

Теоретические и экспериментальные исследования

P. С. АЙМБЕТОВ¹, А. К. БИСЕНБАЕВ¹, Д. Д. САРБАСОВ²

МУТАЦИЯ G934E РИКТОРА ОТРИЦАТЕЛЬНО ВЛИЯЕТ НА КИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ mTORC2 И СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТКИ

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби

²The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

mTOR (mammalian target of rapamycin) – важная киназа, находящаяся на пересечении сигнальных путей ростовых факторов и питательных веществ и существующая в составе двух мультипротеиновых комплексов – *mTORC1* и *mTORC2* (*mTOR complex ½*). Мутация G934E в составе одного из компонентов *mTORC2* – риктор, блокирует сборку данного комплекса, что выражается в нарушении его киназных свойств и снижении скорости клеточной пролиферации.

Введение. Процессы роста и пролиферации клетки регулируются сложными механизмами сигнальных путей ростовых факторов, питательных веществ, апоптических каскадов и др.

В настоящее время фосфатидилинозитол 3 киназа (PI3K) рассматривается как один из важнейших регуляторных белков, находящихся на пересечении разных сигнальных путей и контролирующих ключевые функции клетки. Активация PI3K может происходить разными путями: через взаимодействие с рецепторами ростовых факторов (EGF, IGF), G-белками, нерецепторными тирозинкиназами и др. Одним из основных эффекторов PI3K является протеинкиназа B (PKB, или Akt) [1].

Akt является важной киназой, участвующей в процессах регуляции клеточной пролиферации и выживаемости. Главными субстратами этой киназы выступают транскрипционные факторы, убиквитин лигаза фактора транскрипции p53, киназа гликоген синтазы и др. [2] Установлено, что для полной активации Akt требуется фосфорилирование по Thr-308 и Ser-473 киназой PDK1 и mTOR комплексом 2 (mTORC2) соответственно [3].

mTOR – это протеин киназа, функционирующая в качестве центрального звена важного консервированного сигнального пути. В клетках mTOR обнаруживается в виде двух функционально различных комплексов - mTORC1 и mTORC2 [4, 5]. mTOR комплекс 1 (mTORC1), состоящий из mTOR, раптора, mLST8, PRAS40, DEPTOR, передает сигналы, полученные от ростовых факторов и питательных веществ, на S6K и 4EBP1, модулируя, таким образом, белоксинтезирующий аппарат.

Второй комплекс, рапамицин-нечувствительный mTORC2, помимо mTOR, mLST8 и DEPTOR включающий белки Sin1, риктор и Protor, является, как указано выше, киназой фосфорилирующей Akt по Ser-473. Комплекс mTORC2 предпочтительно фосфорилирует протеин киназы семейства AGC по сайтам гидрофобных мотивов, расположенных на C-конце [6]. Указанные особенности свойственны всем субстратам mTORC2, таким как Akt и PKC, а также SGK.

Риктор человека – это белок с молекулярной массой 200 кДа и состоит из 1708 аминокислотных остатков. В настоящее время ни один функциональный домен не обнаружен в его первичной структуре, несмотря на выявленные эволюционно консервативные участки. Известно, что комплекс mTORC2 образуется путем независимого объединения гетеродимеров риктор/Sin1 и mTOR/mLST8. Формирование тетрамера риктор/Sin1/mTOR/ mLST8 является необходимым минимальным «ядром», определяющим киназные свойства mTORC2 [3]. Риктор совместно с Sin1 обеспечивает субстратную специфичность киназного компонента комплекса в отношении Akt и PKC. А для осуществления регуляции киназы SGK1 в составе mTORC2 должен присутствовать

Protor, связывающийся с риктором. Таким образом, риктор является ключевым белком, обеспечивающим функциональную специфичность mTORC2.

В ходе генетических скринингов, проведенных Jones et al. и Soukas et al., были обнаружены мутанты риктора, проявляющие фенотип повышенного содержания липидов в организме, меньшего по сравнению с диким типом размера тела и укороченной продолжительностью жизни [7, 8]. Из четырех описанных мутантов три обладали точечными нонсенс-мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции мРНК риктора с образованием нефункционального полипептида. В одном же случае фенотип, полностью копирующий утрату риктора, появлялся в результате замены высококонсервированного остатка глицина в положении 1120 (Gly-1120) на глутаминовую кислоту. Попытка ответа на вопрос, как замена одной-единственной аминокислоты может обладать настолько выраженным фенотипом, является интересной научной проблемой, позволяющей определить важные свойства риктора, обуславливающие структурную целостность и функциональную компетентность mTORC2.

В предыдущих работах мы показали, что мутация G1120E риктора (у человека приходящаяся на 934-й остаток) приводит к нарушению его димеризации с белком Sin1 [9]. В настоящей статье мы публикуем результаты исследования эффекта указанной мутации на функциональную активность комплекса mTORC2, а также на скорость пролиферации клеток.

Материалы и методы

Сайт-направленный мутагенез риктора. Все нуклеотидные замены проводились на фрагменте 400-1400 риктора посредством ПЦР с использованием соответствующих праймеров (для G934E: CTCTTGCGGCCTGGAAATATCGAGTC-ATCAAATTGGGTCTCAATT (forward), AAATTGAGACCCCAATTGATGACTCG-ATATTTCCAAGGCCAAAGAG (reverse); для G934L: CTCTTGCGGCCTGGAA-ATATCCTATCATCAAATTGGGTCTCAATT (forward), AAATTGAGACCCCAATT-TGATGATAGGATATTCCAAGGCCAAAGAG (reverse)).

Реакцию проводили с полимеразой PfuUltra II Fusion HS (Stratagene) в амплификаторе C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad).

По завершении амплификации наличие продуктов ПЦР требуемой длины проверялось методом агарозного гель-электрофореза. Наличие и отсутствие мутаций подтверждало секвенированием всей вставки. Все мутированные фрагменты субклонировали в полноразмерный риктор по сайтам рестрикции *PacI/AgeI*.

Культура клеток млекопитающих. Клетки MEF и HEK293T культивировали в среде DMEM с 10% ФБС, пенициллин/стрептомицином и 20 мМ L-глутамином в 37°C с 5% содержанием CO₂ в атмосфере. Плотность клеток позволяла свободное деление на протяжении всего эксперимента. При достижении конфлюэнтного слоя до 70-80% проводилось разделение культур клеток. Старую питательную среду удаляли, клетки промывали PBS. Для отделения клеток от чашек добавляли необходимый объем 0,25% Trypsin/EDTA и помещали клетки в инкубатор (условия инкубации см. выше) на 5 мин. После этого в чашки с отделенными клетками добавляли свежую питательную среду, клетки тщательно ресуспенсировали и в зависимости от плотности суспензии больший или меньший ее объем переносили в новые чашки.

Для стимуляции MEF ростовыми факторами к старвированным клеткам (инкубированным без ФБС в питательной среде в течение 16 ч) добавляли IGF1 до конечной концентрации 50 нг/мл и инкубировали в течение 20 мин.

Трансфекция клеток HEK293T фосфатом кальция и сборка mTORC2. Для трансфекции 1·10⁶ клеток HEK293T высаживали на 6 см чашки в 3 мл среды DMEM с 10% ФБС за день до трансфекции. Трансфекцию клеток осуществляли методом кальциево-фосфатной преципитации: смешивали 1 мкг pRK5-мус-риктор и 400 нг pRK5-Sin1-V5 в dH₂O до конечного объема 175 мкл; к этому объему добавляли 200 мкл 2xHBSS (280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,5 мМ Na₂HPO₄, 12 мМ декстрозы, 50 мМ HEPES, pH 7,1) и тщательно перемешивали. К полученной смеси медленно, по каплям добавляли 25 мкл 2M CaCl₂, перемешивая содержимое пробирки носиком после каждой капли. Далее инкубировали смесь 30 мин при комнатной температуре для формирования преципитатов фосфата кальция и ДНК. После добавления полученного раствора ДНК и солей к

HEK293T полученные преципитаты осаждались на монослой и поглощались клетками путем эндоцитоза. Питательную смесь меняли на следующий день. Лизис клеток проводили через 48 часов после трансфекции.

$1 \cdot 10^6$ клеток HEK293T высаживали на 6 см чашки за день до трансфекции. Клетки, конфлюентные на 50-60%, трансфенировали 1 мкг pRK5-myc-rictor, 400 нг pRK5-Sin1.1-V5, 500 нг pRK5-HA-mTOR и 100 нг pRK-HA-mLST8 методом кальциево-фосфатной преципитации. Через 24 ч меняли среду на свежую. Лизис клеток и иммунопреципитацию комплексов осуществляли на второй день.

Лизис клеток и иммунопреципитация. Все чашки помещали на лед, удаляли среду, промывали клетки холодным PBS и добавляли холодный буфер для лизиса (40 mM HEPES (pH 7.5), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Na-пироfosфата, 10 mM Na-глицерофосфата, 50 mM NaF, 0.3% CHAPS), содержащий набор ингибиторов протеаз (Roche). Объем буфера зависел от плотности клеточного слоя и диаметра чашки.

Клетки соскабливали с поверхности чашки продольными движениями пластмассового шпателя, ресуспендирировали клетки пипетированием и переносили суспензию в пробирки. Для повышения эффективности лизиса собранный лизат инкубировали 20 мин при 4°C на ротаторе. Растворимые фракции клеточных лизатов изолировали центрифугированием при $16,000 \cdot g$ в течение 15 мин при 4°C.

Для иммунопреципитации в очищенные лизаты, содержащие 1 мг тотального белка, вносили 4 мкг анти-myc антител с последующей инкубацией с ротацией в течение 90 мин при 4°C. Иммуноосаждение осуществляли 45 мкл 25% протеин G-агарозы (Pierce) (50% смолу смешивали с охлажденным PBS из расчета 1:1) в течение 1 ч при 4°C. По завершении инкубации осаждали смолу центрифугированием и удаляли супернатант. Смолу промывали четыре раза лизисным буфером. Остаточный объем буфера удаляли вакуумным отсосом через 25G иглу. К смоле добавляли 20 мкл 2X буфера Лэммли для образцов и кипятили 5 мин при 95°C. Полученные образцы белков разделялись SDS-PAGE, переносились на PVDF мембранны и анализировались методом Вестерн blottinga.

В случае *in vitro* киназной реакции четвертую промывку проводили с 1X киназным буфером.

In vitro киназная реакция. Для киназной реакции 15 мкл киназного буфера, содержащего 500 нг неактивного Akt1-GST и 500 μM ATP, наносили на осажденную протеин G-агарозу (Pierce) со связанными комплексами mTORC2. Реакцию проводили на 37°C водяной бане в течение 20 мин, осторожно смешивая содержимое пробирок каждые 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 235 мкл ледяного буфера 20 mM MOPS, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.3% CHAPS, 5% глицерола, 0.1% 2-меркаптоэтанола, 1 мг/мл БСА. Осаждали смолу легким центрифугированием. Супернатант использовали для иммунологического анализа фосфо-Ser-473 Akt и тотального содержания Akt. Уровни риктора Sin1 и mTOR определяли иммуноблоттингом связанных с протеин G-агарозой белков.

Продукция лентивирусов и инфекция. $1 \cdot 10^6$ клеток HEK293T высаживали на 6 см чашки в 3 мл среды DMEM с 10% ФБС. На следующий день на 50-60% конфлюентные клетки трансфенировали 3 мкг вектора pRV3 (с геном для упаковки в вирусную частицу), 1.5 мкг вектора pNer (gag-pol), 1.5 мкг вектора pEnv (env) методом кальциево-фосфатной преципитации. Среду, содержащую лентивирусы, собирали спустя 48 часов после трансфекции и центрифугировали при $3,000 \cdot g$ в течение 15 мин при 4°C для удаления остаточных HEK293T.

За день до инфекции $1 \cdot 10^5$ клеток MEF высаживали в шестилуночные плашки. Виральные супернатанты добавляли в отношении 1:1 к культурной среде в присутствии полибрена (8 мгк/мл). Для увеличения эффективности инфекции клетки центрифугировали при $350 \cdot g$ 45 мин. Клетки инкубировали с лентивирусами 24 ч. На следующий день проводили вторую инфекцию по указанному протоколу. Спустя 24 часа инфицированные клетки пересаживали в 6 см чашки и подвергали селекции 2 мкг/мл пуромицином.

Результаты и обсуждение

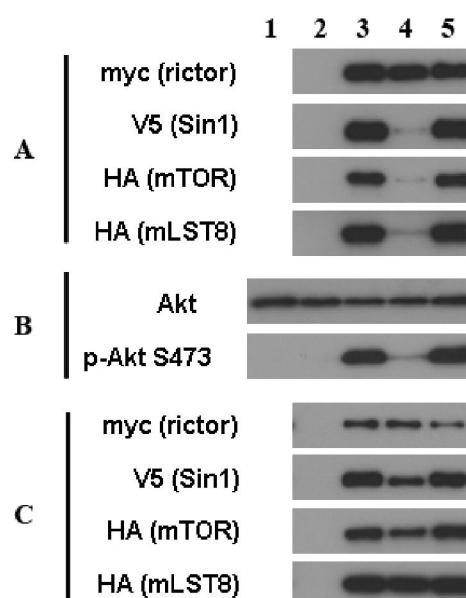
In vitro киназная активность mTORC2 с мутантами риктора. Сборка mTORC2 требует образования гетеродимера риктор/Sin1, так как ни риктор, ни Sin1 не способны связываться с комплексом mTOR/mLST8 поодиночке. Предыдущие исследования показали, что ко-экспрессии

четырех компонентов mTORC2 (mTOR, mLST8, риктора и Sin1) достаточно для реконституции функционального комплекса mTORC2, обладающего киназной активностью в отношении своего субстрата Akt *in vitro*.

Сборка mTORC2 проводилась путем трансфекции клеток HEK293T рекомбинантными плазмидами pRK5-myc-риктор, pRK5-Sin1-V5, pRK5-HA-mTOR и pRK5-HA-mLST8 методом кальциево-fosфатной преципитации. Через 48 ч инкубации клетки лизировали и осуществляли иммунопреципитацию образованных комплексов антителами к myc.

Из рис. 1, С видно, что экспрессируется равное количество всех компонентов mTORC2 во всех случаях. Анализ иммунопреципитатов риктора показал, что риктор дикого типа и его G934L-мутант связывают одинаковое количество mTOR, Sin1 и mLST8. В силу неспособности мутанта G934E ассоциировать с Sin1, образование комплекса в данном случае нарушено. Для этого мутанта показано, что при иммунопреципитации с ним со-осаждается крайне небольшое количество белков, входящих в состав mTORC2 (рис. 1, А).

Рис. 1. In vitro киназная активность mTORC2 с мутантами риктора. А – иммуноблоттинг иммунопреципитатов риктора дикого типа и его мутантных форм. В – киназная реакция с иммунопреципитатами риктора дикого типа и его мутантных форм. С – иммуноблоттинг тотальных белковых экстрактов из клеток, трансформированных кДНК риктора дикого типа и его мутантных форм.
 1 – добавочный отрицательный контроль киназной реакции (киназная реакция без иммунопреципитатов);
 2 – отрицательный контроль (иммунопреципитаты и экстракти из лизатов нетрансформированных клеток);
 3 – положительный контроль (иммунопреципитаты и экстракти из лизатов клеток, трансформированных риктором дикого типа);
 4 – иммунопреципитаты и экстракти из лизатов клеток, трансформированных G934E-формой риктора;
 5 – иммунопреципитаты и экстракти из лизатов клеток, трансформированных G934L-формой риктора



Наличие всех компонентов киназного комплекса mTORC2 не говорит о его активности. Для ее детекции нами был разработан метод определения киназной активности mTORC2 *in vitro*, основанный на инкубации иммунопреципитированных комплексов с Akt.

Известно, что mTORC2 фосфорилирует киназу Akt по остатку Ser-473 в активационной петле киназного домена [3]. Поэтому по степени фосфорилированности данного сайта можно судить о киназной активности mTORC2.

Для киназной реакции иммунопреципитаты инкубировали с 500 нг неактивной Akt в присутствии АТР. Для определения активности mTORC2 киназную смесь после инкубации использовали для иммунологического анализа фосфорилированной по Ser-473 Akt и тотального содержания Akt. Результаты эксперимента показаны на рис. 1, В.

На рисунке показано, что полноценные комплексы, осажденные диким типом риктора и его G934L-мутантом, с одинаковой эффективностью фосфорилируют Akt по Ser-473 *in vitro*. В случае мутанта риктора G934E комплекса как такового не было образовано, поэтому сайт Ser-473 гипофосфорилирован.

Таким образом, в результате применения системы реконституции и *in vitro*-киназной реакции было обнаружено, что дикий тип риктора и его G934L-мутант включались в функциональный mTORC2 киназный комплекс, обеспечивая фосфорилирование Akt по Ser-473 *in vitro*.

Мутант G934E оказался неспособен сформировать mTORC2. Иммуносажденный риктор, без сопутствующих белков, не обладал киназной активностью.

Влияние мутантов риктора на пролиферацию MEF. Дальнейшая работа проводилась на иммортализированных клетках MEF с нокаутированным риктором (*rict*^{-/-} MEF).

MEF – это мышиные эмбриональные фибробласты, поддерживающие структурную целостность тканей путем секреции компонентов внеклеточного матрикса. В лабораторных исследованиях MEF часто используют в качестве поддерживающей культуры для человеческих стволовых клеток. Кроме того, MEF являются удобной системой для изучения роли тех или иных нокаутированных генов на клеточном уровне в культуре. Будучи изолированы из зародышей на 12-14 день развития, MEF позволяют изучить влияние тех генов, нокаут которых летален на более поздних стадиях развития организма [10].

Как показано в [3], в отсутствие риктора комплекса mTORC2 не образуется и, следовательно, в случае нокаута риктораサイト Ser-473, контролируемый mTORC2, остается гипофосфорилированным.

Для изучения влияния G934E-мутанта риктора на скорость пролиферации MEF были созданы линии клеток, стабильно экспрессирующие риктор дикого типа и его мутантную форму в *ricf*^{-/-} MEF. Необходимость создания подобных линий была продиктована низкой эффективностью поглощения ДНК клетками MEF (ок. 30%) и, следовательно, низким уровнем экспрессии изучаемых генов при транзиентной (временной) трансфекции традиционными способами [11]. При кальциево-fosфатном методе и методе, основанном на липосомах, чужеродная ДНК хоть и проникает в ядро, но не встраивается в геном и по прошествии некоторого времени «теряется», ограничивая время изучения трансфенированных клеток несколькими днями. Для оценки влияния мутантной формы риктора на такой сложный процесс, как пролиферация клетки, было необходимо обеспечить достаточно высокий уровень экспрессии изучаемого белка, достигаемый при экспрессионных системах, основанных на лентивиральной трансдукции.

Риктор является необходимым компонентом mTORC2 комплекса, функционирующего в качестве киназы сайта Ser-473 Akt. Утрата клетками риктора обладает значительным ингибирующим воздействием на сигнальный путь Akt. Индукция стабильной экспрессии риктора в нокаутных по риктору клетках MEF восстанавливает регуляцию Akt, что выражается в увеличении уровня клеточной пролиферации.

Для установления степени влияния замены G934E на регуляцию Akt и клеточную пролиферацию нами были созданы клеточные линии, стабильно экспрессирующие мутантную и дикого типа формы риктора. Для получения стабильных линий мы использовали ретровиральную экспрессионную систему.

Для проверки уровня экспрессии генов риктора трансдуцированные клетки MEF лизировали, тотальные белковые экстракты подвергали фракционированию при помощи SDS-PAGE. Разделенные по молекулярной массе белки переносили на PVDF мембранны и анализировали методом иммуноблоттинга с применением антител к тус. Также проверяли уровни эндогенных клеточных белков mTOR, Sin1 и Akt, а также степень фосфорилирования Akt по сайту Ser-473. В качестве контроля содержания равного количества белка в каждой полосе использовали сигнал от тубулина.

Кроме того, для проверки формирования mTORC2 продуктами экспрессии рекомбинантной кДНК риктора и эндогенными внутриклеточными компонентами этого комплекса была произведена иммунопреципитация mTORC2 из трансдуцированных клеток при помощи анти-mTOR антител.

Как видно из рис. 2, В, стабильная экспрессия риктора дикого типа в нокаутных по риктору клетках MEF стабилизировала содержание Sin1 и восстановила фосфорилирование Akt по Ser-473, в то время как интродукция мутанта G934E риктора подобного влияния не оказала, а степень фосфорилирования Ser-473 оставалась по-прежнему низкой.

Иммунопреципитация эндогенных mTORC2 показала, что комплекс образуется только в случае *ricf*^{-/-} MEF, трансдуцированных риктором дикого типа (рис. 2, А).

Для оценки влияния G934E-мутанта риктора на скорость пролиферации MEF был применен метод прямого подсчета клеток в Beckman Coulter Z1 Dual Cell and Particle Counter (Beckman Coulter Inc.). Для подсчета равное количество клеток негативного контроля (*ricf*^{-/-} MEF, трансдуцированные вектором pRV3 без вставки), позитивного контроля (экспрессирующих риктор дикого типа) и экспрессирующих мутантный риктор высаживалось на чаши Петри. Определение числа клеток проводили через 48 и 72 ч. Результаты подсчета приведены на рис. 3.

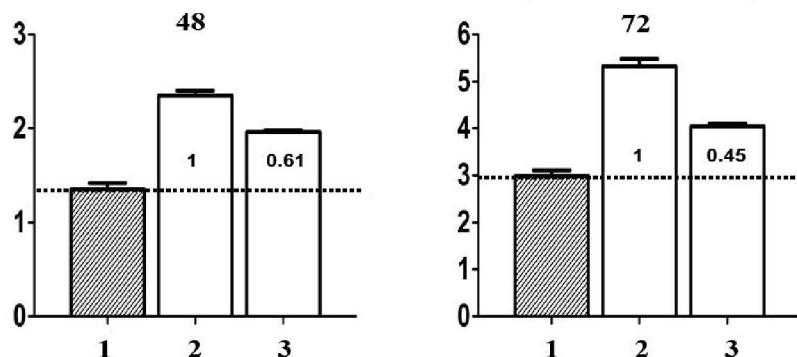
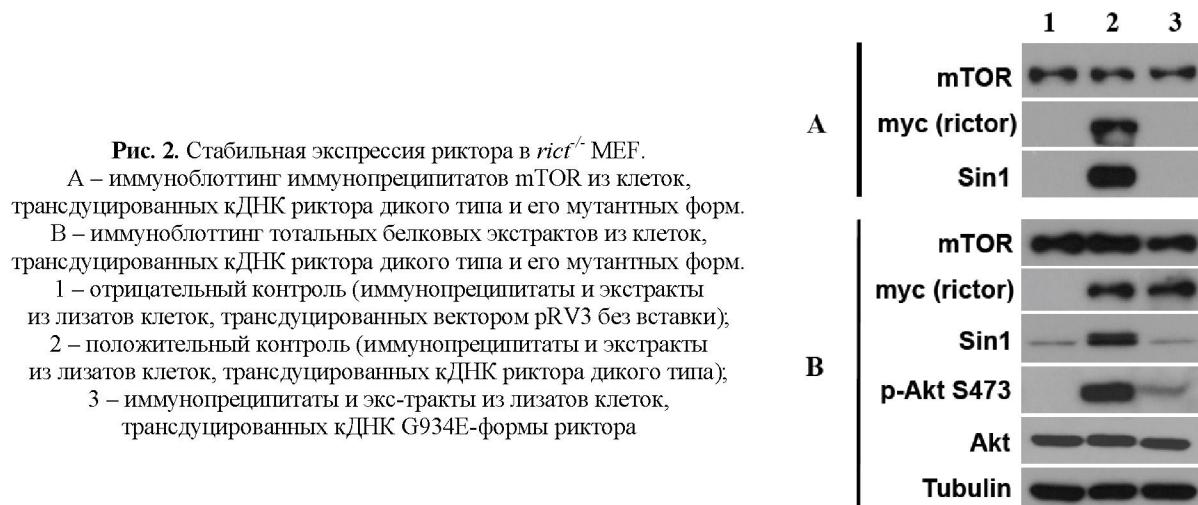


Рис. 3. Скорость пролиферации *rictor*^{-/-} MEF, стабильно экспрессирующие риктор дикого типа и его мутантную форму.
 1 – отрицательный контроль (клетки, трансдуцированные вектором pRV3 без вставки); 2 – положительный контроль (клетки, трансдуцированных кДНК риктора дикого типа); 3 – клетки, трансдуцированные кДНК G934E-формы риктора

На рисунке показано, что на 48 ч клетки положительного контроля более чем в два раза увеличили свою массу и на 39% превышают количеством клетки, экспрессирующие мутантный риктор. На 72 ч разница в скоростях пролиферации трех клеточных линий становится более выраженной. Так, линии, экспрессирующие мутантный риктор, на 55% уступают в числе клеткам положительному контролю.

Таким образом, было установлено, что потеря активности mTORC2 в клетках, экспрессирующих мутантный риктор G934E, ассоциирована с пониженным уровнем клеточной пролиферации по сравнению с положительным контролем. Клетки, экспрессирующие мутантный риктор хоть и пролиферировали быстрее отрицательного контроля, но все же уступали в скорости клеткам с риктором дикого типа.

Следовательно, полученные результаты в совокупности показывают, что мутант G934E риктора неспособен связываться с Sin1 и не включается в функциональный киназный комплекс mTORC2, приводя к нарушению регуляции Akt и снижению уровня пролиферации.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C., Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate // Science. – 1997. – Vol. 275(5300). – P.665–8.
- 2 Somanath P.R., Razorenova O.V., Chen J., Byzova T.V. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5(5). – P. 512–8.
- 3 Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // Science. – 2005. – Vol. 307. – P.1098-1101.
- 4 Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control // Mol Cell. – 2002. – Vol. 10. – P.457-468.

- 5 Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M.A., Hall A., Hall M.N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive // Nat Cell Biol. – 2004. – Vol. 6. – P.1122-1128.
- 6 Kannan N., Haste N., Taylor S.S., Neuwald A.F. The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – Vol. 104(4). – P. 1272-7.
- 7 Jones K.T., Greer E.R., Pearce D., Ashrafi K. Rictor/TORC2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through sgk-1 // PLoS Biol. – 2009. – Vol. 7. – P. 0604-0615.
- 8 Soukas A.A., Kane E.A., Carr C.E., Melo J.A., Ruvkun G. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans* // Genes Dev. – 2009. – Vol. 23. – P. 496-511.
- 9 Aimbetov R., Chen C.-H., Bulgakova O., Abetov D., Bissenbaev A.K., Bersimbaev R.I., Sarbassov D.D. Integrity of mTORC2 is dependent on the rictor Gly-934 site // Oncogene. – 2011. – doi: 10.1038/onc.2011.404.
- 10 Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts // Curr Protoc Mol Biol. – 2005. – P. 104-111.
- 11 Tseng Y.T., Padbury J.F. Transient transfection and adrenergic receptor promoter analysis. // Methods Mol Biol. – 2000. – Vol. 126. – P. 235-9.

P. С. Айымбетов, А. К. Бисенбаев, Д. Д. Сарбасов

**РИКТОРДЫҢ G934E МУТАЦИЯСЫ мTORC2-НЫҢ КИНАЗАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛГІНЕ
ЖӘНЕ КЛЕТКА ПРОЛИФЕРАЦИЯСЫ ЖЫЛДАМДЫҒЫНА КЕРІ ӨСЕР ЕТЕДІ**

mTOR өсү факторлары мен қоректік заттардың сигналдық жүйесінің тоғысында орналасқан және mTORC1 және mTORC2 мультипротеиндік кешендерінің құрамына кіретін негізгі киназа болып табылады. mTORC2 кешеніне кіретін риктордың G934E мутациясы атамышы кешеннің құрастырылуын тәжеп, оның киназалық белсенділігінің тәмендеуіне және клетка пролиферациясы жылдамдығының тәмендеуіне алып келеді.

R. S. Aimbetov, A. K. Bisenbayev, D. D. Sarbasov

**THE MUTATION OF G934E OF THE RICTOR NEGATIVELY INFLUENCES
ON KINASE ACTIVITY OF mTORC2 AND SPEED PROLIFERATION OF A CAGE**

mTOR (mammalian target of rapamycin) is an important hub kinase of growth factor and nutrient signaling, functioning as a part of two multiprotein complexes - mTORC1 and mTORC2 (mTOR complexes 1 and 2). G934E mutation of one of the mTORC2 components - rictor - blocks the complex's assembly and kinase activity and decreases the cell proliferation rate.