БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 12, с. 1895 – 1906

УДК 577.214

Notch1-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ КОНТРОЛИРУЕТСЯ Akt1-ОПОСРЕДОВАННЫМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ БЕЛКА RBP-Jk

© 2019 М.-Е. Ким*, Ц.И. Парк, Х.-С. Парк*

School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, 61186 Gwangju, Republic of Korea; E-mail: mykim31002@gmail.com, proteome@jnu.ac.kr

Поступила в редакцию 31.05.2019
После доработки 17.07.2019
Принята к публикации 17.07.2019

Notch1-зависимый сигнальный путь играет ключевую роль в определении судьбы клеток, включая их рост и дифференцировку. В настоящей работе показано антагонистическое действие RTK-зависимого сигнального пути в отношении Notch1-зависимого пути передачи сигнала, осуществляемое с участием Ras-PI3K-Akt1. Обнаружено, что PI3K-Akt1-опосредованный сигнальный путь ингибирует Notch1-зависимый сигнальный путь в результате фосфорилирования белка RBP-Jk. Показано не только снижение уровня ассоциации Notch1 и RBP-Jk, но и подавление транскрипционной активности Notch1. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что Akt1 функционирует как естественный ингибитор Notch1-зависимого сигнального пути, осуществляя фосфорилирование белка RBP-Jk.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Notch1-зависимый сигнальный путь, Akt1, фосфорилирование.

DOI: 10.1134/S0320972519120133

Белки Notch1 являются высоко консервативными трансмембранными рецепторами I типа, которые регулируют процессы, определяющие судьбу клетки, включая дифференцировку, пролиферацию и гибель клеток [1–3]. Белок Notch1 подвергается серии расщеплений, в результате которых высвобождается его внутриклеточный домен (Notch-IC). Этот домен далее транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует с различными комплексами активации процесса транскрипции, включая ДНК-связывающий белок RBP-Jk/CBF-1, гомолог (в клетках млекопитающих) белка дрозофилы, называемого *Drosophila melanogaster* Suppressor of Hairless [Su(H)], белка-коактиватора MAML-1 (mastermind-like-1) и p300/CREB-связывающего белка. В результате этих белок-белковых взаимодействий происходит активация процесса транскрипции нижележащих генов-мишеней, кодирующих Hes1 и Hes5 [4–6]. В отсутствии Notch RBP-Jk действует как репрессор транскрипции некоторых генов, кодирующих, в том числе, SHARP (SMRT и HDAC ассоциированный репрессорный белок), CtBP (*C*-концевой связывающий белок) и CtIP (взаимодействующий с CtBP белок) [7].

Рецепторные тирозинкиназы (RTKs) являются основными регуляторами PI3K/Akt-опосредованного пути передачи сигнала, регулирующего многие естественные процессы внутри клетки, включая рост, выживание, гибель и метаболизм клеток. Нарушение регуляции этого сигнального пути ассоциировано с развитием и прогрессированием канцерогенеза [8]. На *N*-концевом участке белка Akt1 находится домен гомологии с плекстрином, который, как предполагается, непосредственно связывает фосфолипидные продукты PI3K [9]. В результате такого связывания Akt1 появляется на мембране и претерпевает конформационные изменения, которые позволяют киназам PDK1 и PDK2 фосфорилировать этот белок по аминокислотным остаткам (а.о.) Thr308 и Ser473 соответственно [9–11]. Фосфорилирование этих остатков приводит к полной активации киназы Akt1, которая целенаправленно действует на компоненты клетки, в том числе, на BAD, каспазу 9, IKK, GSK3-β, Raf, FKHR, eNOS, p21 и mdm2 [12–15]. Посттрансляционная модификация этих белков-мишеней с помощью Akt1 может как отрицательно, так и положительно влиять на активность этих белков и таким образом оказывать регулирующее воздействие на многочисленные кле-

Принятые сокращения: Notch1-IC – внутриклеточный домен Notch1; RTK –рецепторная тирозинкиназа; PI3K – фосфатидилинозитол 3-киназа.

* Адресат для корреспонденции.

точные процессы, включая рост, выживание и гибель клеток, а также влиять на развитие заболеваний человека, таких как рак и сахарный диабет 2-го типа [15–18].

Существование перекрестных связей между PI3K/Akt- и Notch1-зависимыми сигнальными путями было ранее продемонстрировано в нескольких работах [19–22]. Notch1- и RTK-зависимые сигнальные пути взаимодействуют генетически в многочисленных системах. Как антагонистические, так и агонистические взаимодействия между этими сигнальными путями были показаны в процессах развития и неоплазии [23–26]. Однако не была выявлена возможность того, что RTK-опосредованные сигналы могут оказывать прямое влияние на Notch1. В настоящей работе представлены доказательства того, что автономное взаимодействие в клетке между RTK- и Notch1-зависимыми сигнальными путями опосредуется прямой модификацией белков Notch1 или RBP-Jk.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры, плазмиды и трансфекция. Фибробласты линии NIH3T3 культивировали при 37 °C в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 1%-ным пенициллином/стрептомицином в увлажненном инкубаторе в атмосфере 95%-ного воздуха и 5%-ной CO_2. Полноцепочечные ДНК генов *Akt1*, *RBP-Jk* и *Notch1* получали с помощью ПЦР, затем их вставляли в векторы экспрессии в клетках млекопитающих: pcDNA3, pCMV и pCS2. Все тэги плазмид размещались на *N*-конце. Для трансфекции плазмидной ДНК плотность клеток в планшетах доводили до 50–60% конфлуентности и трансфицировали соответствующими векторами экспрессии в присутствии обозначенных комбинаций плазмидных ДНК (2 мкг на ячейку) с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine®2000 («Invitrogen», США).

Определение с использованием люциферазы проводили как было описано ранее [27]. Люциферазная репортерная плазмида контролировалась структурой 4 × CSL-Luc (4 раза повторяющийся участок таргетной последовательности для RBP-Jk, CGTGGGAA, с геном люциферазы). Клетки (12-ячеечные планшеты) были трансфицированы Myc-Notch1-IC и репортерной системой Notch1-зависимой транскрипции (4 × CSL-Luc) вместе с β-галактозидазой. После 48 ч трансфекции клетки лизировали с использованием хемилюминесцентного лизисного буфера и затем проводили анализ с помощью люминометра (Berthold). Активность люциферазного репортера в каждом образце нормализовали относительно активности β-галактозидазы, которую также измеряли в каждом образце.

Иммуноблоттинг и ко-иммунопреципитация. Клетки NIH3T3 трансфицировали вышеуказанными векторами экспрессии в течение 48 ч и затем промывали ледяным натрий-фосфатным буфером (PBS). Клетки лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1%-ный Nonidet P-40, 0,5%-ный дезоксихолат натрия, 0,1%-ный додецилсульфат натрия (SDS), 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид (PMSF), 1 мМ дитиотрейтол (DTT) и по 2 мкг/мл лейпептина и апротинина). Лизаты клеток центрифугировали при 12 000 g и 4 °C в течение 20 мин. Полученный супернатант инкубировали с вышеуказанными антителами и затем с 20 мкл гранул белок А-агарозы. Гранулы промывали трижды ледяным PBS и кипятили в буфере Лэммли. Полученные осадки кипятили при 95 °C 5 мин и белки разделяли с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. После завершения электрофореза разделенные белки с помощью электроблоттинга переносили на поливинилиденфлуоридные мембраны («Millipore», США). Затем мембраны блокировали солевым раствором (TBS, pH 7,4), содержащим 0,1%-ный Tween 20 и 5%-ное обезжиренное молоко. Перенесенные на нитроцеллюлозную мембрану белки обрабатывали специфичными антителами против Myc (9E10), HA (12CA5) и Flag («Sigma», США) или антителами против SMRT («Santa Cruz», США) и инкубировали со вторыми антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Amersham Biosciences», США). Визуализация блотов происходила за счет усиленной хемилюминесценции.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток проводили, как было описано для клеток NIH3T3, нанесенных в количестве 1×10^5 клеток на ячейку на покровное стекло («Fisher», Великобритания) [28]. Всего трансфицировали 0,5 мкг соответствующей ДНК на каждую ячейку с использованием реагента Lipofectamine-PLUS. Трансфицированные клетки фиксировали с использованием 4%-ного параформальдегида в PBS и затем их пермиализировали с помощью 0,1%-ного Triton X-100 в PBS. В качестве первых антител были использованы мышиные антитела против Flag и Myc в разведении 1 : 100. Затем добавляли вторые антимышиные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1:100) («Invitrogene»), и локализацию белков выявляли с помощью конфокального микроскопа («Leica TCS SPE», США).

Определение киназной активности Akt1. Клетки NIH3T3 инкубировали с культуральной средой, не содержащей сыворотку, в течение 24 ч при 37 °C. Культивируемые клетки собирали и лизировали в буфере A, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 2 мкг/мл лейпептина и апротинина, 25 мМ глицерофосфата, 0,1 мМ ортованадата натрия, 1 мМ фторида натрия, 1%-ный NP-40, 0,5%-ный дезоксихолата и 0,1%-ный SDS в течение 30 мин при 4 °C (все реагенты были приобретены в «VWR Life Science», США). Лизаты клеток затем были центрифугированы при 12 000 g 20 мин при 4 °C. Полученный супернатант инкубировали с антителами против Akt1 (1 мкг) («Cell signaling», США) 1 ч при 4 °C. Полученные иммунные комплексы затем связывали с белок A-агарозой при дополнительной инкубации в течение 1 ч при 4 °C, после чего их осаждали путем центрифугирования. Осажденные иммунные комплексы перемешивали три раза лизисным буфером и затем два раза 20 мМ HEPES (pH 7,4). Определение киназной активности иммунных комплексов проводили путем инкубации полученных осадков, содержащих иммунные комплексы, в течение 30 мин при 30 °C с 2 мкг гистона H2B в качестве субстрата в 20 мкл реакционного буфера, который содержал 0,2 мМ ортованадата натрия, 10 мМ $MgCl_2$, 2 μCi [γ-^{32}P]АТФ и 20 мМ HEPES (pH 7,4). Фосфорилированные субстраты разделяли с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS и определяли их количество на приборе Fuji BAS-2500. Для фузионных с GST белков в качестве субстратов их экспрессировали в клетках *Escherichia coli* с использованием pGEX-4T и очищали на GSH-сефарозе («GE Healthcare», США), как было описано ранее [27]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд («Shimadzu», Япония).

Сайт-направленный мутагенез кДНК RBP-Jk был выполнен с помощью набора QuickChange™ («Stratagene», США) с использованием ДНК-полимеразы PfuTurbo и температурного циклера. После осуществления температурных циклов образовавшийся продукт обрабатывали Dpn I. Полученную векторную ДНК, содержащую необходимые мутации, затем трансформировали в суперкомпетентные клетки XL1-Blue. Для получения мутаций использовали олигонуклеотиды:

T223A – 5'-CAATCGCCTTCGGTCCCAGGCAGTTAGTACCAGGTACCTG-3';

T223D – 5'-CAATCGCCTTCGGTCCCAGGATCTTAGTACCAGGTACCTG-3';

T223E – 5'-CAATCGCCTTCGGTCCCAGGAAGTTAGTACCAGGTACCTG-3'.

Мутации были подтверждены с помощью автоматизированного секвенирования ДНК.

Мечение изотопом фосфора в ходе реакции. Клетки NIH3T3 выдерживали без сыворотки 16 ч, промывали дважды ледяным TBS и затем инкубировали 3 ч при 37 °C в не содержащей фосфат DMEM («Gibco-BRL», США) и содержащей 0,5 mCi/мл ^{32}P-ортофосфата («Amersham Pharmacia»). Затем клетки инкубировали с 100 нМ вортманнина («Sigma») или 0,1 мМ LY294002 («Sigma») в течение 30 мин и далее с 100 нМ PDGF («Sigma») 20 мин. Клетки дважды промывали TBS, собирали и помещали в буфер для лизиса. Клеточные лизаты центрифугировали при 12 000 g 20 мин. Осветленные экстракты подвергали иммунопреципитации с использованием антител против Flag (1 мкг) («Sigma»). Полученные осадки промывали три раза лизисным буфером и два раза промывочным буфером. Образцы разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, белки визуализировали с помощью анализатора («Bio-Rad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

RTK-Ras-PI3K-Akt1-опосредованный сигнальный путь ингибирует Notch1-зависимый путь передачи сигнала. Чтобы выяснить роль RTK-Ras в Notch1-зависимой передаче сигнала, была изучена способность эндогенного лиганда RTK взаимодействовать с активированными конструкциями Notch1. Для исследования возможности того, что PDGF (фактор роста тромбоцитов), который хорошо известен как активатор Ras-PI3K-Akt1- и MAPK-зависимых сигнальных путей, модулирует Notch1-зависимый сигнальный путь, было изучено влияние PDGF на Notch1-зависимый сигналинг в клетках NIH3T3 с использованием люциферазной репортерной системы. Показано, что PDGF ингибирует Notch1-IC-индуцированную активность 4 × CSL-люциферазной репортерной системы (рис. 1, *a*). Однако PDGF не ингибировал транскрипционную активность Notch1-IC в том случае, если Notch1-IC был совместно экспрессирован с доминантно негативной мутантной формой Ras – RasN17 (рис. 1, *a*). Сходные результаты были получены с использованием Hes1-Luc и репортерной системы Hes5-Luc (данные не приведены).

На основании полученных результатов можно предположить, что активация белка Ras необходима для подавления транскрипционной активности Notch1 с помощью PDGF. Обработка клеток NIH3T3 с помощью FGF приводила к активации Ras, но не вызывала существенного

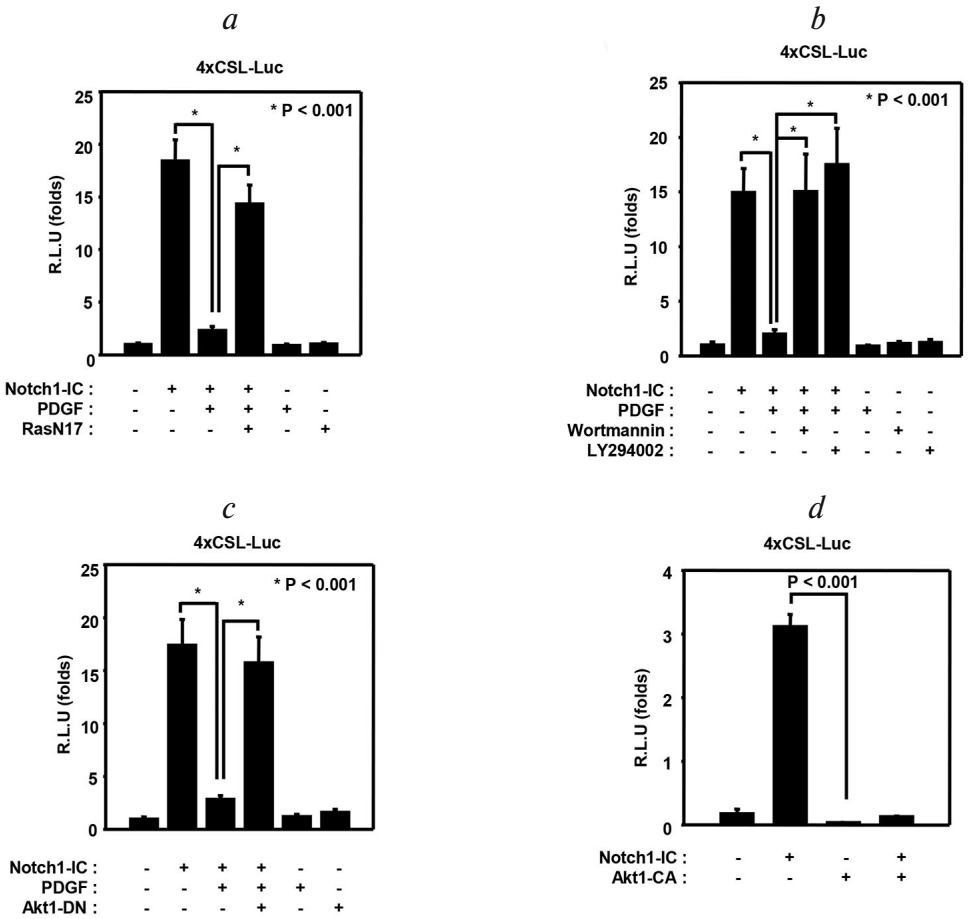

Рис. 1. Ингибирование Notch1-зависимого сигнального пути с помощью Ras-PI3K-Akt1-зависимого пути передачи сигнала. *a* – Клетки NIH3T3 сбыли кратковременно трансфицированы Notch1-IC, RasN17, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой и затем были обработаны PDGF (10 нг/мл) в течение 8 ч; *b* – клетки NIH3T3 были кратковременно трансфицированы Notch1-IC, RasN17, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой и затем были обработаны PDGF 8 ч и вортманнином (1 мкМ) или LY294002 (10 мкМ) 30 мин; *c* – клетки NIH3T3 были кратковременно трансфицированы Notch1-IC, Akt1-DN, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой и затем были обработаны PDGF в течение 8 ч; *d* – клетки NIH3T3 были кратковременно трансфицированы Notch1-IC, Akt1-CA, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой. Клетки лизировали и определяли их люциферазную активность (*a*–*d*). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов. R.L.U – это relative luciferase units (относительные единицы активности люциферазы)

ингибирования процесса активации Notch1-IC. В нескольких работах было показано, что в ответ на действие PDGF Ras-зависимый путь может стимулировать активность PI3K и, тем самым, повышать активность Akt1 через PDK1 и PDK2 [29–31]. Была исследована возможность того, что активация PI3K вносит вклад в ингибирование активности Notch1-IC. Обнаружено, что обработка ингибиторами PI3K (LY294002 и вортманнин) приводит к восстановлению транскрипционной активности генов-мишеней Notch1-IC в присутствии PDGF (рис. 1, *b*). Akt1 является одним из белков-мишеней PI3K, и доминантно негативная форма Akt1 (Akt1-DN) предотвращает ингибирование транскрипционной активности Notch1-IC с помощью PDGF (рис. 1, *c*). Наконец, конститутивно активная форма Akt1 (Akt1-CA) подавляет транскрипционную активность генов-мишеней Notch1-IC (рис. 1, *d*, показан только 4 × CSL). Результаты этих экспериментов согласуются с предположением о том, что рецепторы PDGF активируют Akt1 (через Ras и PI3K), и что активный Akt1 необходим для ингибирования транскрипционной активности Notch1. Кроме того, так как промотор 4 × CSL не содержит какие-либо сайты для дополнительных факторов транскрипции, а Hes-1 и Hes-5 люциферазы ведут себя сходным образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что Akt1 оказывает прямое влияние на Notch1-IC, RBP-Jk или требуемый кофактор, например. MAML-1.

Akt1 нарушает физическое взаимодействие между Notch1-IC и RBP-Jk и изменяет внутриклеточную локализацию RBP-Jk. Чтобы определить белок, на который направлено PDGF-опосре-

дованное PI3K-зависимое ингибирование генов-мишеней Notch1-IC, было проведено изучение образования комплекса между Notch1-IC и RBP-Jk в присутствии или отсутствии PDGF (рис. 2, *a*). Notch1-IC и RBP-Jk совместно осаждались антителами, однако в присутствии PDGF исчезала полоса Notch1-IC, которая взаимодействовала с RBP-Jk (рис. 2, *a*, дорожки *1* и *2*). Образование комплекса Notch1-IC-RBP-Jk восстанавливалось в присутствии ингибиторов PI3K (вортманнин и LY294002) (рис. 2, *a*, дорожки *3* и *4* соответственно). Далее была изучена ассоциация между Notch1-IC и RBP-Jk в присутствии или отсутствии Akt1. Взаимодействие между Notch1-IC и RBP-Jk строго подавлялось в присутствии активированного Akt1 (рис. 2, *b*). Эти результаты указывают на то, что Akt1 ингибирует физическое связывание Notch1-IC и RBP-Jk.

Чтобы уточнить какой белок является мишенью Akt1, было изучено образование комплекса SMRT/RBP-Jk. В отсутствии Notch1-IC RBP-Jk взаимодействует со SKIP и SMRT, и это есть то взаимодействие, которое позволяет RBP-Jk располагаться в ядре и действовать в качестве репрессора транскрипции [32]. Физическая ассоциация между SMRT и RBP-Jk также снижалась в присутствии Akt1-CA (рис. 2, *c*), указывая на то, что Akt1 может вызвать модификацию RBP-Jk. Если Akt1 вызывал диссоциацию комплекса SMRT/RBP-Jk, то результат должен быть сходен с данными, полученными в случае мутаций RBP-Jk, которые нарушали его взаимодействие с SMRT и локализацию внутри

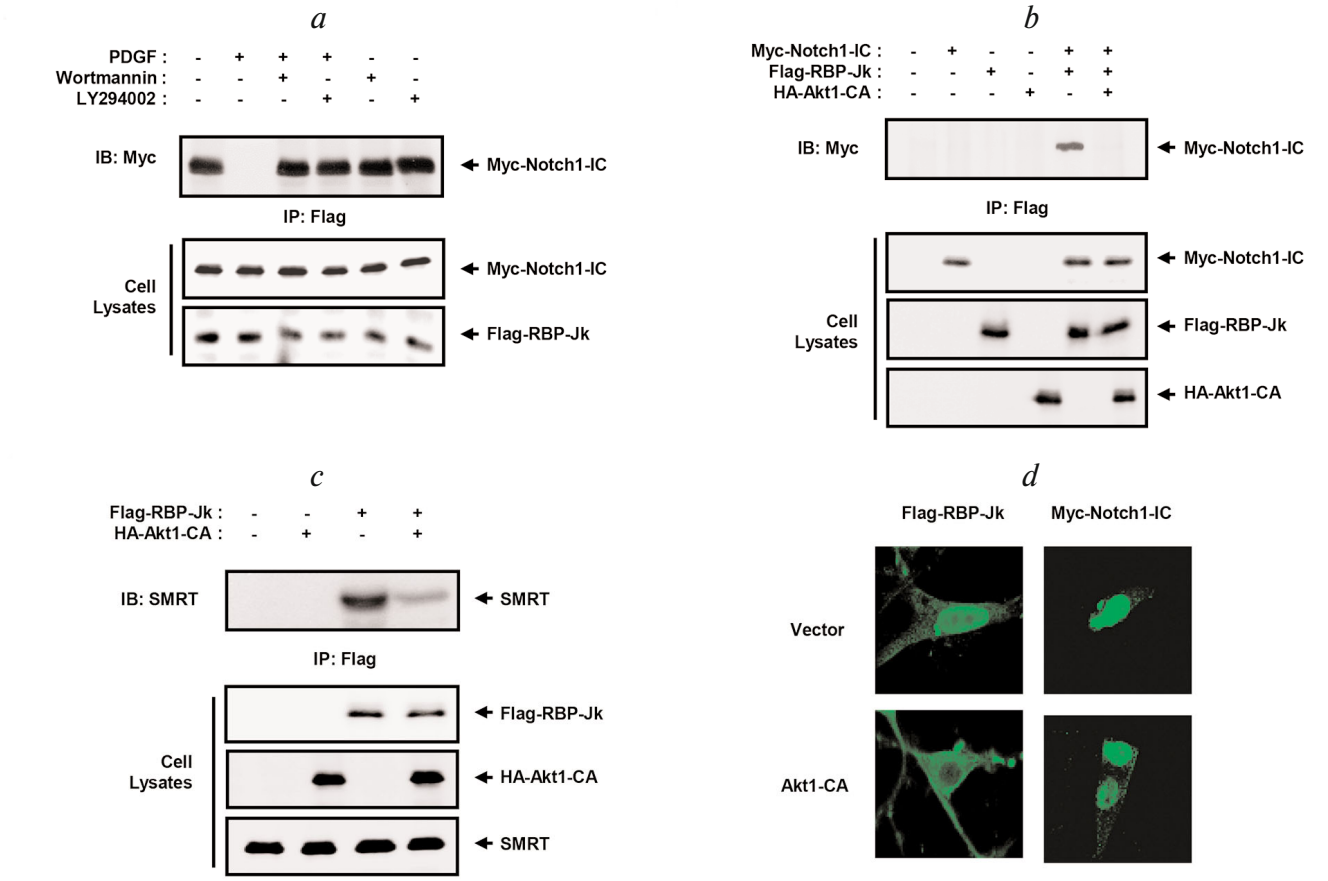

Рис. 2. Akt1 нарушает ассоциацию между RBP-Jk и Notch1-IC. *a* – Клетки NIH3T3 трансфицировали Myc-Notch1-IC и Flag-RBP-Jk, затем обрабатывали PDGF (10 нг/мл) 8 ч и вортманнином (1 мкМ) или LY294002 (10 мкМ) 30 мин; *b* – клетки NIH3T3 трансфицировали Myc-Notch1-IC, Flag-RBP-Jk и HA-Akt1-CA. Клеточные лизаты подвергали иммунопреципитации с использованием антител против Flag, и проводили иммуноблоттинг иммунопреципитатов с использованием антител против Myc (*a*, *b*); *c* – клетки NIH3T3 трансфицировали Flag-RBP-Jk и HA-Akt1-CA. Клеточные лизаты подвергали иммунопреципитации с использованием антител против Flag, и проводили иммуноблоттинг иммунопреципитатов с использованием антител против SMRT; *d* – клетки NIH3T3 трансфицировали HA-Akt1-CA и Myc-Notch1-IC или Flag-RBP-Jk как указано на рисунке. После 48 ч трансфекции клетки фиксировали, белки Notch1-IC и RBP-Jk окрашивали Alexa Fluor 488 и изучали с помощью метода конфокальной микроскопии.
С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

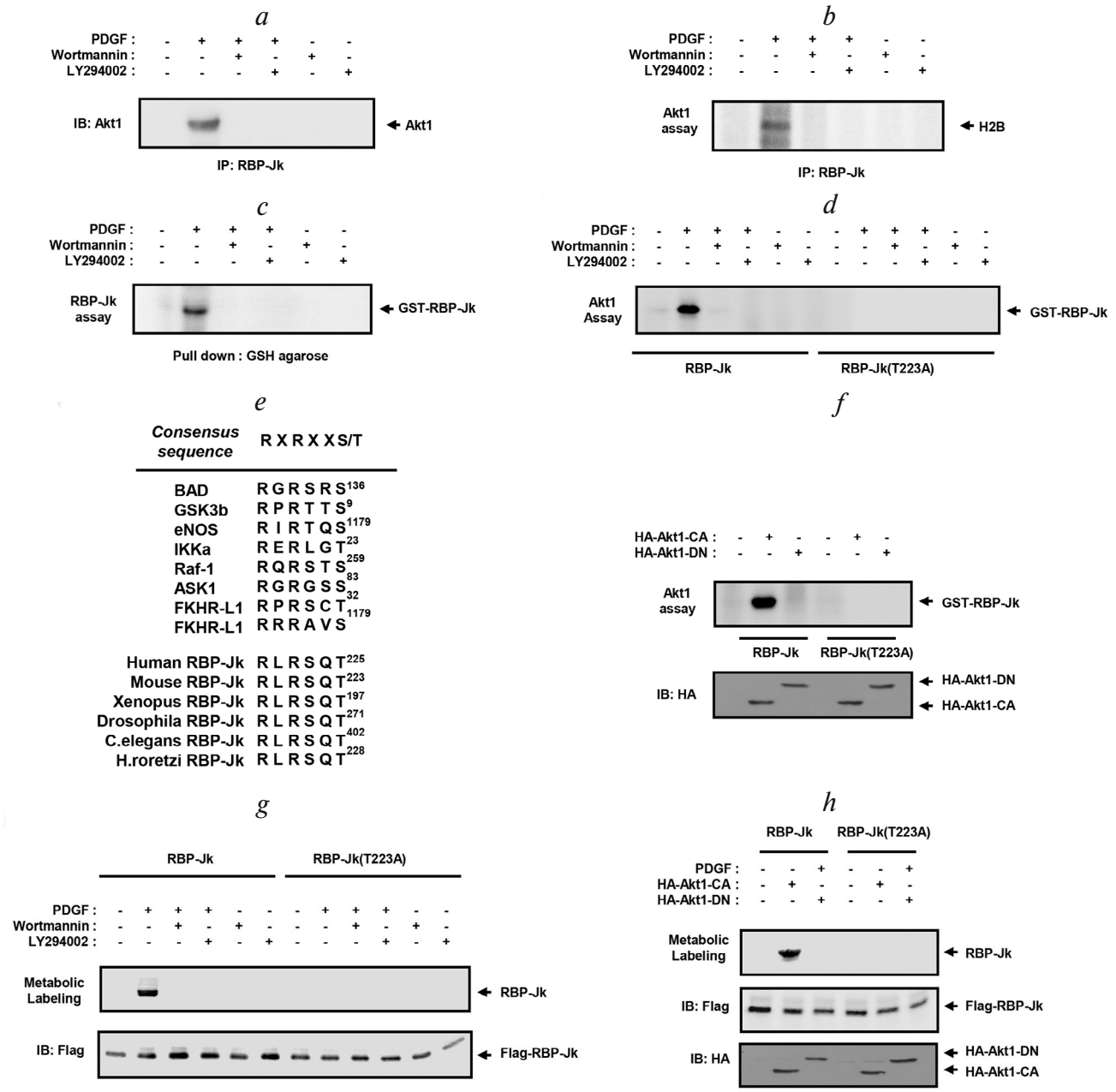

Рис. 3. Akt1 взаимодействует с RBP-Jk в интактных клетках. *a* – Клетки NIH3T3 обрабатывали PDGF (10 нг/мл) 8 ч и вортманнином (1 мкМ) или LY294002 (10 мкМ) 30 мин. Клеточные лизаты подвергали иммунопреципитации с использованием антител против RBP-Jk и осуществляли иммуноблоттинг иммунопреципитатов с помощью антител против Akt1; *b* – клетки NIH3T3 обрабатывали PDGF в течение 8 ч и вортманнином или LY294002 30 мин. Активность Akt1 определяли с помощью гистона H2B в качестве субстрата после иммунопреципитации антителами против RBP-Jk через определение киназной активности иммунного комплекса; *c* – лизаты клеток NIH3T3, обработанных PDGF, вортманнином и/или LY294002, инкубировали с GST-RBP-Jk и осаждали с использованием GSH-агарозы. Комплексы ресуспендировали и определяли активность RBP-Jk-киназы в 50 мМ Tris (pH7,5), 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT и 2 μCi [γ-^{32}P] АТФ; *d* – консенсусная последовательность субстратов Akt1 и различных форм RBP-Jk; *e* – клетки NIH3T3 обрабатывали PDGF 8 ч и вортманнином или LY294002 30 мин. Активность Akt1 измеряли с использованием GST-RBP-Jk или GST-RBP-Jk T223A после иммунопреципитации антителами против Akt1 при определении киназной активности иммунного комплекса; *f* – клетки NIH3T3 трансфицировали HA-Akt1-CA и HA-Akt1-DN. Активность Akt1 измеряли с использованием GST-mRBP-Jk или GST-mRBP-Jk T223A после их иммунопреципитации с помощью антител против Akt1при определении киназной активности иммунного комплекса; *g* – метаболическое мечение *in vivo* с использованием клеток NIH3T3, обработанных PDGF, вортманнином и/или LY294002, после их трансфекции Flag-RBP-Jk и Flag-RBP-Jk T223A и иммунопреципитации с использованием антител против Flag; *h* – метаболическое мечение *in vivo* было проведено с участием Akt1-CA и/или Akt1-DN наряду с клетками, трансфицированными Flag-RBP-Jk или Flag-RBP-Jk T223A, иммунопреципитацию осуществляли с помощью антител против Flag

ядра. С помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания было изучено влияние Akt1 на локализацию Notch1-IC и RBP-Jk. Как и ожидалось, Akt1-CA вызывал переход RBP-Jk с прикрепленным Flag из ядра в цитоплазму (как небольшие кластеры). При этом локализация Notch1-IC не изменялась (рис. 2, *d*). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что Akt1 непосредственно предотвращает образование комплекса белка RBP-Jk и Notch1-IC, что приводит к потере Notch1-опосредованной *транс*активации генов-мишеней.

Физическая ассоциация между RBP-Jk и Akt1 в клетках, обработанных PDGF. Изучена возможность образования комплекса между RBP-Jk и Akt1 в присутствии и в отсутствии PDGF. В присутствии PDGF RBP-Jk физически взаимодействовал с Akt1 в клетках (рис. 3, *a*, дорожки *1* и *2*). Однако совместная обработка ингибиторами PI3K (вортманнин и LY294002) приводила к ингибированию образования комплекса RBP-Jk-Akt1 (рис. 3, *a*, дорожки *3* и *4*). Чтобы определить играет ли Ras-PI3K-Akt1-сигнальный путь роль в регуляции Akt1-зависимого сигнального пути, был проведен анализ активности киназ в условиях *in vitro*. PDGF-стимулированная ферментативная активность Akt1 в значительной степени подавлялась в клетках, обработанных вортманнином и LY294002 (рис. 3, *b*). Те же результаты были получены с использованием RBP-Jk, обработанным GST (рис. 3, *c*). Был проведен поиск сайта фосфорилирования в RBP-Jk путем идентификации консервативных консенсусных сайтов фосфорилирования Akt1 (RxRxxS/T) в RBP-Jk. Анализ последовательностей выявил, что RBP-Jk содержит консенсусный мотив фосфорилирования Akt1 в виде остатка треонина T223, который является консервативным остатком в ортологах RBP-Jk (рис. 3, *d*). Чтобы подтвердить тот факт, что Akt1 может прямо фосфорилировать RBP-Jk по остатку треонина T223, проверили действие киназы на очищенном белке GST-RBP-Jk, содержащем сайт дикого типа, или на рекомбинантном белке RBP-Jk, в котором аминокислотный остаток T223 был заменен на остаток аланина. Akt1 был иммунопреципитирован из экстрактов необработанных клеток или клеток, обработанных PDGF и/или ингибиторами PI3K. Только GST-RBP-Jk, который содержал сайт фосфорилирования Akt1, был фосфорилирован в результате стимуляции с помощью PDGF (рис. 3, *e*, дорожки *1* и *2*). Следует отметить, что Akt1, выделенный из экстрактов нестимулированных PDGF клеток или из стимулированных PDGF, но и обработанных ингибитором PI3K клеток, не был способен фосфорилировать GST-RBP-Jk (рис. 3, *e*, дорожки *3–6*). GST-RBP-Jk T223A не фосфорилировался иммунным комплексом Akt1 ни при каких условиях (рис. 3, *e*, дорожки *7–12*). Наконец, иммунопреципитаты Akt1 из клеток, трансфицированных Akt1-CA, но не из клеток, трансфицированных Akt1-DN, может фосфорилировать рекомбинантный RBP-Jk *in vitro* (рис. 3, *f*). Akt1 повышал уровень фосфорилирования RBP-Jk из клеток мыши и *Drosophila* (данные не показаны). Однако в наших экспериментах фосфорилирование Notch1 с помощью Akt1 обнаружено не было (данные не показаны).

Akt1 является наилучшим кандидатом для участия в PDGF-опосредованном фосфорилировании белка RBP-Jk по а.о. треонина T223. Чтобы проверить возможность такого фосфорилирования в интактных клетках, клетки NIH 3T3 были обработаны PDGF и/или ингибиторами PI3K. В присутствии PDGF уровень метаболического мечения RBP-Jk повышался, хотя при этом не было обнаружено фосфорилирование белка RBP-Jk T223A (рис. 3, *g*). Совместная трансфекция клеток Akt1-CA вместе с RBP-Jk и мутантным белком RBP-Jk T223A показала, что Akt1 нуждается в а.о. треонина T223 *in vivo* (рис. 3, *h*), как это наблюдается *in vitro*. Чтобы подтвердить предположение, что Akt1 опосредует ответ на действие PDGF в интактных клетках, клетки NIH 3T3 были трансфицированы Akt1-DN и затем добавляли PDGF. В этих условиях метаболическое мечение RBP-Jk не наблюдалось. Таким образом, в этих экспериментах было показано, что Akt1 необходим и достаточен для того, чтобы опосредовать PDGF-индуцированное фосфорилирование RBP-Jk.

Неподдающийся фосфорилированию мутантный белок RBP-Jk T223A не ингибируется активированным Akt1. Необходимость проведения анализа фосфорилирования RBP-Jk была вызвана наблюдениями, которые свидетельствовали о способности PDGF блокировать транскрипционную активность генов-мишеней Notch1-IC. Была проанализирована транскрипционная активность Notch1 в присутствии RBP-Jk T223A. Показано, что Notch1-IC в отдельности активировал репортерный ген, а совместная экспрессия с RBP-Jk только незначительно повышала активность люциферазы. В присутствии Akt1-CA активность Notch1-IC/RBP-Jk в значительной степени подавлялась (рис. 4, *a*). Однако в тех условиях, когда Notch1-IC был совместно экспрессирован с RBP-Jk T223A, Akt1-CA не был способен подавлять его активность (рис. 4, *a*), что позволяет предположить, что остаток треонина T223 в белке RBP-Jk играет ключевую роль в Akt1-опосредованном подавлении Notch1-зависимого сигнального пути. Получен-

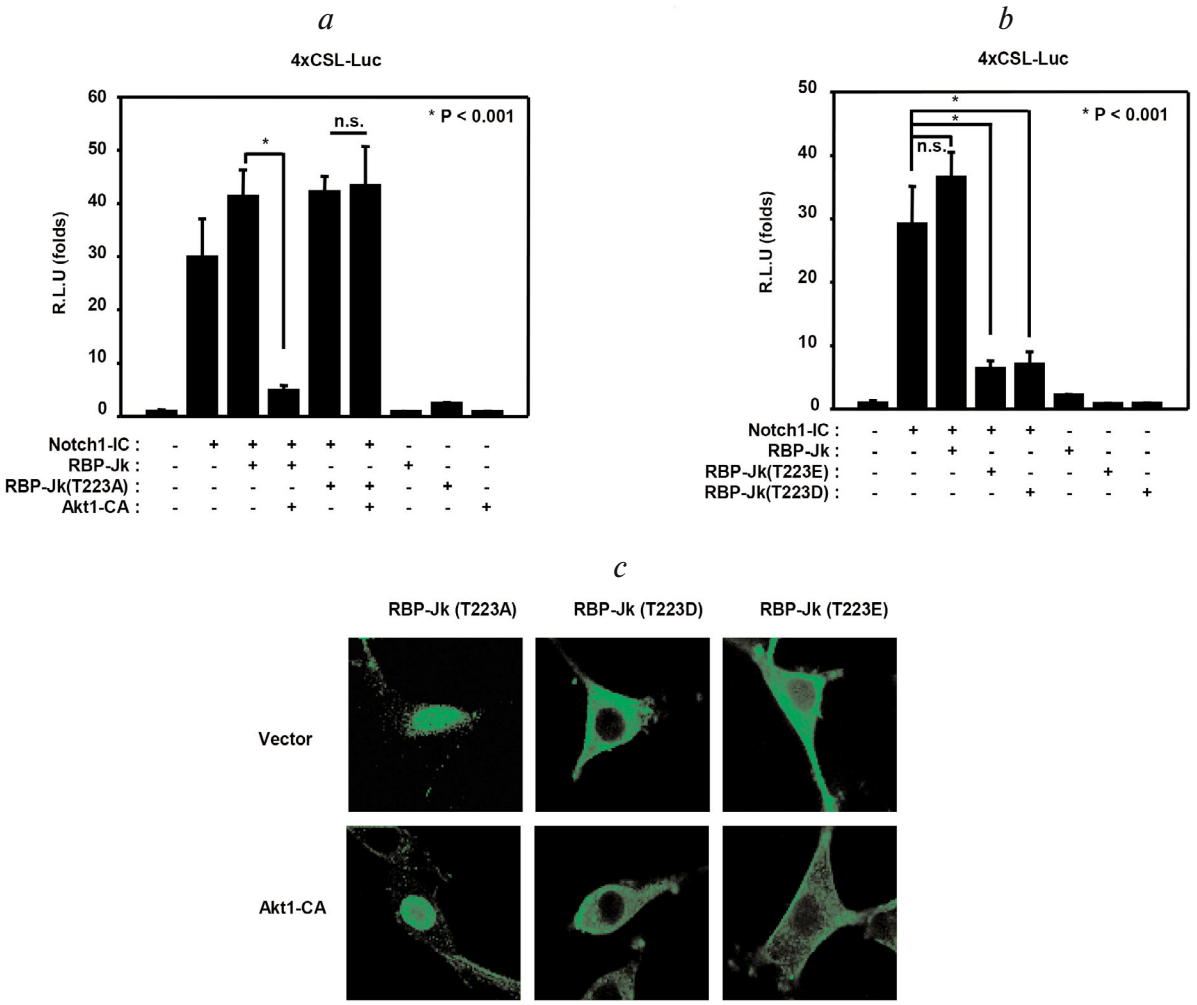

Рис. 4. Мутантный неподдающийся фосфорилированию белок (RBP-Jk T223A) устойчив к действию Akt1. *a*– Клетки NIH3T3 были кратковременно трансфицированы Notch1-IC, RBP-Jk, RBP-Jk T223A, Akt1-CA, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой; *b* – клетки NIH3T3 были кратковременно трансфицированы Notch1-IC, RBP-Jk, T223E, T223D, 4×CSL-Luc и β-галактозидазой. Клетки лизировали и определяли в лизатах их люциферазную активность (*a*, *b*); *c* – клетки NIH3T3 трансфицировали HA-Akt1-CA и Flag-RBP-Jk T223A, T223D или мутантной формой T223E как указано на рисунке. После 48 ч трансфекции клетки фиксировали белок RBP-Jk окрашивали Alexa Fluor 488 и изучали с помощью конфокального микроскопа. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

ные результаты свидетельствуют в пользу того, что нефосфорилируемая форма RBP-Jk устойчива к действию Akt1.

Чтобы далее изучать роль а.о. треонина pT223, были получены мутантные по сайту фосфорилирования формы белка, T223D и T223E, сходные с фосфорилируемым белком RBP-Jk. Чтобы определить роль мутантных белков RBP-Jk T223D и RBP-Jk T223E в регуляции транскрипционной активности генов-мишеней Notch1-IC, была использована люциферазная репортерная система. При повышенной экспрессии мутантных белков RBP-Jk T223D или RBP-Jk T223E активность Notch1-IC-индуцированной активности 4 × CSL люциферазной репортерной системы была подавлена (рис. 4, *b*). Кроме того, мутантные белки RBP-Jk T223D и RBP-Jk T223E были локализованы в цитоплазме. Как ожидалось, все мутантные по остатку T223 белки RBP-Jk были устойчивы к действию активированного Akt1. Мутантный белок RBP-Jk T233A всегда был локализован в ядре, а мутантные белки с аминокислотными заменами T223D и T223E были выявлены исключительно в цитоплазме (рис. 4, *c*). Удивительно, но локализованные в цитоплазме белки RBP-Jk с аминокислотными заменами T223D и T223E были способны доминантно репрессировать эндогенную экспрессию RBP-Jk внутри ядра (рис. 4, *c*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Notch1- и RTK-Ras-зависимые сигнальные пути во время развития клеток действуют синергично или антагонистично. Согласно последним исследованиям, Notch1 подавляет RTK-Ras-зависимый сигнальный путь во время развития вульвы *C. elegance* через индукцию фосфатазы Lip-1 [33]. Во время принятия второго решения по судьбе клеток Notch1 является основным сигналом, однако при принятии первого решения основным сигналом в определении судьбы клеток *C. elegance* является Ras. В то же время не определена точная связь между этими двумя путями не только в процессе развития, но и у взрослых организмов. Чтобы ответить на эти вопросы, было изучено влияние PDGF на Notch1-зависисмый сигнальный путь с использованием систем репортерной люциферазы. PDGF эффективно ингибировал Notch1-IC-зависимую транскрипционную активность. В то же время PDGF не ингибировал Notch1-IC-опосредованную транскрипционную активность в том случае, когда Notch1-IC совместно экспрессировался с доминантно негативной мутантной формой Ras (RasN17) и при обработке ингибиторами PI3K (LY294002 и вортманнин) (рис. 1, *a*, *b*). Также было показано, что PDGF ингибирует Notch1-IC-зависимую транскрипционную активность, но он не ингибирует эту транскрипционную активность Notch1-IC в том случае, когда Notch1-IC был совместно экспрессирован с доминантно негативной мутантной формой Akt1 (рис. 1, *c*). Наши данные говорят о том, что транскрипционная активность Notch1 может быть подавлена PDGF через Ras-PI3K-Akt-зависимый сигнальный путь.

В связи с тем, что Akt модулирует белки-мишени путем их фосфорилирования, нами была изучена возможность прямого фосфорилирования этим белком компонентов Notch-зависимого сигнального пути. В предыдущих работах был идентифицирован консенсусный мотив (RxRxx(S/T)), который фосфорилируется Akt [34]. Изоформа Akt1 более широко распространена, чем другие изоформы белка Akt. В RBP-Jk выявлен консервативный консенсусный мотив, который фосфорилируется Akt в клетках человека, мыши, лягушки, дрозофилы и *C. elegans*. Анализ аминокислотной последовательности RBP-Jk показал, что в этом белке есть один сайт, который соответствует мотиву фосфорилирования белком Akt: T223 (RLRSQT). Интересно, что участок, который в RBP-Jk окружает консенсусный для Akt1 сайт (RLRSQT), играет важную роль во взаимодействии с Notch1–RAM и в связывании ДНК, а также во взаимодействии с SMRT. Akt1-консенсусный сайт белка RBP-Jk локализуется вблизи мест, подверженных мутациям, которые нарушают связывание SMRT (EEF233AAA), и первый а.о. аргинина в этом сайте играет важную роль связывании ДНК с RBP-JK (аминокислотная замена R218H, которая снижает способность белка связываться с ДНК) [35–38].

Чтобы подтвердить прямое фосфорилирование белка RBP-Jk по остатку треонина T223 белком Akt1, определена киназная активность очищенного белка GST-RBP-Jk, содержащего сайт дикого типа, или рекомбинантного белка RBP-Jk, в котором остаток T223 был заменен на остаток аланина (рис. 3). Только белок GST-RBP-Jk, содержащий интактный сайт фосфорилирования для Akt1, подвергался фосфорилированию после стимуляции с помощью PDGF. Обработка клеток PDGF или повышение экспрессии Akt1 приводили к фосфорилированию белка RBP-Jk по остатку треонина T223. Обработка PDGF индуцировала фосфорилирование RBP-Jk WT, но в клетках с DN-формой Akt1 наблюдалось значительное ингибирование PDGF-индуцированного фосфорилирования (рис. 3, *h*). Эти данные подтвердили, что PDGF-индуцированная активация Akt1 ингибирует Notch-зависимый сигнальный путь в результате фосфорилирования остатка T223 в белке RBP-Jk.

Также в настоящей работе было показано, что Akt1 подавляет локализацию RBP-Jk в ядре. Недавно в работах было показано, что изменение внутриклеточной локализации RBP-Jk под действием Akt1 происходит в результате фосфорилирования [39]. Особо следует отметить, что (как нами было обнаружено) фосфорилирование RBP-Jk происходит как в интактных клетках, так и дефицитных по фосфорилированию мутантах, устойчивых к действию Akt1. Также подтверждено снижение уровня комплексов Notch1-IC-RBP-Jk и активности Notch1 и устойчивость мутантов с дефицитом фосфорилирования. Это первая работа, в которой говорится о зависимой от фосфорилирования регуляции активности RBP-Jk и существовании перекрестных связей с RTK-Ras- зависимым сигнальным путем.

Неканоническая функция Akt в основных клеточных процессах, таких как пролиферация, инвазия, апоптоз, уже была описана в нескольких работах [40–43]. Результаты нашей работы могут объяснить другую неканоническую функцию Akt1, так как было показано, что он участвует в механизме контроля активности Notch-зависимого сигнального пути.

Таким образом, нами было показано, что RTK-Ras-Akt1-зависимый сигнальный путь не-

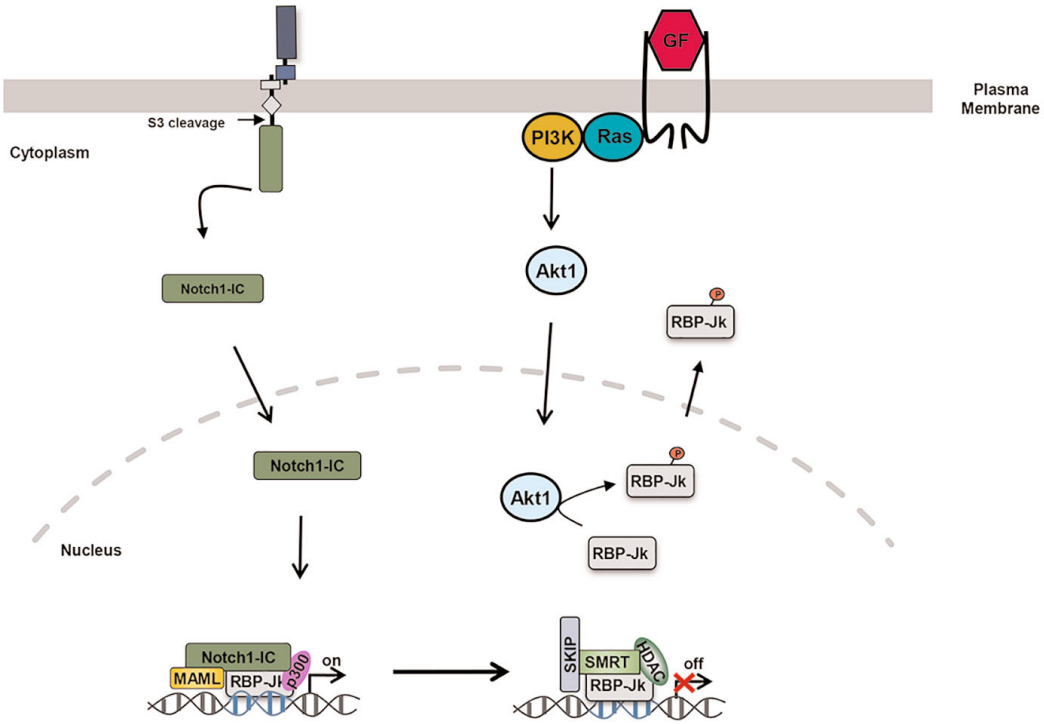

Рис. 5. Подавление активности Notch1 во время дифференцировки мышечных клеток. Графическая модель Notch1-зависимого сигнального пути в клетках. Akt1 подавляет Notch1-зависимый сигнальный путь, фосфорилируя остаток треонина T223 белка RBP-Jk, который, в свою очередь, диссоциирует в ядре комплекс Notch1-IC–RBP-Jk.
С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

гативно регулирует Notch1-зависимый сигнальный путь. В частности, Akt1 фосфорилирует остаток треонина T223 в белке RBP-Jk и, тем самым, подавляет транскрипционную активность Notch1 путем ингибирования внутриядерной локализации RBP-Jk (рис. 5).

Финансирование. Выполнение работы проходило при финансовой поддержке Программы базовых научных исследований (Basic Science Research Program) Государственного фонда поддержки науки Республики Корея (National Research Foundation of Korea (NRF), финансируемого Министерством науки, ICT и планирования будущего (грант NRF-2014R1A4A1003642).

Благодарности. Авторы выражают благодарность R. Kopan (медицинский факультет Вашингтонского университета, Washington university school of medicine) за приготовление конструкций Notch1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная работа не содержит исследований, использующих в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science*, **284**, 770–776.
2. Schweisguth, F. (2004) Regulation of notch signaling activity, *Curr. Biol.*, **CB 14**, 129–138.
3. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995) Notch signaling, *Science*, **268**, 225–232.
4. Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999) Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation, *EMBO J.*, **18**, 2196–2207.
5. Bray, S.J. (2016) Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 722–735.
6. Kopan, R., and Ilagan, M.X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell*, **137**, 216–233.
7. Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knochel, W., and Borggrefe, T. (2005) RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10379–10390.
8. Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003) Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise, *Cancer Cell*, **4**, 257–262.
9. Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochem. J.*, **346**, 561–576.

10. Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., and Tsichlis, P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation, *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 965–1014.
11. Toker, A., and Newton, A.C. (2000) Cellular signaling: pivoting around PDK-1, *Cell*, **103**, 185–188.
12. Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty, *J. Leukocyte Biol.*, **73**, 689–701.
13. Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., and Donner, D.B. (1999) NF-kappa B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase, *Nature*, **401**, 82–85.
14. Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization, *Genes Dev.*, **12**, 3499–3511.
15. Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B), *Science*, **286**, 1741–1744.
16. Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt, *Science*, **286**, 1738–1741.
17. Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream, *Cell*, **129**, 1261–1274.
18. Lawlor, M.A., and Alessi, D.R. (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.*, **114**, 2903–2910.
19. Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L., Bhagat, G., Agarwal, A.M., Basso, G., Castillo, M., Nagase, S., Cordon-Cardo, C., Parsons, R., Zuniga-Pflucker, J.C., Dominguez, M., and Ferrando, A.A. (2007) Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia, *Nature Med.*, **13**, 1203–1210.
20. Wang, H., Cheng, H., Shao, Q., Dong, Z., Xie, Q., Zhao, L., Wang, Q., Kong, B., and Qu, X. (2014) Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling, *Biol. Reprod.*, **90**, 78.
21. Bansal, K., and Balaji, K.N. (2011) Intracellular pathogen sensor NOD2 programs macrophages to trigger Notch1 activation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 5823–5835.
22. Maliekal, T.T., Bajaj, J., Giri, V., Subramanyam, D., and Krishna, S. (2008) The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors, *Oncogene*, **27**, 5110–5114.
23. Hurlbut, G.D., Kankel, M.W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2009) Nodal points and complexity of Notch-Ras signal integration, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **106**, 2218–2223.
24. Hurlbut, G.D., Kankel, M.W., Lake, R.J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2007) Crossing paths with Notch in the hyper-network, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **19**, 166–175.
25. Sundaram, M.V. (2005) The love-hate relationship between Ras and Notch, *Genes Dev.*, **19**, 1825–1839.
26. Doroquez, D.B., and Rebay, I. (2006) Signal integration during development: mechanisms of EGFR and Notch pathway function and cross-talk, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 339–385.
27. Kim, M.Y., Ann, E.J., Mo, J.S., Dajas-Bailador, F., Seo, M.S., Hong, J.A., Jung, J., Choi, Y.H., Yoon, J.H., Kim, S.M., Choi, E.J., Hoe, H.S., Whitmarsh, A.J., and Park, H.S. (2010) JIP1 binding to RBP-Jk mediates cross-talk between the Notch1 and JIP1-JNK signaling pathway, *Cell Death Differ.*, **17**, 1728–1738.
28. Yoon, J.H., Mo, J.S., Ann, E.J., Ahn, J.S., Jo, E.H., Lee, H.J., Hong, S.H., Kim, M.Y., Kim, E.G., Lee, K., and Park, H.S. (2016) Notch1 intracellular domain negatively regulates PAK1 signaling pathway through direct interaction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 179–188.
29. Fan, H., Ma, L., Fan, B., Wu, J., Yang, Z., and Wang, L. (2014) Role of PDGFR-beta/PI3K/AKT signaling pathway in PDGF-BB induced myocardial fibrosis in rats, *Am. J. Transl. Res.*, **6**, 714–723.
30. Kim, E.K., Tucker, D.F., Yun, S.J., Do, K.H., Kim, M.S., Kim, J.H., Kim, C.D., Birnbaum, M.J., and Bae, S.S. (2008) Linker region of Akt1/protein kinase Balpha mediates platelet-derived growth factor-induced translocation and cell migration, *Cell. Signal.*, **20**, 2030–2037.
31. Nurminskaya, M., Beazley, K.E., Smith, E.P., and Belkin, A.M. (2014) Transglutaminase 2 promotes PDGF-mediated activation of PDGFR/Akt1 and beta-catenin signaling in vascular smooth muscle cells and supports neointima formation, *J. Vasc. Res.*, **51**, 418–428.
32. Miele, L. (2011) Transcription factor RBPJ/CSL: a genome-wide look at transcriptional regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14715–14716.
33. Berset, T., Hoier, E.F., Battu, G., Canevascini, S., and Hajnal, A. (2001) Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during *C. elegans* vulval development, *Science*, **291**, 1055–1058.
34. Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70-S6 kinase, *FEBS Lett.*, **399**, 333–338.
35. Ann, E.J., Kim, H.Y., Choi, Y.H., Kim, M.Y., Mo, J.S., Jung, J., Yoon, J.H., Kim, S.M., Moon, J.S., Seo, M.S., Hong, J.A., Jang, W.G., Shore, P., Komori, T., Koh, J.T., and Park, H.S. (2011) Inhibition of Notch1 signaling by Runx2 during osteoblast differentiation, *J. Bone Miner. Res.*, **26**, 317–330.
36. Tani, S., Kurooka, H., Aoki, T., Hashimoto, N., and Honjo, T. (2001) The *N*- and *C*-terminal regions of RBP-J interact with the ankyrin repeats of Notch1 RAMIC to activate transcription, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1373–1380.
37. Privalsky, M.L. (2001) Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **254**, 117–136.
38. Brou, C., Logeat, F., Lecourtois, M., Vandekerckhove, J., Kourilsky, P., Schweisguth, F., and Israel, A. (1994) Inhibition of the DNA-binding activity of *Drosophila* suppressor of hairless and of its human homolog, KBF2/RBP-J kappa, by direct protein-protein interaction with *Drosophila* hairless, *Genes Dev.*, **8**, 2491–2503.
39. Gao, D., Inuzuka, H., Tseng, A., Chin, R.Y., Toker, A., and Wei, W. (2009) Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCCdh1-mediated Skp2 destruction, *Nature Cell Biol.*, **11**, 397–408.
40. Safdari, Y., Khalili, M., Ebrahimzadeh, M.A., Yazdani, Y., and Farajnia, S. (2015) Natural inhibitors of PI3K/AKT signaling in breast cancer: emphasis on newly-discovered molecular mechanisms of action, *Pharmacol. Res.*, **93**, 1–10.
41. Toker, A., and Yoeli-Lerner, M. (2006) Akt signaling and cancer: surviving but not moving on, *Cancer Res.*, **66**, 3963–3966.
42. Riggio, M., Perrone, M.C., Polo, M.L., Rodriguez, M.J., May, M., Abba, M., Lanari, C., and Novaro, V. (2017) AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins, *Sci. Rep.*, **7**, 44244.
43. Kozlova, N.I., Morozevich, G.E., Ushakova, N.A., and Berman, A.E. (2018) Implication of integrin alpha2beta1 in proliferation and invasion of human breast carcinoma and melanoma cells: noncanonical function of Akt protein kinase, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 738–745.

Akt1-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF RBP-Jk CONTROLS Notch1 SIGNALING

M.-Y. Kim*, J. Y. Park, and H.-S. Park*

School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea; E-mail: mykim31002@gmail.com, proteome@jnu.ac.kr

Received May 31, 2019
Revised July 17, 2019
Accepted July 17, 2019

Notch1 signaling pathway plays a crucial role in determination of cell fate, including cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated that the antagonistic action of RTK signaling pathway on Notch1 signaling pathway was mediated via Ras-PI3K-Akt1. The PI3K-Akt1 signaling pathway was shown to inhibit the Notch1 signaling pathway via phosphorylation of RBP-Jk protein. Reduced association between Notch1 and RBP-Jk and suppressed Notch1 transcriptional activity were observed as well. Our results demonstrate that Akt1 functions as a natural inhibitor of the Notch1 signaling pathway via phosphorylation of RBP-Jk.

Keywords: Notch1 signaling pathway, Akt1, phosphorylation