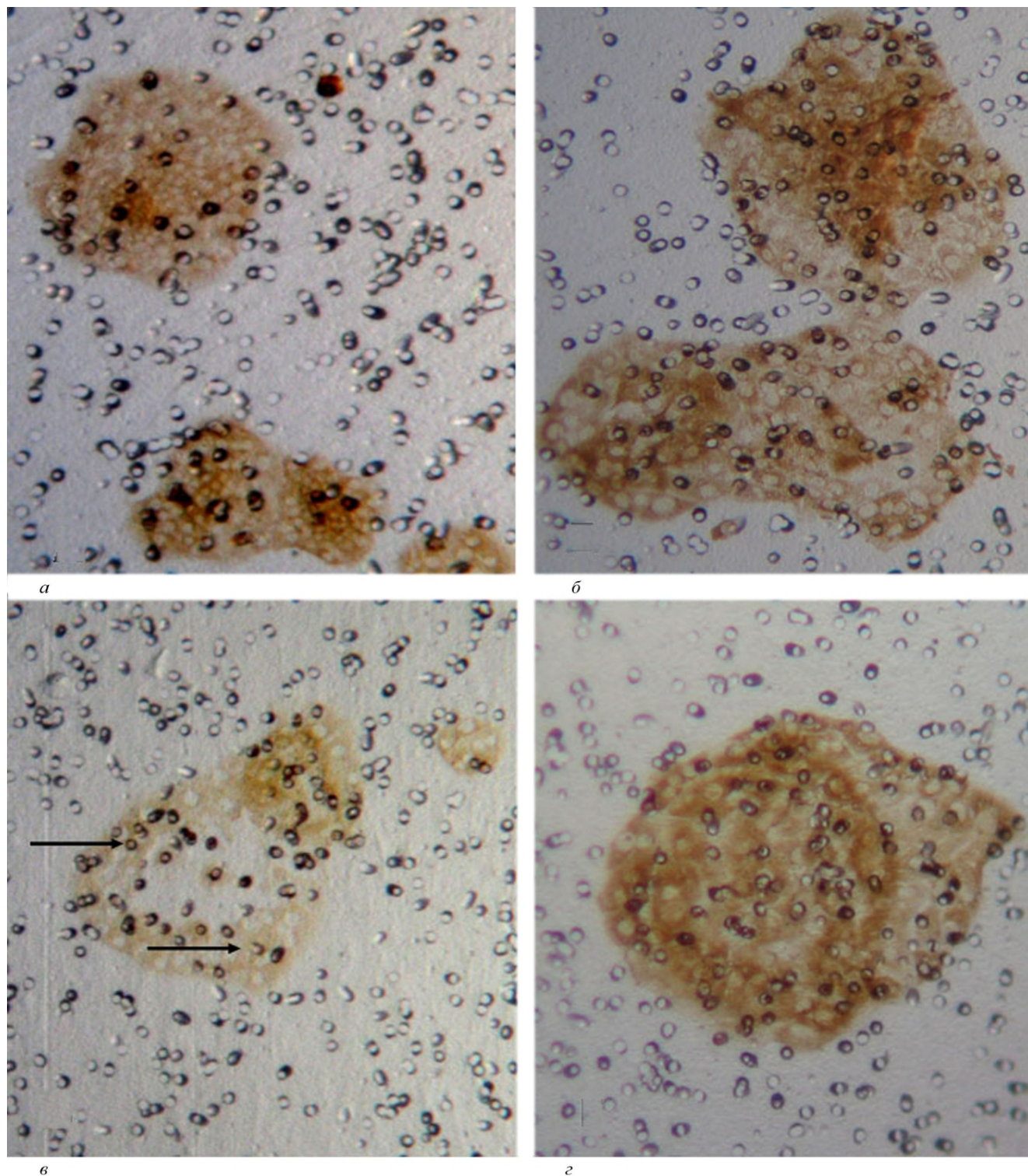


Рис. 2. Імунопероксидазне визначення локалізації S6K1 (а, в) та S6K2 (б, г) у тиреоцитах на верхній поверхні мембрани трансвелу (а, б) і на нижній поверхні після міграції (в, г). Скрізь спостерігається цитоплазматична локалізація S6K1/2. Під час міграції тиреоцитів із розпластаного фолікула першими фільтр долають клітини, розташовані по краю колонії (стрілка), тоді як клітини центральної зони ще не мігрували (в). Збільшення 10 5

Рис. 3 до статті А. І. Хоруженко та співавт.

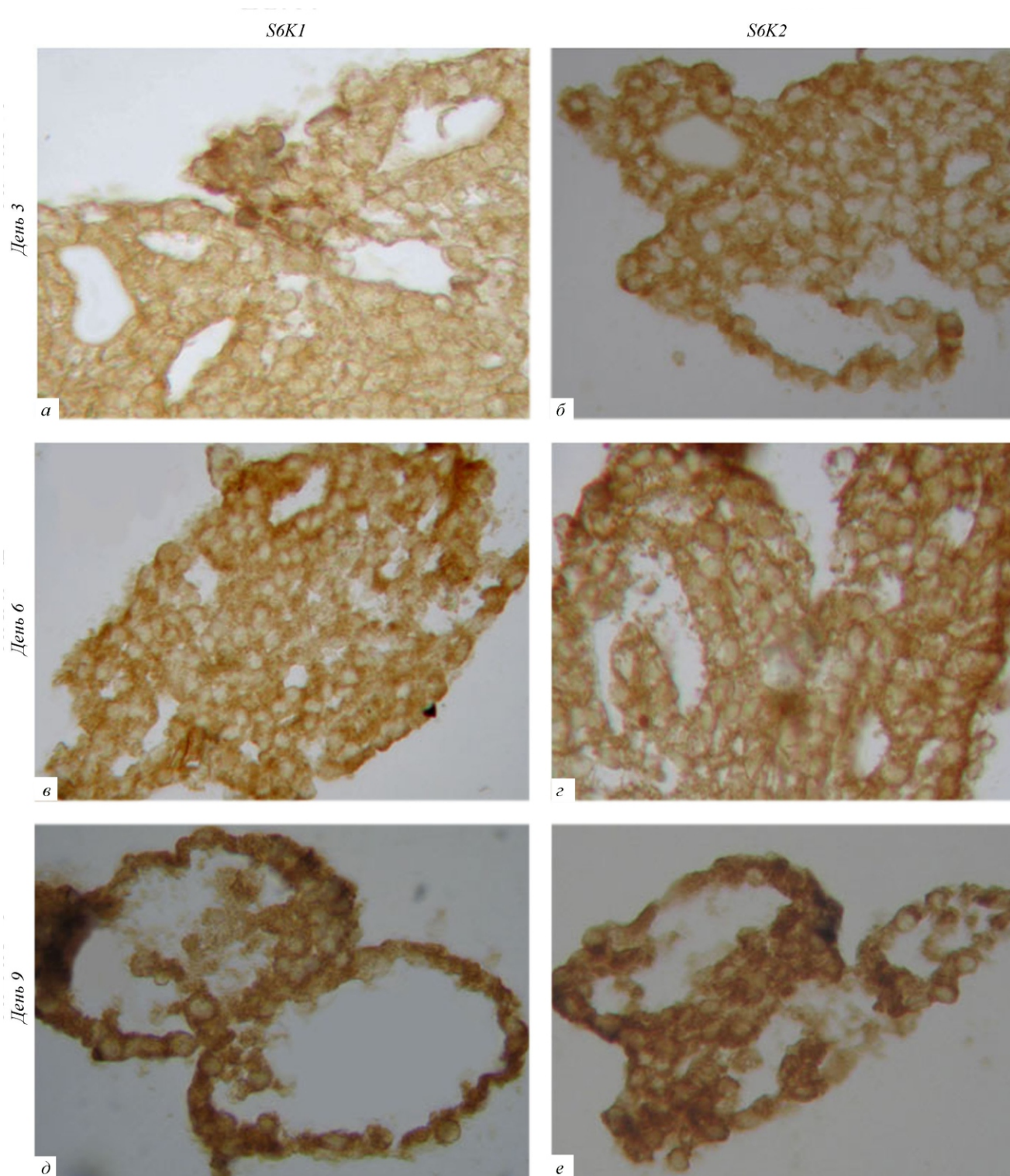


Рис. 3. Визначення субклітинної локалізації S6K1 (а, в, д) і S6K2 (б, з, е) у клітинах агрегатів фолікулів, культивованих за тримісних умов. Спостерігається переважно цитоплазматична локалізація зазначених кіназ у тиреоцитах. Збільшення 10 40

Рис. 4 до статті А. І. Хоруженко та співавт.

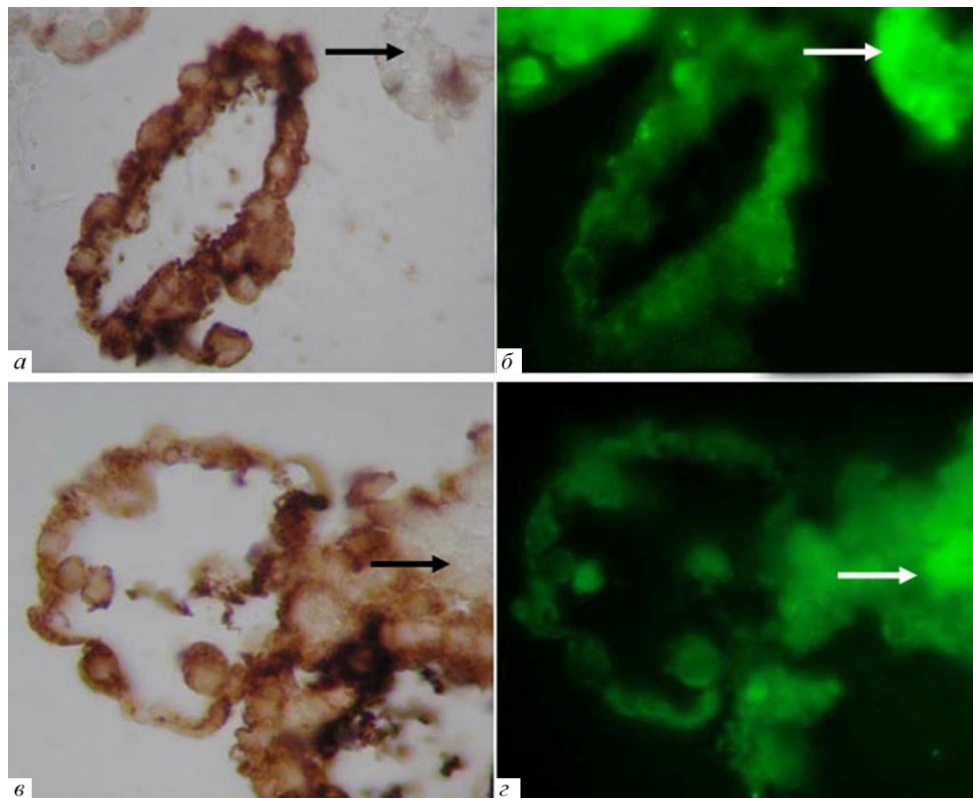


Рис. 4. Подвійне імунохімічне визначення співлокалізації тиреоглобуліну (*a, в* – імунопероксидазний метод) та S6K1 і S6K2 (відповідно *б, г* – імунофлуоресцентний метод) в агрегатах фолікулів на 10-ту добу культивування. Стрілки вказують на ділянки, де відсутня фолікулярна структура і тиреоглобулін. У тиреоцитах, що не містять тиреоглобуліну, відзначено появу S6K1/2-позитивних ядер. Збільшення 10 40