

УДК 575.113

Р.И. БЕРСИМБАЙ, О.В. БУЛГАКОВА, Р.Т. ОМАРОВ, Д. САРБАСОВ*

РОЛЬ mTOR СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ

В настоящее время считается установленным, что mTOR сигнальная система участвует в регуляции многих важнейших клеточных функций в эукариотических клетках как в норме, так и в развитии патологических процессов. Обзор посвящен анализу данных литературы последних лет в изучении молекулярных механизмов участия mTORC1 и mTORC2 комплексов в регуляции процессов синтеза белка, липидов, митохондриального биогенеза, аутофагии и др. Обсуждаются существующие гипотезы о возможных механизмах mTOR-регуляции клеточного метаболизма в ответ на воздействие внешних сигналов.

Основные клеточные функции обеспечиваются сложной сетью биохимических сигнальных путей, осуществляющих регуляцию клеточного метаболизма в ответ на воздействие внешних сигналов. m-TOR сигнальная система является одной из основополагающих сигнальных систем, как в клетках растений, так и в клетках животных.

Цель настоящего обзора, – раскрыть молекулярные механизмы m-TOR сигнального пути, его регуляцию и значение в развитии патологических процессов.

Рапамицин

mTOR сигнальный путь был обнаружен благодаря антибиотику группы макролидов – рапамицину, являющемуся продуктом почвенных бактерий *Streptomyces hygroscopicus*.

Рапамицин привлек к себе внимание почти сразу же после его открытия в 1970 году. Тогда научная экспедиция фармацевтической компании Ayerst, работавшая на тихоокеанском острове Пасхи, выделила новый, ранее неизвестный антибиотик из образцов почвы, который был назван рапамицином (Рапа Нуи – так туземцы называли остров Пасхи). Первоначально это вещество планировалось использовать в качестве противогрибкового препарата. Однако идея была быстро признана неудачной, поскольку рапамицин подавлял иммунитет и обладал выраженным антиполовиферативным действием в культуре клеток.

В 90-х годах стало проводиться все больше клинических исследований, связанных с рапамицином, что объяснялось, прежде всего, необходимостью разработки иммунодепрессанта, который позволил бы предотвратить отторжение чужеродных тканей после пересадки органов.

Рапамицин, обладающий выраженными иммуно-депрессивными свойствами, больше всего подходил на эту роль. Рапамицин и несколько синтезированных к тому времени его аналогов в 1997 году были одобрены в США в качестве иммунодепрессорного препарата при трансплантации почки.

Дальнейшее изучение механизмов действия рапамицина привело к абсолютно неожиданным результатам. Оказалось, что данный антибиотик ингибирует клеточный белок, которому было дано название – TOR (target of rapamycin, мишень рапамицина).

Структура TOR белка

TOR, известный также как FRAP (FKBP12-Rapamycin-associated Protein, FKBP12-рапамицин ассоциированный белок), представляет собой крупный белок (289 кД), относящийся к семейству фосфоинозитид родственных киназ – PIKK (phosphoinositide kinase-related kinases). Семейство PIKK киназ в клетках млекопитающих представлено mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих), ATM (ataxia-telangiectasia mutated, атаксия телеанги-

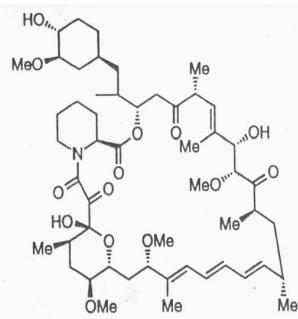


Рис.1 Структура рапамицина

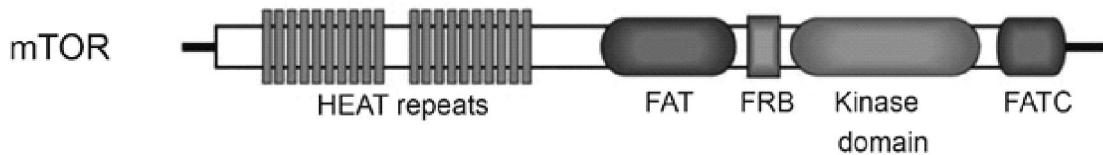


Рис.2 Схема структуры mTOR белка

эктозия мутант), ATR/FRP (ataxia-telangiectasia and rad3-related/FRAP-related protein, атаксия телеангидиозия FRAP-связанный белок) и ДНК-PK C (DNA protein kinase C, ДНК активированная протеинкиназа C). Большинство PIKK киназ консервативны и имеют схожее строение, как в клетках дрожжей, так и в клетках млекопитающих, и вовлечены в регулирование клеточного цикла.

В структуру mTOR включены так называемые HEAT-последовательности (Huntington-elongation factor 1A-protein phosphatase 2A(PP2A) A subunit-TOR), отвечающие за белок-белковые взаимодействия и представляющие собой 2 антипаралельные б-спирали. Каждая из 39 аминокислотной повторности состоит из нескольких консервативных гидрофобных остатков и трех высоко консервативных позиций занимаемых аргинином, пролином и аспарагином. Базирующаяся на основе кристаллической структуры А субъединицы PP2A, состоит из множества HEAT-повторностей, которая формирует пару антипаралельных б-спиралей.

FRB-домен известный также как FKBP12-рапамицин связанный домен, идентифицирован как 11кД сегмент, расположенный на N-терминальном конце. Кристаллическая структура FRB-домена представляет собой четыре спиральных узла с близко расположенными C- и N – терминальными концами. Биохимическая функция FRB-домена до конца не ясна, однако точно установлено, что данный домен обуславливает взаимодействия mTOR и рапамицина. FRB-домен присутствует только в mTOR и не свойственен другим членам семейства PIKK киназ.

Все члены семейства содержат на C-терминальном конце так называемые FATC и FAT домены, молекулярные взаимодействия между которыми и определяют активность PIKK киназ. FAT домен также известен как токсико-эффекторный домен, так как его сверх экспрессия в клетках дрожжей приводит к аресту делящихся клеток в стадии G₁ клеточного цикла. Что каса-

ется FATC домена, то мутации, приводящие к потере даже одной аминокислоты в данном регионе, снижают активность mTOR. Однако механизм этого эффекта не известен.

На C-терминальном конце содержится также киназный домен, который, как было показано секвенированием, проявляет большее сродство к липидным киназам, чем к стандартным протеинкиназам. Однако несмотря на это, mTOR не демонстрирует активности, свойственной липидным киназам. Именно киназный домен отвечает за фосфорилирование основных субстратов mTOR – 4E-BP1 белка (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, белок 1 связанный с 4 фактором инициации эукариот) и S6K1 (S6 Kinase 1, S6 киназа1). Между киназным и FATC доменами предположительно расположен регуляторный RD домен, фосфорилирование которого является основополагающим фактором для ответа на стимуляцию клетки инсулином или ростовыми факторами [1].

Специфическое ингибирование киназной активности mTOR рапамицином

Ингибирование mTOR рапамицином является аллостерическим, т.е. рапамицин связывается с отдельным участком киназы mTOR вне активного центра, что влечет за собой конформационные изменения в молекуле mTOR, которые приводят к уменьшению активности последнего. Однако сам по себе рапамицин не способен связываться с mTOR, он действует через образование определенного комплекса.

Рапамицин и его аналоги (темсиролимус, эверолимус, дефоролимус) способны связываться с внутриклеточным рецепторным белком – FKBP12 (FK506 binding protein of 12, FK506 связанный белок 12), образуя комплекс, соединяющийся с FRB-доменом mTOR, вследствие чего происходит ингибирование активности mTOR сигнального пути [2]. Решающую роль для взаимодействия между рапамицином и FRB-доменом играет остаток серина Ser2035 в FRB-домене.

Так, замена Ser2035 на любой из аминокислотных остатков приводит к нарушению формирования комплекса FKBP12-рапамицин – mTOR.

FKBP12 в клетках человека состоит из остатков 108 аминокислот и является первичным внутриклеточным рецептором рапамицина. Белки семейства FKBP представляют собой пептид-пролил-цис-транс изомеразы, катализирующие взаимопревращение пептидил-пролил связей, и обладают шапероноподобными свойствами. Образование комплекса FKBP12 – рапамицин приводит к ингибированию изомеразной активности FKBP12 *in vitro*. Результатом взаимодействия FKBP12-рапамицина и mTOR является ингибирование основных функций последнего и прежде всего инициации трансляции белков. Показано, что mTOR является ключевым фактором внутриклеточной регуляции белкового синтеза.

mTOR и регуляция инициации трансляции

Регуляция синтеза белков в эукариотических клетках играет решающую роль в развитии, дифференцировке, прохождении клеточного цикла, клеточном росте и апоптозе.

В эукариотической клетке свободная мРНК, как правило, ассоциирована с РНК связывающими белками и образует рибонуклеопротеид (РНП). Для начала трансляции (инициации) существуют своего рода специальные механизмы, в которых принимают участие так называемые факторы инициации (Eukaryotic Translation Initiation Factors (eIFs)). Для инициации трансляции необходимо очистить 5'-концевую часть РНП от молекул белка, а также «расплести» присутствующие в ней элементы вторичной структуры. Эта функция выполняется комплексом eIF4F – одним из важнейших элементов трансляционного аппарата клетки, который состоит из трех различных белковых субъединиц: eIF4E, eIF4G и eIF4A. Небольшой белок eIF4E обладает сильным сродством к кэп – структуре на 5'-конце мРНК (Кд около 10^{-9} М) и за счет него осуществляется присоединение eIF4E к мРНК. Фактор eIF4G играет важную роль в инициации трансляции, обеспечивая связь между разными белками, участвующими в этом процессе. eIF4A является РНК зависимой хеликазой, которая, используя энергию АТФ, «раскручивает» элемен-

ты вторичной структуры 5'-области мРНК. Интересно, что 4A в клетке присутствует как в составе 4F, так и в виде свободного белка, и есть данные, что происходит постоянный обмен между eIF4A в составе 4F и свободным 4A.

«Активированная» при помощи факторов 4-й группы мРНК способна присоединить рибосомальный прединициаторный комплекс. Вероятно, что это присоединение обеспечивает eIF4G за счет взаимодействия с eIF3 в составе прединициаторного комплекса и таким образом 40S субъединица рибосомы оказывается на 5'-конце мРНК. Далее 40S субъединица осуществляет «сканирование» мРНК в направлении 5'>3' до тех пор, пока не обнаружит инициаторный кодон – AUG. Детали этого процесса до сих пор остаются неизвестными, однако считается что 40S субъединица в комплексе с факторами инициации двигается по мРНК в 3'-направлении, проверяя каждый триплет на комплементарность антикодону тРНК

Генетические исследования, проведенные на дрожжах, показали, что за узнавание инициаторного кодона ответственна именно тРНК, а белковые факторы инициации трансляции влияют на точность и эффективность этого процесса. После правильного присоединения антикодона инициаторной тРНК к AUG 40S субъединица рибосомы должна быть освобождена от факторов инициации. Этот процесс обеспечивается факторами eIF5 и eIF5B. Показано, что воздействие на клетку гормонами, митогенами и ростовыми факторами приводит к усилиению трансляции. В то время как дефицит питательных веществ, особенно аминокислот, а также тепловой шок снижают биосинтез белков. В клетках млекопитающих, как правило, наблюдается четкая корреляция между уровнем синтеза белка и активностью eIF4F, который в свою очередь контролируется белками семейства 4E-BP (eIF4E – binding protein) – репрессорами трансляции. Данное семейство представлено тремя небольшими белками, которые конкурируют с eIF4G фактором за связывание с eIF4E. Этот процесс контролируется уровнем фосфорилирования 4E-BP. Гипофосфорилированная форма 4E-BP активно связывается с eIF4E, однако фосфорилированная форма не в состоянии взаимодействовать с последним. Фосфорилирование eIF4G и 4E-BP регулируется mTOR сигнальной системой.

Как уже было отмечено выше, основными субстратами mTOR являются 4E-BP и S6K1. Клетки млекопитающих содержат два вида S6 рибосомальных протеинкиназ (S6K1 и S6K2). В отсутствии экстрацеллюлярных стимулов, таких как ростовые факторы, S6K1 ассоциирована с eIF3. Под воздействием, например, ростовых факторов, mTORC1 фосфорилирует S6K1. Фосфорилирование S6K1 по тирозиновому остатку T389 приводит к диссоциации S6K1-eIF3 комплекса и связыванию S6K1 фосфоинозитид-зависимой киназой 1 (PDK1), которая в свою очередь фосфорилирует S6K1 по тирозиновому остатку T229. После чего S6K1 фосфорилирует eIF4B по сериновому остатку S422, что приводит к ассоциации последнего с eIF3. Эти многочисленные взаимоотношения достигают высшей точки в усилении кэп-зависимой трансляции [3].

Комплекс mTORC1

Дальнейшие исследования показали, что в регуляции кэп-зависимой трансляции mTOR участвует в комплексе с рядом других белков. Этот комплекс был назван mTORC1 (mTOR complex 1, mTOR комплекс 1).

mTORC1 комплекс включает белок raptor (regulatory associated protein of mTOR, регулирующий ассоциированный белок mTOR); mLST 8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8,), известный также как GbL [4,5]; PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa, богатый пролином АКТ субстрат 40) и белок deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting, DEP –домен содержащий взаимодействующий с mTOR) [6]. Raptor отвечает за сборку комплекса в целом и взаимодействие последнего с субстратами [4]. Роль mLST8 в mTORC1 пока еще не вполне ясна, так по данным Гуртинг и др. [7], отсутствие данного белка не отражается на активности комплекса *in vivo*. PRAS40 регулирует киназную активность mTORC1 путем ингибирования связывания раптора с субстратом [8]. Deptor также негативно регулирует активность комплекса, взаимодействуя с mTOR посредством PDZ домена [9,10]. После активации mTORC1 фосфорилирует PRAS40 и deptor, что приводит к ослаблению их взаимодействия с комплексом и как следствие активирует данный сигнальный путь.

mTORC1 регулирует клеточный рост и размер клеток, активируя множество анаболичес-

ких процессов, включая биосинтез белков, липидов и органелл, а также ограничивая катаболические процессы, такие как аутофагия. Однако бесспорно то, что основной функцией mTORC1 комплекса является регуляция синтеза белка путем фосфорилирования 4E-BP1 и S6K1.

mTORC1 и синтез липидов

В последнее время также обсуждается вопрос об участии mTORC1 в регуляции синтеза липидов. Было показано, что mTORC1 положительно регулирует два транскрипционных фактора, контролирующие экспрессию генов вовлеченных в регуляцию липидного обмен: 1) SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1, белок 1, связанный со стерол-регуляторным элементом) [11] и 2) PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , гамма рецептор активирующий пролиферацию пероксисом). Как сообщает Ким и др., ингибирование mTORC1 комплекса рапамицином приводит к значительному уменьшению экспрессии PPAR- γ [12]. Кроме того, рапамицин снижает уровень фосфорилирования фосфатазы фосфатидной кислоты, участвующей в синтезе глицеролипидов и активирующей многие транскрипционные факторы, такие как PPAR- β и PGC1- β , в том числе и PPAR- γ . Однако молекулярный механизм активирования mTORC1 комплексом SREBP1 до сих пор остается не выясненным.

mTORC1 и митохондриальный биогенез

mTORC1 регулирует также митохондриальный биогенез. Показано, что ингибирование данного комплекса в свою очередь вызывает снижение мембранныго потенциала митохондрий, поглощения кислорода и уровня АТФ. Кроме того, было отмечено, что под действием рапамицина сокращается число копий митохондриальной ДНК, кодирующими белки, участвующие в окислительном метаболизме, и увеличивается частота мутаций, которые активируют mTORC1 сигнальный путь [6].

mTORC1 и аутофагия

Аутофагия представляет собой процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь её лизосом и подвергаются в них деградации. Различают три типа аутофагии—микроаутофагию, макроаутофагию и шаперон- зависимую аутофагию. При микроаутофагии мак-

ромолекулы и обломки клеточных мембран просто захватываются лизосомой. Таким путем клетка может переваривать белки при нехватке энергии или строительного материала (например, при голодании). При макроаутофагии участок цитоплазмы (часто содержащий какие-либо органоиды) окружается мембранным компартментом, похожим на цистерну эндоплазматической сети. В результате этот участок отделяется от остальной цитоплазмы двумя мембранами. Такие двухмембранные органеллы, окружающие удаляемые органеллы и цитоплазму, называются аутофагосомами. Аутофагосомы соединяются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, в которых органеллы и остальное содержимое аутофагосом перевариваются. Третий тип аутофагии – шаперон-опосредованная. При этом способе происходит направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в ее полость, где они перевариваются. Этот тип аутофагии, описанный только для млекопитающих, индуцируется стрессом.

Аутофагия сопровождает жизнедеятельность любой нормальной клетки в обычных условиях. Основными стимулами к усилиению процессов аутофагии в клетках могут служить: нехватка питательных веществ, наличие в цитоплазме поврежденных органелл или частично денатурировавших белков и их агрегатов. Как отмечалось выше, mTORC1 комплекс регулирует не только процессы синтеза, но и распада органических веществ в клетке. Когда уровень питательных веществ снижается, распад органелл и белковых комплексов путем аутофагии дает новый материал для анаболических процессов, таких как синтез белков и энергии. Аутофагия значительно усиливается при ингибиции mTORC1 комплекса и, наоборот, при стимуляции последнего этот процесс замедляется. Предположительно mTORC1 осуществляет контроль аутофагии через неизвестный механизм, не чувствительный к ингибиции рапамицином. Было выдвинуто предположение, что mTORC1 контролирует данный процесс посредством регуляции белкового комплекса, состоящего из ULK1 (unc-51-like kinase 1), ATG13 (autophagy-related gene 13) и FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa), в частности, фосфорилируя ULK1 и ATG13, и подавляя тем самым аутофагию.

mTOR сигнальная система и ее регуляция

mTORC1 интегрирует различные сигнальные пути, в том числе пути действия инсулина и ростовых факторов, функционирует как сенсор уровня питательных веществ и энергии в клетке, а также окислительно-восстановительного статуса.

Одним из наиболее важных сенсоров, вовлеченных в регуляцию активности рапамицинчувствительного комплекса, является TSC (tuberous sclerosis complex), представляющий собой гетеродимер, состоящий из гамартина (TSC1) и тубирина (TSC2). TSC1/2 обладает ГАФ-активностью по отношению к ГТФ-белку суперсемейства Ras – Rheb (Ras-homolog enriched in brain). В активном состоянии ГТФ-связанная форма Rheb напрямую взаимодействует с mTORC1 и активирует комплекс. Rheb-специфичный GAP, TSC1/2 негативно регулирует mTORC1 сигнальный путь, путем превращения Rheb в его неактивную ГДФ-связанную форму. Мутации, инактивирующие данный комплекс приводят к развитию туберозного склероза, заболевания, характеризующегося множественными опухолями в различных органах и тканях.

Ростовые факторы стимулируют mTORC1 путем активации инсулинового и Ras сигнальных путей. Стимуляция этих путей увеличивает фосфорилирование TSC2 протеинкиназой B (PBK/Akt), киназой ERK1 / 2 (extracellular-signal-regulated kinase 1/2), и p90 рибосомной S6 киназой 1 (RSK1) вследствие чего происходит инактивация Tsc1 / 2 и, следовательно, активация mTORC1. Кроме того, под воздействием факторов роста Akt может активировать mTORC1 независимо от TSC1/2, путем фосфорилирования PRAS40 и соответственно его диссоциации от комплекса mTORC1 [13].

Инсулин взаимодействует с рецептором, который представляет собой тирозиновую протеинкиназу, происходит аутофосфорилирование рецептора по нескольким тирозиновым остаткам, после чего он становится способен фосфорилировать другие внутриклеточные белки – субстраты, в том числе и IRS1 (recruitment of insulin receptor substrate 1). Этот цитоплазматический белок (IRS1) фосфорилируется по остаткам тирозина немедленно после стимуляции инсулином, что придает ему способность соединяться с рядом белков, содержащих SH2-домены и в первую очередь с фосфатидилинозитол-3-киназой

(PIP3). PIP3 фосфорилирует фосфолипид мембранны фосфатидилинозитол-дифосфат в фосфатидилинозитол-трифосфат. Последний связывается с Акт через РН-домен (Pleckstrin Homology domain, 120 остатков аминокислот). РН-домен выполняет функцию «заякоривания» Akt в цитоплазматической мембране.

В различных типах клеток активация mTORC1 ингибирует PI3K-Акт путь. Кроме того, активация основного эффектора mTORC1 – S6K1 усиливает фосфорилирование IRS1 и соответственно понижает его стабильность. Таким образом, в данном случае имеет место негативная регуляция путем обратной связи.

Активность mTOR сигнального пути зависит от поступления в клетку различных веществ, в частности, аминокислот. Многие исследования показали, что снижение уровня аминокислот в клетках млекопитающих приводит к дефосфорилированию обоих эффекторов mTORC1 – S6K1 и 4E-BP1, и соответственно к снижению уровня синтеза белков. Наибольшее значение для активации mTOR «сигналинга» имеет содержание в клетке аминокислоты лейцина, по сравнению с содержанием других аминокислот [14]. Предположительно, лейцин регулирует mTOR путь через TSC 1/2 и Rheb [15]. Тем не менее, до сих пор остается загадкой, каким образом аминокислоты регулируют активность mTOR сигнального пути [16].

Согласно одной из гипотез ключевая роль в данном процессе принадлежит киназе hVps34 (human vacuolar protein-sorting-associated protein 34), относящейся к третьему классу PI3K [17-19], так как было установлено, что подавление экспрессии гена hVps34 siPHK приводит к нарушению фосфорилирования S6K1 и 4EBP1. Предположительно аминокислоты регулируют активность hVps34 опосредовано, способствуя притоку ионов Ca^{2+} в клетку, что в свою очередь, увеличивает взаимодействия Ca^{2+} / CaM (кальмодулина) с hVps34-mTOR и активирует mTORC1 [20]. Однако результаты недавних исследований ставят под сомнение роль киназы hVps34 в регуляции mTOR сигнального пути. Так, Юхас с со-трудниками в ходе экспериментов на дрозофиле *in vivo* показал, что у мутантов с потерей функций hVps34, размер клеток соответствовал клеткам дикого типа, следовательно, функционирование TOR сигнального пути не изменялось в зависимости от активности hVps34 киназы [21]. Фин-

длай и др. считают MAP4K3 протеинкиназы важным компонентом восприимчивости mTOR пути к содержанию аминокислот в клетке [22]. Они показали, что активность MAP4K3 регулируется уровнем аминокислот и гиперэкспрессия MAP4K3 специфически увеличивает фосфорилирование S6K1, даже при низком уровне аминокислот.

Недавние исследования двух независимых групп ученых обнаружили, что Rag (Ras-связанные ГТФазы) малые ГТФазы (Rag A, B, C, и D) возможно могут играть важную роль в регуляции активности mTOR сигнального пути аминокислотами. В присутствии аминокислот белок Rag связывается с раптором и способствует перемещению mTORC1 в перинуклеарную область, содержащую его непосредственный активатор – Rheb. Пространственное разобщение mTORC1 и Rheb в условиях недостатка аминокислот может объяснить, почему активаторы Rheb, такие как фактор роста, не стимулируют mTORC1 [23,24].

Энергетический уровень клетки также регулирует mTOR активность [25]. Ингибирование mTOR в ответ на снижение уровня энергии внутри клетки опосредовано активированием AMPK киназы (AMP-activated protein kinase) протеинкиназой LKB1 (serine/threonine kinase 11). При условиях, когда внутри клетки уровень АТФ снижается, а уровень АМФ напротив возрастает, АМФ связывается с AMPK, что позволяет LKB1 фосфорилировать данную киназу по треониновому остатку (Thr172) в каталитической б-субъединице [26]. Активная AMPK фосфорилирует TSC2 по сериновому остатку (Ser1345), подготавливая TSC2 к последовательному фосфорилированию по сериновым остаткам Ser1341 и Ser1337 киназой 3 гликоген синтазы (glycogen synthase kinase 3) [27]. Эти модификации увеличивают GAP-активность TSC2, инактивируют Rheb и блокируют mTORC1. Кроме того, AMPK может снижать активность mTORC1 комплекса в ответ на понижение энергетического уровня напрямую фосфорилируя раптор [28].

Гипоксия вызывает быстрые и значительные изменения в клеточном метаболизме, в частности за счет ингибирования комплекса TORC1. Уровень кислорода действует на mTORC1 через множество различных путей. В условиях умеренной гипоксии уменьшение уровня АТФ активирует AMPK, которая в свою очередь вы-

зывают активацию TSC1/2 тем самым, ингибируя mTORC1 сигнальный путь, как было уже описано выше. Гипоксия может также активировать TSC1/2 посредством REDD1 (transcriptional regulation of DNA damage response 1). REDD1 освобождает TSC2 от ассоциации с 14-3-3 белками и блокирует mTORC1. *In vitro* нарушение функционирования REDD1 способствует независимому росту и пролиферации клеток в условиях гипоксии как следствие дисрегуляции mTORC1. Способность REDD1 ингибировать mTORC1 сигнальный путь, разрушая взаимодействие TSC2 и 14-3-3 белков, возможно, возникла вследствие ограничения энергоемких процессов, когда именно кислород, а не факторы роста, является лимитирующим фактором. Кроме того, способностью ингибировать mTORC1 в условиях гипоксии путем нарушения его взаимодействия с Rheb, обладает онкосупрессор PML (promyelocytic leukemia tumor suppressor) и BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) [29].

Ингибирование рапамицином активности mTOR киназы осуществляется не всегда. Объясняется это тем, что mTOR функционирует в качестве каталитической субъединицы в составе двух разных молекулярных комплексов – mTORC1 и mTORC2, и FKBP12-рапамицин не взаимодействует с mTORC2, а, следовательно, не способен ингибировать последний [30]. На основании чего mTORC1 и mTORC2 называют соответственно рапамицин-чувствительным и рапамицин-нечувствительным комплексом. Хотя дальнейшие исследования показали, что с одной стороны, в некоторых случаях длительное воздействие рапамицина блокирует сборку mTORC2 комплекса и ингибирует таким образом его активность [31], с другой стороны, важнейшие функции mTORC1 могут быть устойчивы к ингибированию рапамицином [32,33].

Комплекс mTORC2 и его функции

В состав mTOR комплекса 2 (mTORC2) входят mTOR, рапамицин- нечувствительный спутник mTOR – rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mLST8, mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein , белок взаимодействующий со стресс-активируемой протеинкиназой 1 млекопитающих) [30], protor 1 (protein observed with rictor-1, белок взаимодействующий с rictor-1) [34], и deptor [6].

В противоположность mTORC1 комплексу, mTORC2 на данный момент слабо изучен. Определенные трудности, связанные с гибеллю в период раннего эмбриогенеза мышей, нокаутных по гену риктора, не позволяют в достаточной мере изучить данный комплекс *in vivo*.

Тем не менее, многие важные открытия в этой области были сделаны в течение последних лет. На основании этих исследований можно сделать вывод, что комплекс mTORC2 играет ключевую роль в различных биологических процессах, включая клеточный метаболизм, пролиферацию и выживание клеток, организацию цитоскелета.

Выживание клеток, пролиферация и метаболизм зависят от активности Akt, которая позитивно регулирует вышенназванные процессы, путем фосфорилирования различных эффекторов. Для того чтобы Akt перешла в активное состояние, она должна быть фосфорилирована по двум сайтам: Ser308 и Ser473. В первом случае Akt фосфорилирует фосфоинозитид-зависимая киназа 1 (PDK1). На роль же PDK2, которая должна фосфорилировать Akt по сериновому остатку 473, выдвигалось большое количество различных киназ, например, интегрин-зависимая киназа и даже сама Akt. Однако в качестве таковой был идентифицирован mTORC2 [35]. Ингибирование Akt вследствие снижения активности mTORC2, в свою очередь активирует FoxO1 (forkhead box protein O1) и FoxO3a транскрипционные факторы, которые контролируют экспрессию генов, вовлеченных в такие процессы как устойчивость к стрессу, клеточный метаболизм, арест клеточного цикла и апоптоз.

Протеинкиназа SGK1 (serum-glucocorticoid-induced protein kinase 1) также регулируется mTORC2. Но в отличии от Akt, которая сохраняет свои основные функции даже при ингибировании TORC2 комплекса, SGK1 теряет свою активность при данных условиях. Возможно, так как SGK1 и Akt фосфорилируют FoxO1 и FoxO3a по общим сайтам, недостаточная активность SGK1 является причиной ингибирования FoxO1 и FoxO3a.

mTORC2 регулирует организацию цитоскелета. Так в риктор – нокдаун клетках наблюдается полимеризация актина и изменение самой морфологии клетки. В раптор-нокдаун клетках и контроле актиновые волокна локализуются преимущественно околоклеточной мембранны, а также незначительное их количество диффузно рас-

пространено по всей цитоплазме. В риктор-нокдаун клетках наблюдается противоположная картина, толстые актиновые волокна в большинстве своем встречаются именно в цитоплазме, в то время как количество актиновых волокон вблизи клеточной мембранны незначительно. Также во многих клетках имеются тяжи толстых актиновых пучков, которые не имели четкой связи с остатками актинового цитоскелета. Следует также отметить, что в клетках со сниженной mTOR экспрессией наблюдались изменения, подобные выше описанным [35]. Предположительно mTORC2 комплекс контролирует формирование актинового цитоскелета клетки посредством фосфорилирования протеинкиназы C_б (PKC_б) и активации RhoA и Rac1 [6]. Однако молекулярный механизм, который лежит в основе регуляции mTORC2 комплексом данного процесса остается не известным.

Много вопросов вызывает и сигнальный путь, который приводит к активации mTORC2. Вследствие того, что факторы роста усиливают киназную активность mTORC2 комплекса, а также фосфорилирование Akt по остатку серина Ser473, они представляются наиболее вероятным сигналом для регуляции данного сигнального пути. При стимуляции фактором роста, Akt фосфорилируется в клеточной мемbrane путем связывания с фосфатидилинозитол-фосфатами через PH-домен (pleckstrin homology domain). PDK1 также присоединяется к клеточной мемbrane посредством PH-домена и фосфорилирует Akt по сериновому остатку Ser308. Интересно, что один из компонентов mTORC2 комплекса, а именно mSIN1 также содержит PH-домен. Это дает возможность предположить, что mSIN1 может способствовать транслокации mTORC2 в мембрану, для того чтобы фосфорилировать Akt по сериновому остатку Ser473. Однако для подтверждения выше изложенной модели, необходимы дальнейшие исследования, которые позволят идентифицировать другие клеточные сигналы, играющие роль в регуляции mTORC2 комплекса.

Несмотря на то, что за последнее десятилетие в области исследования mTOR сигнального пути были получены значительные результаты, которые позволяют лучше понять патогенез таких заболеваний как рак [36] и диабет второго типа, наши знания остаются не полными и существует множество вопросов, на которые еще предстоит ответить. Например, как осуществля-

ется регуляция mTORC2 и какие биологические процессы задействованы в этом контроле? Как взаимодействуют mTORC1 и mTORC2 сигнальные пути? Имеются ли еще комплексы, подобные mTORC1 и mTORC2, и какие процессы в клетке они могут регулировать? Ответив на эти и многие другие важные вопросы, мы сможем понять механизм развития и возможность терапии многих, в том числе мультифакторных заболеваний человека [37].

ЛИТЕРАТУРА

1. Harris T.E., Lawrence J. TOR signaling.// Sci.STKE 2003. Vol.2003 , P.212-215.
2. Ballou L. M., Lin R. Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.// J. Chem. Biol. 2008. Vol.1(1-4), P. 27–36.
3. Gingras A., Baught B., Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR.//Genes & Development. 2001. Vol. 15. P. 807-826.
4. Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., King J.E., Latek R.R., et al. mTOR interacts with raptor of ormanutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.//Cell. 2002. Vol. 110. P.163–175.
5. Feldman M.E., Apsel B., Uotila A., Loewith R., Knight Z.A., Ruggiero D., Shokat K.M. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2.// PLoS Biology. 2009. Vol. 7. P. 371-383.
6. Laplante M., Sabatini D. mTOR signaling at a glance // J. of Cell Science. 2009. Vol.122.P. 3589-3594.
7. Guertin D. A., Stevens D. M., Thoreen C. C., Burds A. A., Kalaany N. Y., Moffat J., Brown M., Fitzgerald K. J. and Sabatini, D. M. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. //Dev. Cell. 2006. Vol.11. P. 859-871.
8. Wang L., Harris T. E., Roth R. A. and Lawrence J. C. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. //J. Biol Chem. 2007. Vol. 282. P.20036-20044.
9. Peterson T. R., Laplante M., Thoreen C. C., Sancak Y., Kang, S. A., Kuehl W. M., Gray N. S. and Sabatini D. M. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. //Cell. 2009. Vol.137. P. 873-886.
10. Proud C. Dynamic Balancing: DEPTOR Tips the Scales // J. Mol. Cell. Bio. 2009. Vol.1.P.61-63.
11. Porstmann T., Santos C. R., Griffiths B., Cully M., Wu M., Leevers S., Griffiths J. R., Chung Y. L. and Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. //Cell Metab.2008. Vol.8. P. 224-236.
12. Kim J. E. and Chen J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. //Diabetes. 2004. Vol. 53. P. 2748-2756.
13. Sancak Y., Thoreen, C. C., Peterson T. R., Lindquist R. A., Kang, S. A., Spooner E., Carr S. A. and Sabatini D. M. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. //Mol. Cell. 2007. Vol. 25. P. 903-915.
14. Shigemitsu K., Tsujishita Y., Miyake H., Hidayat S., Tanaka N., Hara K., Yonezawa K. Structural requirement of

- leucine for activation of p70 S6 kinase. //FEBS Lett. 1999. Vol. 447. P.303–306.
15. Ropelle E.R., Pauli J.R., Prada P.O., de Souza C.T., Picardi P.K., Faria M.C., Cintra D.E., Fernandes M.F., Flores M.B., Velloso L.A., Saad M.J., Carvalheira J.B. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation // J Physiol. 2006. Vol. 577. P. 997–1007.
 16. Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway.// Nutr. Res. Pract. 2009. Vol. 3(1). P. 64–71.
 17. Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. //J Biol Chem. 2005. Vol. 280. P. 33076–33082.
 18. Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann S.G, Kim S.Y., Gulati P, Byfield M.P., Backer J.M., Natt F, Bos J.L., Zwartkruis F.J., Thomas G. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. //Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102. P. 14238–14243.
 19. Dreyer H.C., Drummond M. J., Pennings B., Fujita S., Glynn E. L., Chinkes D. L., Dhanani Sh., Volpi E., Rasmussen B. B. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle.// Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2008. Vol. 294(2). P.392–400.
 20. Gulati P., Gaspar L.D., Dann S.G., Joaquin M., Nobukuni T., Natt F., Kozma S.C., Thomas A.P., Thomas G. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca2+/CaM signaling to hVps34. //Cell Metab. 2008. Vol. 7. P. 456–465.
 21. Juhasz G., Hill J.H., Yan Y., Sass M., Baehrecke E.H., Backer J.M., Neufeld T.P. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila. //J Cell Biol. 2008. Vol. 181. P. 655–666.
 22. Findlay G.M., Yan L., Procter J., Mieulet V., Lamb R.F. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. //Biochem J. 2007. Vol. 403. P.13–20
 23. Kim E., Goraksha-Hicks P., Li L., Neufeld TP, Guan K.L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. / /Nat Cell Biol. 2008. Vol. 10. P. 935–945.
 24. Sancak Y., Peterson T.R., Shaul Y.D., Lindquist R.A., Thoreen C.C., Bar-Peled L., Sabatini D.M. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. //Science. 2008. Vol. 320. P. 1496–1501.
 25. Alessi D.R., Sakamoto K., Bayascas J.R. LKB1-dependent signaling pathways. //Annu. Rev. Biochem. 2006. Vol.75. P.137–163.
 26. Shaw R.J., Kosmatka M., Bardeesy N., Hurley R.L., Witters L.A., DePinho R.A., Cantley L.C. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004 Vol. 101. P. 3329–3335.
 27. Inoki K., Ouyang H., Zhu T., Lindvall C., Wang Y., Zhang X., Yang Q., Bennett C., Harada Y., Stankunas K., Wang C.Y., He X., MacDougald O.A., You M., Williams B.O., Guan K.L. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. //Cell. 2006. Vol. 126 P. 955–968.
 28. Gwinn D. M., Shackelford D. B., Egan D. F., Mihaylova M. M., Mery A., Vasquez D. S., Turk, B. E. and Shaw R. J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. //Mol. Cell. 2008. Vol. 30. P. 214–226.
 29. DeYoung M., Horak P., Sofer A., Sgroi D., and Ellisen L.W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling// Genes & Dev. 2008. Vol. 22. P. 2 239-251.
 30. Sarbassov D.D., Ali S.M., Kim D.H., Guertin D.A., Latek R.R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., and Sabatini D.M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton.// Curr.Biol. 2004. Vol. 14. P. 1296–1302.
 31. Sarbassov D. D., Ali S. M., Sengupta S., Sheen J. H., Hsu P. P., Bagley A. F., Markhard A. L. and Sabatini D. M. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell. 2006. Vol. 22. P.159-168.
 32. Choo A. Y., Yoon S. O., Kim S. G., Roux P. P. and Blenis, J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P.17414-17419.
 33. Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D.M. and Gray, N. S. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveal rapamycin-resistant functions of mTORC1.// J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P.8023-8032.
 34. Pearce L., Huang Xu., Boudeau J., Pawlowski R., Wullschleger S., Deak M., Ibrahim A., Gourlay R., Magnuson M., Alessi D. Identification of Protor as novel Rictor-binding component of mTOR complex-2.//Biochem. J. 2007. Vol. 405. P.513-522.
 35. Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M. and Sabatini D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. //Science. 2005. Vol. 307. P. 1098-1101.
 36. Sarbassov D. D. The mTOR signaling in cancer.// Materials of the 15 Alexander Hollander course. Astana, 2009. P.24-26.
 37. Берсимбаев Р.И. Медицинская геномика: некоторые достижения и проблемы. // Вестник ЕНУ (серия естественных наук), 2009. № 2, С.128-134.

Резюме

Қазіргі таңда mTOR сигналдық жүйесі калыпты жағдайдағы эукариотты жасушалардағы көптеген манызды клеткалық функцияларының реттелуіне және патологиялық процесстердің даму үрдісіне қатысады. Қазіргі шолудың мақсаты осы саладағы жаңа ғылыми мәліметтерді қорытындылай отырып, ақызыз, липид синтезіндегі және митохондриальды биогенез және аутофагия процесстерінің реттелуіндегі mTORC1 mTORC2 комплекстерінің молекулярық механизмін зерттеуге арналады. Сонымен катар бұл зерттеулерге қосымша, жасуша метаболизмінің реттелуіне қатысатын mTOR жүйесінің ішкі сигналдардың әрекетіне әсер ететін механизмдерге байланысты бірнеше болжамдары талқыланады.

Résumé

It is currently well established that mTOR signal pathway plays important roles in variety of cell functions in eukaryotes including pathological processes. This review summarizes the latest studies of molecular mechanisms of the involvement of mTORC1 and mTORC2 complexes in regulation of protein and lipid synthesis, mitochondrial biogenesis, autophagous etc. Current hypothesis of possible mechanisms of mTOR function in regulation of cell metabolism in response to effect of outer signals discussed.

Евразийский национальный университет
им.Л.Н.Гумилева, г. Астана;

*Техасский университет, онкологический центр
М.Д. Андерсена, Хьюстон, США Поступила 12.07.2010 г.