

O. V. БУЛГАКОВА<sup>1</sup>, Т. ШАЙКЕНОВ<sup>2</sup>, Д. САРБАСОВ<sup>1,2</sup>, Р. И. БЕРСІМБАЙ<sup>1</sup>

## ВЫДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ mTOR

<sup>1</sup>Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан

<sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Oncology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

Мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) – центральный компонент консервативного сигнального пути, играющий ключевую роль в регуляции клеточной физиологии. Согласно биохимическим исследованиям последних лет mTOR входит в качестве каталитической субъединицы в состав двух различных комплексов – mTORC1 и mTORC2. mTORC1 осуществляет регуляцию биосинтеза белка и рибосомального биогенеза путем фосфорилирования S6K1 и 4EBP1. Киназа Akt, ключевое звено многочисленных сигнальных путей, является даунстрим регулятором mTORC2. В работе рассматриваются методы очистки mTOR комплексов.

mTOR (mammalian target of rapamycin) представляет собой крупный белок с молекулярной массой 289 кДа и относится к классу серин-треониновых протеинкиназ [1, 2]. В клетках mTOR входит в виде каталитической субъединицы в два функционально различных комплекса – комплекс 1 (mTORC1) [3] и комплекс 2 (mTORC2) [4]. В состав mTORC1 помимо mTOR входит ряд белков: регуляторный белок raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST 8 (mammalian lethal with Sec13 protein8), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) [5] и белок deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting) [6, 7]. mTORC1 является одним из ключевых позитивных регуляторов трансляции белков и чувствителен к действию рапамицина. mTORC1 осуществляет регуляцию трансляции белков по двум основным путям: через стимуляцию рибосомной S6-киназы (p70 ribosomal protein S6 kinase – S6K), ответственной

за фосфорилирование и активацию рибосомных белков, и через инактивацию белка-супрессора трансляции 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1), являющегося ингибитором фактора инициации eIF-4E (eukaryotic initiation factor-4E) [3].

В mTORC2 раптор замещен белком риктором (rapamycin insensitive companion of mTOR) и Sin 1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein) [4]. Последний стабилизирует взаимодействие между mTOR и риктором. Функция этого комплекса окончательно не установлена, предположительно mTORC2 играет ключевую роль в различных биологических процессах, включая клеточный метаболизм, пролиферацию и выживание клеток, организацию цитоскелета. Данный комплекс малочувствителен к рапамицину.

Рапамицин и его аналоги (темсиролимус, эверолимус, дефоролимус) способны связываться с внутриклеточным рецепторным белком –

FKBP12 (FK506 binding protein of 12), образуя комплекс, соединяющийся с FRB-доменом mTOR, вследствие чего происходит ингибирование активности mTOR сигнального пути, и как следствие, ингибирование инициации трансляции белков [8].

mTOR сигнальный каскад имеет ключевое значение в патогенезе многих онкологических заболеваний, и такие опухоли обычно характеризуются агрессивным ростом, устойчивостью к химио- и лучевой терапии и неблагоприятным прогнозом течения заболевания [9-11]. Все это определяет пристальное внимание исследователей к изучению mTOR сигналинга.

Целью настоящего исследования явилось разработка метода выделения и очистки компонентов mTOR комплексов – mTORC1 и mTORC2.

### Материалы и методы

**Клеточная культура.** В настоящей работе использовались клеточные линии: HEK 293T, MDA-MB-435, PC3, HeLa. Раковые клеточные линии (HeLa, MDA-MB-435) получены от Американской коллекции клеточных культур (ATCC, Manassas, VA). Клетки культивировались в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), содержащей 10% телячью эмбриональную сыворотку (FBS, Atlanta Biological), 2 mM L-глутамин (Thermo scientific) и 100 ед./мл пенициллин/стрептомицина (Thermo scientific) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

**Антитела.** Проводили тестирование специфических антител (Abs) с целью установления эффективности детекции компонентов mTORC1 и mTORC2:

a) Антитела, производства Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) - mTOR (FRAP антитела (козлиные, #sc-1549, IP); rictor антитела (козлиные, rictor Ab, #sc-50678, вестерн blot, IP); вторичные HRP антитела (вестерн blot).

b) Антитела, производства Cell Signaling (Danver, MA) - mTOR (кроличьи mTOR Ab, #2983, Cell Signaling, вестерн blot); Raptor (кроличьи, # cs 24C12); S6K1(кроличьи, # cs 24C12); pS6K1 T389 (кроличьи, # cs 24C12).

c) Антитела, производства Bethyl (Montgomery, TX) - raptor (кроличьи raptor Ab, #A300-553A, вестерн blot и IP) and rictor (кроличьи rictor Ab, # A300-459A, вестерн blot и IP).

d) Антитела мышиные Sin1 моноклональные Ab is (#05-1044), производства Millipore, Bedford, MA.

**Иммунопрепарация (IP).** Культуру клеток, предварительно промыв дважды 5 мл охлажденного фосфатно-солевого буфера (PBS) (850 г. NaCl, 115 г. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20,3 г. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> на 10 л. д.д. H<sub>2</sub>O, pH 7,2), лизировали с использованием лизисного буфера (40mM Hepes, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM пиофосфат натрия, 10 mM в глицерофосфат натрия), содержащего 0,3% Chaps и ингибиторы протеаз (Roche).

В супернатант, полученный после центрифугирования (12000xg, 12 мин, t=+4°C), добавляли первичные антитела и инкубировали в течение 2 часов при температуре +4°C. Агарозные гранулы (Thermo scientific), предварительно растворив в охлажденном PBS буфере из расчета 1:1 (объем/объем), добавляли в количестве 45 µl в супернатант после 2-часового инкубирования последнего с антителами. После 1 часа инкубации агарозные гранулы осаждались центрифугированием (5000xg, 1 мин, =+4°C) и промывались троекратно 0,3% Chaps лизисным буфером. Все процедуры во время проведения иммунопрепарации проводились на льду, во избежание денатурации белков.

**Окрашивание серебром.** Использовался SilverQuest Silver Staining Kit (Invitrogen). Полиакриламидный гель 7,5% после электрофореза промывали дистиллированной водой и инкубировали в растворе фиксатора (40% этиловый спирт, 10% уксусная кислота) в течение 16 часов. Затем последовательно промывали в 30% этиловом спирте, дистиллированной воде и растворами вышеуказанного кита.

### Результаты и их обсуждение

Оптимизация лизиса клеток или тканей во время очистки белковых комплексов является необходимой для сохранения целостности вышеуказанных комплексов. Однако это достаточно сложный процесс. Для того чтобы определить параметры, которые являлись бы наиболее оптимальными для данного комплекса белков, необходимо, прежде всего, изучить различные условия проведения лизиса клеток. Целостность белкового комплекса зависит от множества условий, как то: концентрация солей в лизисном буфере, pH, наличие или отсутствие ионов кальция или магния, тип и концентрация дегергентов. Все вышеперечисленное является ключевыми

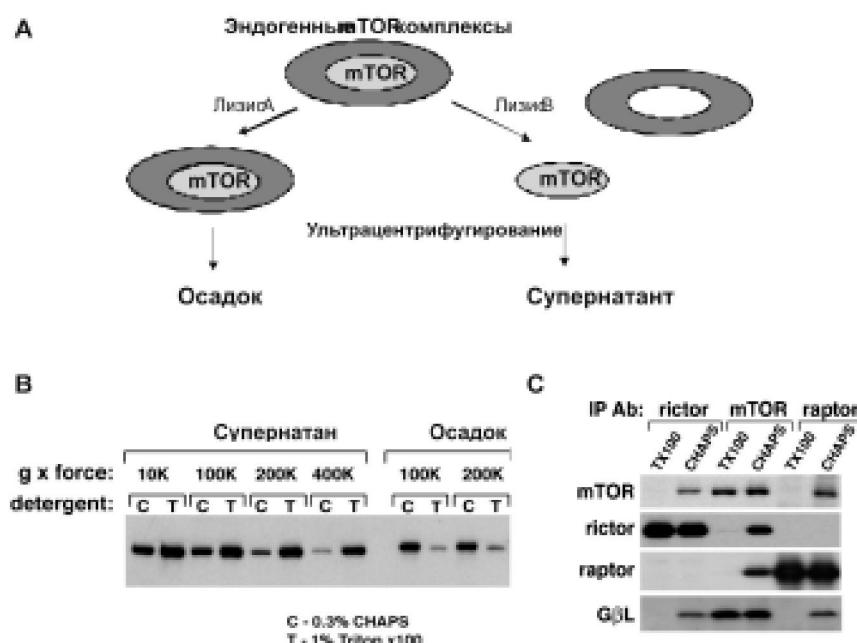
факторами, которые необходимо учитывать во время проведения очистки белкового комплекса.

Для определения молекулярной массы неизвестных комплексов нами был использован метод гель-фильтрации. Различные типы раковых клеток человека лизировались с применением стандартного лизисного буфера, содержащего либо стабилизирующий цвиттерионный детергент – CHAPS (0.3%), либо неионный детергент – Triton X-100 (1%). Triton X-100 широко известен, в то время как CHAPS довольно редко применяется и используется в основном только в экспериментах по изучению мембранных белков. При выборе последнего мы руководствовались имеющейся в литературе информацией о довольно успешном применении CHAPS для очистки mTOR из тканей головного мозга крыс. Последующее фракционирование клеточного лизата, содержащего 0,3% CHAPS с использованием гель-фильтрации показало, что mTOR присутствует во всех фракциях. К сожалению, мы не смогли использовать клеточные лизаты, полученные с применением Triton X-100 для последующего фракционирования в связи с тем, что вышеуказанный детергент значительно повышал давление в колонке. Однако мы предположили, что мультибелковый комплекс, включающий mTOR имеет большую молекулярную массу, вследствие чего возможно его осаждение ультрацентрифугированием. Поэтому нами была использована более упрощенная техника осаждения белкового

комплекса – ультрацентрифугирование (рис. 1А).

Проведенные исследования позволили нам сделать заключение, что искомый комплекс находится не в супернатанте, а в осадке, в том случае если мы использовали клеточный лизат, полученный с применением CHAPS лизисного буфера (рис. 1В). Интересным является тот факт, что при использовании Triton X-100 мы могли наблюдать совершенно противоположную картину. Это стало первой предпосылкой осознания того, что применение именно CHAPS, но не Triton X-100 для лизиса клеток позволяет сохранить целостность mTOR комплекса. Последующие наши исследования подтвердили это предположение, так как мы выяснили, что применение Triton X-100 приводит к коллапсу как mTORC1 так и mTORC2, вследствие нарушения белок-белковых взаимодействий между mTOR, раптором и риктором. Важно отметить, что при использовании CHAPS подобного эффекта не наблюдалось (рис. 1С). Только формирование комплекса между mTOR и mLST8 (Gbl) можно было детектировать при использовании обоих детергентов (Рис. 1С), так как этот относительно небольшой по своей молекулярной массе белок оказался не чувствителен к действию Triton X-100.

Следующим важным моментом для успешного осаждения белковых комплексов является использование специфических антител, способных связываться и эффективно распознавать изучаемый белок. Как правило, наиболее часто

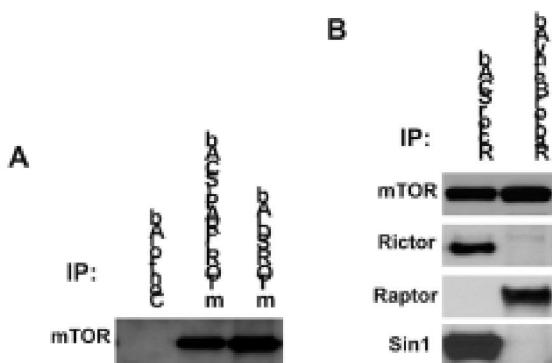


**Рис. 1.**  
Оптимизация методики выделения комплексов mTOR.  
(А) Схема осаждения mTOR методом ультрацентрифугирования;  
(Б) Результаты осаждения mTOR с использованием детергентов Triton X 100 и Chaps 0.3%, (клеточная линия HEK 293T, концентрация белка составляла 1.5 мг/мл);  
(С) Выделение mTORC1 и mTORC2 использованием детергентов Triton X 100 и Chaps 0.3% (клеточная линия HEK 293T, IP риктор, раптор и mTOR, вестерн-блот риктор, раптор, mTOR, Gbl)

используемым методом в функциональных исследованиях комплексов белков является иммунопреципитация (IP).

В процессе иммунопреципитации антитело, специфичное к данному белку, помещается в клеточный лизат и инкубируется в течение нескольких часов. По ходу инкубации антитело распознает и связывается со специфическим белком. Данный комплекс (белок/антитело) осаждается с применением агарозных гранул, содержащих белок A или G, которые способны связываться с Fc регионом IgG антител.

В предыдущих исследованиях нами были созданы два mTOR антитела, но только одно из них было эффективно как для иммунопреципитации, так и для вестерн-блотинга. Полученные антитела обладали специфичностью к mTOR в последовательности с 221 по 236 аминокислотных остатков. Последующие эксперименты показали, что иммунопреципитация с данными mTOR антителами была результативна только в клеточных лизатах, обработанных Triton X 100, но не 0.3% CHAPS. Это означает, что ввиду формирования белковых комплексов и как следствие «маскировки» вышеобозначенного эпитопа не происходит взаимодействия с антителом, следовательно, осаждение не происходит. В случае же с Triton X100 нарушается взаимодействие mTOR и компонентов комплекса, происходит связывание антител с эпитопом и осаждение белка mTOR. Последующее тестирование выявило высокую эффективность коммерческих антител (Santa Cruz Biotechnology) для иммунопреципитации при применении лизисного буфера как с

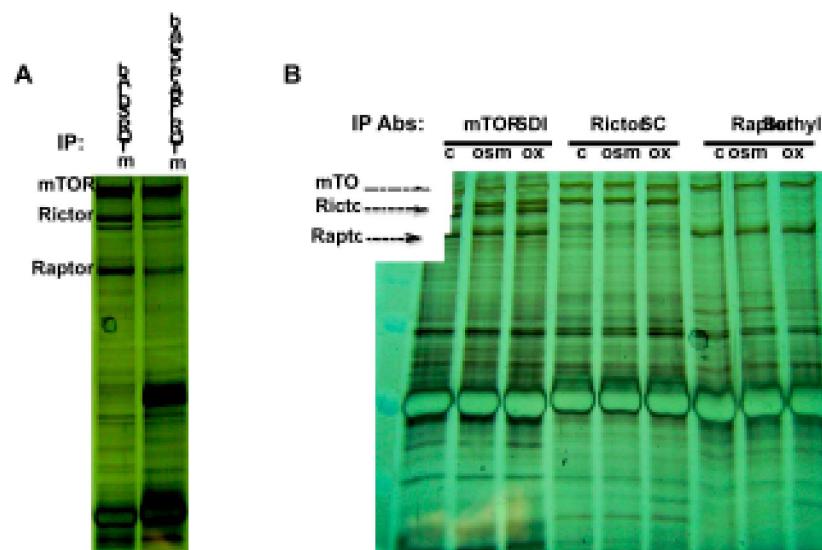


**Рис. 2.** Соосаждение компонентов mTORC1 и mTORC2.  
 (A) Вестерн-блот mTOR (клеточная линия MDA-MB-435, 0.3% CHAPS лизисный буфер, IP: sc mTOR, sdi mTOR);  
 (B) Соосаждение риктор, mTOR, Sin1 (IP: sc rictor).  
 Соосаждение раптор, mTOR (IP: bethyl raptor)

Triton X100, так и с 0.3% CHAPS. В дальнейших исследованиях с целью соосаждения mTOR и компонентов обоих комплексов нами использовались mTOR антитела, производства Santa Cruz и протестированные анти-риктор (Santa Cruz Biotechnology) и анти-раптор (Bethyl) антитела (рис. 2А и 2Б). Все вышеназванные антитела специфичны к последовательности N-терминального конца mTOR.

Как показано на рис. 2Б, иммунопреципитация анти-риктор антителами демонстрирует стабильность эндогенного комплекса TORC2, соосаждая его основные компоненты - mTOR и Sin1. Оптимизация условий лизиса клеток обеспечивает устойчивость и mTORC1 (рис. 2Б).

Как показали дальнейшие исследования, оба mTOR комплекса стабильны не только при стандартных условиях культивирования (10% FBS



**Рис. 3.**

Окрашивание серебром.

(A) Тестирование mTOR антител (клеточная линия MDA-MB-435, 0.3% CHAPS лизисный буфер, IP: scTOR, sdi mTOR).

(B) Целостность mTOR комплексов не чувствительна к условиям осмотического и окислительного стресса (с – контроль, ox – окислительный стресс, osm – осмотический стресс)

DMEM), но и в условиях стресса. С целью подтверждения данной гипотезы клетки линии MDA-MB-435 в течение 30 минут инкубировали с 0.5 М сорбитолом или 1mM перекись водорода. Затем клетки лизировали с буфером, содержащим 0.3% CHAPS. Для иммунопрепарации использовались анти-риктор, анти-раптор и mTOR антитела. Результаты сильвер стейнинга, представленные на рис. 3В, продемонстрировали, что mTORC1 и mTORC2 не чувствительны как к действию окислительного, так и осмотического стресса.

Дальнейшую очистку mTOR комплексов проводили методом аффинной хроматографии. Клетки линии HEK 293T трансфенировались FLAG mLST8, который взаимодействовал с эндогенным mTOR. Данный гетеродимер входил в состав обоих комплексов – mTORC1 и mTORC2.

Вышеизложенные методики выделения комплексов mTOR обладают высокой специфичностью и могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования mTOR сигнальной системы и функционирования mTORC1 и mTORC2 в клетках.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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. V. 110. P. 163-175.
2. Берсимбай Р.И., Булгакова О.В., Омаров Р.Т., Сарбасов Д.С. Роль mTOR сигнальной системы в регуляции клеточных функций // Доклады НАН РК. 2010. № 5. С. 82-90.
3. Feldman M.E., Apsel B., Uotila A., Loewith R., Knight Z. A., Ruggero D., Shokat K.M. Aktive-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2 // PLoS Biology. 2009. V. 7. P. 371-383.
4. Guertin D.A., Stevens D.M., Thoreen C.C., Burds A.A., Kalaany N.Y., Moffat J., Brown M., Fitzgerald K.J., 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. V. 11. P. 859-871.
5. Wang L., Harris T.E., Roth R.A., Lawrence J.C. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding // J. Biol Chem. 2007. V. 282. P. 20036-20044.
6. Peterson T.R., Laplante M., Thoreen C.C., Sancak Y., Kang, S.A., Kuehl W.M., Gray N.S., Sabatini D.M. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival // Cell. 2009. V. 137. P. 873-886.
7. Proud C. Dynamic Balancing: DEPTOR Tips the Scales // J. Mol. Cell. Bio. 2009. V. 1. P. 61-63.
8. Hay N., Sonnenberg N. Upstream and downstream of mTOR // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 1926-1945.
9. Yuan T.L., Cantley L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme // Oncogene. 2008. V. 27. P. 5497-510.
10. Martelli A.M., Tazzari P.L., Evangelisti C., Chiarini F., Blalock W.L., Billi A.M., Manzoli L., McCubrey J.A., Cocco L. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside // Curr Med Chem. 2007. V. 14. P. 2009-2023.
11. Horn S., Bergholz U., Jucker M., McCubrey J.A., Trumper L., Stocking C., Basecke J. Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells // Oncogene. 2008. V. 27. P. 4096-4106.
12. Brown E.J., Beal P.A., Keith C.T., Chen J., Shin T.B., Schreiber S.L. Control of p70S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo // Nature. 1995. V. 377. P. 441-446.

#### Резюме

Сүтқоректілердегі рапамициннің нысанасы (mTOR) жасушалардың өсүі мен пролиферациясының орталық реттеушіci mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2) мультипротеїндердің кепендері mTOR құрамына кіреді. Белсенді mTORC1 трансляция инициациясын, акуыз синтезін және жасушалардың салмағының артуын реттейтін S6K1 және 4EBP1 протеїндерін фосфорилдейді. Кептеген сигналды жолдардың өзегі ретінде болатын Akt киназа mTORC2-нің даунстрим реттеуші болып табылады. Жұмыста mTOR кепендерді тазалаудың әдістері қарастырылады.

#### Summary

The mammalian target of rapamycin (mTOR) protein is a central component of the essential and highly conservative signaling pathway that emerged as a critical effector in regulation of cell physiology. Biochemical studies defined mTOR as the protein kinase that exists at least in two distinct complexes. The first complex has been characterized as the nutrient-sensitive mTOR complex 1 (mTORC1) that regulates protein synthesis and ribosomal biogenesis by phosphorylation its well-known substrates S6K1 and 4EBP1. The second complex of mTOR (mTORC2) has been defined as the component of growth factor signaling that functions as a major regulatory kinase of Akt. Here, we provide the detailed methods how to purify the functional complexes of mTOR.