

БИОЛОГИЯ



¹ Д. Қазыкен, ² Т. Шәйкен, ² Д. Сарбасов, ¹ Р.І. Берсімбай

Субжасушалық фракциялаудың жаңа әдісі арқылы mTOR комплекстерін зерттеу

(¹ Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан)

(² Техас университеті, М.Д. Андерсон қатерлі ісік орталығы, Техас, АҚШ)

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) жасушалардағы анаболизмдік процестерді реттейтін маңызды сигнал жолының бір компоненті. Зерттеу жұмысымыздың барысында mTOR-дың субжасушалық орналасуын тексеру үшін, сүтқоректілердің жасушасын субжасушалық фракцияларға бөлдік. Субжасушалық фракцияларға жасалған биохимиялық талдаулар mTOR-дың цитоплазмада, түзбен экстрактталатын ядролық және қалдық ядролық фракциялардың барлығында кездесетіндігін көрсетті.

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) - сүтқоректілер жасушасындағы рапамициннің нысанасы. mTOR PI3K (Phosphatidylinositol 3' Kinase-related Kinases) тобына жататын серин/треонин протеинкиназаларының бірі. Ол эволюция барысында бактериядан адамға дейін өзгермей сақталған. mTOR жасушада құрылымы және функциясы жағынан бір-бірінен өзгеше екі мультипротеинді комплекс түрінде кездеседі, олар: mTORC1 (mTOR Complex 1) және mTORC2 (mTOR Complex 2) [1].

mTORC1-дің құрамына mTOR, Раптор (Regulatory Associated Protein of mTOR, Raptor) және mLST8 (mTOR Associated Protein, LST8 Homolog) кіреді. Ол рапамицинге (иммуносупрессант) сезімтал комплекс. mTORC1 транскрипция, рибосоманың биогенезі, ақуыздың синтезі, майлардың синтезі, қоректік заттарды тасымалдау, автофагия және басқа да жасушаның өсуі мен көбеюіне қатысы бар процестерді реттейді [2]. mTORC1-дің жақсы сипатталған субстраттары S6K киназасы (Ribosomal Protein S6 Kinase) және 4E-BP (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein) ақуызы. Осы субстраттар арқылы mTORC1 трансляцияны бақылайды. mTOR-дың FKBP-рапамицинмен (FK506 Binding Protein) байланысу аймағына мутация жасаған кезде mTORC1 комплексінің түзілуі тежелетіндігі және осының нәтижесінде сүтқоректілер эмбрионының жетілуіне әсер ететіндігі анықталды [3].

mTORC2 mTOR, Риктор (Rapamycin Insensitive Companion of mTOR, Rictor), mSIN1 (Mammalian SAPK-interacting Protein 1), mLST8, және PRR5/PRR5L (Pro-rich Protein 5) ақуыздарынан түзіледі [4]. Ол рапамицинге сезімтал емес комплекс болып табылады. Алайда, кейбір жасуша түрлерін рапамицинмен ұзақ уақыт өңдегенде, mTORC2-нің қызметін жанама жолмен тежейтіндігі дәлелденді. mTORC2 Akt (Protein Kinase B), SGK1 (Serum and Glucocorticoid Induced Kinase 1) киназаларын фосфорлау арқылы белсендіреді және PKC (Protein Kinase C) киназасын да белсендіруі мүмкін. mTORC2 Akt арқылы жасушаның тіршілігін сақтауға көмектесіп, актин цитоскеletonының түзілуіне медиатор болып табылады [5].

mTOR комплекстері қоректік заттар, өсу факторлары, стресс және энергия статустарынан келетін сигналдарға жауап ретінде жасуша апоптозы, метаболизм, өсуі мен көбеюі сияқты процестерін реттейді [6].

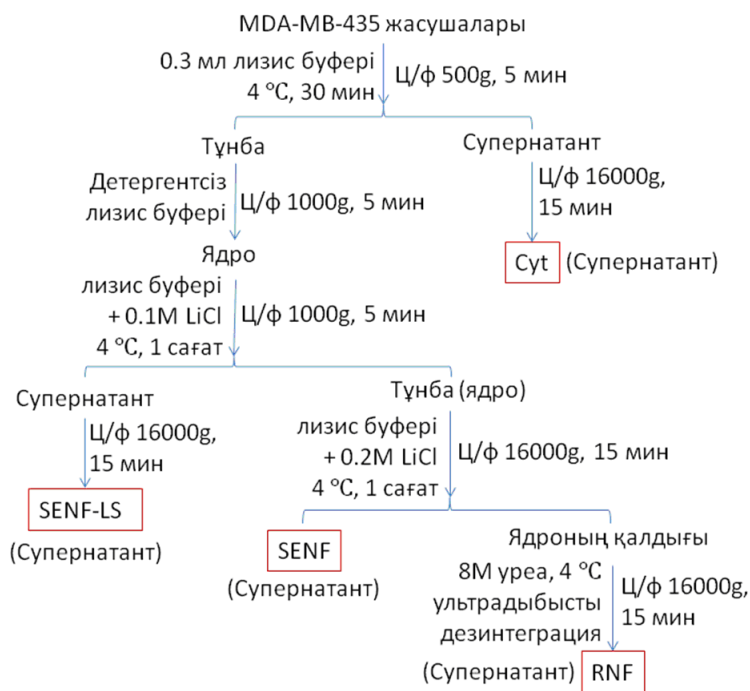
Соңғы кезде mTOR протеинкиназасының қызметіне байланысты адамдарда көптеген аурулардың пайда болуы және дамуына үлкен назар аударылуда. mTORC1-дің белсенділігінің жоғарлауы көптеген биологиялық процестер арқылы жасушалардың өсу мүмкіндігін арттырады. Осының нәтижесінде көлемі ірі және жылдам өсетін жасушалар құрылымының өзгерісі арқылы ісіктерді қалыптастырады [7].

Жасушадағы mTOR сигнал жолдарының жан-жақты зерттеліп жатқанына қарамастан, оның төменгі ағындық реттеуі, mTOR-дың жоғары ағындық белсендіруші сигнал жолдарының арасындағы өзара байланыстар толықтай ашылмаған күйінде қалып отыр [8].

Кейінгі зерттеулер mTOR протеинкиназасының жасуша ішіндегі митохондрия [9], нерв жасушаларының мембранасы [10], жасуша ядросы [11], эндоплазмалық тор [12] және Гольджи аппараты [13] сияқты органоидтарында болатындығын көрсетті. Алайда, ғалымдар mTOR-ды зерттеу барысында жасушаларды субфракцияларға болмей, тек тұтас жасуша лизаты ретінде ғана қарастырып келді. Тұтас жасуша лизатында mTORC1 мен mTORC2-нің концентрациясы өте жоғары болғандықтан ондағы концентрациясы томен басқа комплекстердің анықталуына кедергі болып келді. Сондықтан біздің бұл жұмысымызда ядроны негіз ете отырып жасушаларды бірнеше субфракцияларға бөлдік. Ол өз кезегінде mTOR-дың қай түрі (mTORC1 және mTORC2) осы аталған субжасушалық құрылымдарда кездесетіндігін және mTOR-дың белгілі екі комплекстерінен басқа жаңа комплекстерін анықтауда маңызы зор болып табылады.

Материал және әдістер

Жасушаларды өсіру. MDA-MB-435 жасушалары 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 20мМ L-глутамин, 100 бірлік/мл (unit/ml) пенициллин-стрептомицин қосылған DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) қоректік ортасында, 5% CO₂, 37 °C температурасы жағдайында өсірілді.



Сурет 1.- MDA-MB-435 жасушаларын субфракциялау барысының схемасы

Жасушаларды субфракциялау. MDA-MB-435 жасушалары төмендегідей субфракцияларға бөлінді: Cyt (Cytoplasm- цитоплазмалық фракция), SENF (Salt Extractable Nuclear Fraction - тұзбен экстрактталатын ядролық фракция), SENF-LS (Salt Extractable Nuclear Fraction-Low Salt - концентрациясы төмен тұзбен экстрактталатын ядролық фракция), RNF (Residual Nuclear Fraction- қалдық ядролық фракция).

Алдымен өсіру табақшаларындағы MDA-MB-435 жасушалары салқын PBS буффермен шайылды. Аз көлемдегі (жасушалар 90% өсірілген 150 мм ұлпа өсіру табақшасы үшін 0.3 мл лизис буфері) лизис буфферімен (40мМ Hepes pH7.5, 160мМ KCl, 2.5мМ EGTA, 2.5мМ EDTA, 0.5% глицерол, 0.5% NP-40) эппендорф пробиркаларына жинап алып, +4 °C температурада

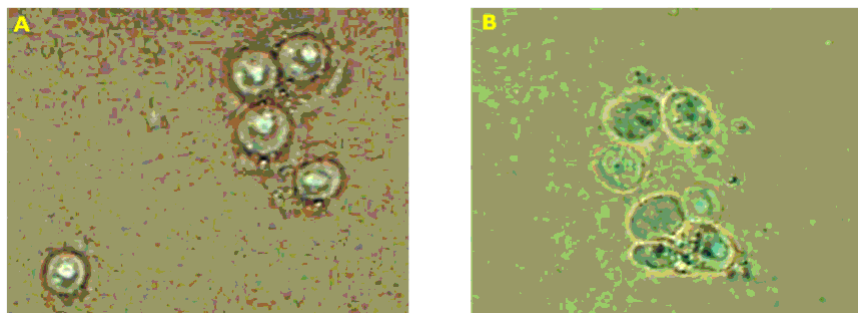
30 минут шайқалды. Лизат +4 °С температурада 500g, 5 минут центрифугаланып, ядро тұнбаға түсіріліп алынды. Супернатант 16000g, 10 минут центрифугаланды, оның супернатанты жинап алынып, "Cyt" деп аталды. Алынған тұнба 0.1% NP-40 қосылған лизис буфферімен шайылып, 1000g, 5 минут центрифугаланды. Концентрациясы төмен тұзбен экстрактталатын ядролық фракциясын бөліп алу үшін, ядроға 0.1M LiCl қосылған лизис буффері құйылып, +4 °С температурада, 1 сағат шайқалғаннан кейін, 16000g, 15 минут центрифугаланып бөлінді. Супернатант "SENF-LS" ретінде сақталды. Содан кейін SENF - ті бөліп алу үшін, тұнба 0.2M LiCl қосылған лизис буфферімен +4 °С температурада 1 сағат инкубацияланып, 16000g, 15 минут центрифугаланды, жинап алынған супернатант "SENF" деп аталды. Центрифугада тұнбаға түскен, бұзылмаған ядроны 8M несеп (Urea) буфферінде, ультрадыбысты десинтегратордан (XL2000, Microson) өткізгеннен соң, 16000g, 15 минут центрифугаланып, супернатанты "RNF" ретінде алынды (Сурет 1).

SDS-PAGE. Электрофорез жасалатын жасушаның субфракциялық сынамалары 4X сынаманы өңдеу буфферімен (50mM Tris-HCl pH6.8, 10% глицерин, 2% SDS, 100mM β -меркаптоэтанол, 0.01% бромфенол) 95 оС температурада 5 минут өңделіп, денатурацияланды. Сынамалардың 20 мкг (иммунопреципитация үлгісінен 15 мкл) мөлшері және ақуыздардың молекулалық маркері электрофорез геліне енгізілді. Электрофорез Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) камерасында, алғашқы 10 минутта 120 В, одан кейін аяқтағанға дейін 200 В кернеумен жүргізілді.

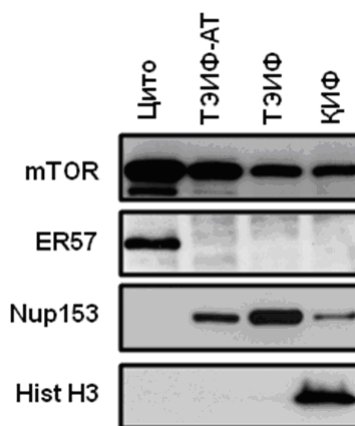
Иммуноблоттинг. PVDF (Millipore) мембранасы қолданудан бұрын этанолмен 50 секунд өңделді. SDS-PAGE электрофорез гелінде бөлінген ақуыздарды мембранаға көшіру үшін Trans Blot Cell (Bio-Rad) блоттинг камерасында CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) буффері (10mM CAPS, 10% этанол, pH 11) қолданылды. Көшіру 0.45А тоқ күшінде 3 сағатта жүргізілді. Көшірілгеннен кейін, қажетті антиденелерді қолдана отырып, PVDF мембранасына иммуноблоттинг талдауы жасалды.

Нәтиже және қорытынды

MDAMA-435 жасушасын цитоплазмалық және ядролық суб-фракцияларға бөлуге изотонды буффер қолданылды. Фракциялау барысында ядро қабықшасы бұзылмай, оның сыртқы және ішкі осмостық балансы сақтала отырып, ядро тұтас күйінде бөліп алынды, содан кейін ядро әрі қарай субфракцияланды. Алдымен аз мөлшердегі детергентті лизис буфферімен өңдеп, цитоплазмалық фракцияны бөліп алғаннан кейін, детергентсіз лизис буфферімен бір рет жылдам жуып, ядроны цитоплазмалық фракцияның қалдықтарынан тазартып алдық. Ядроны субфракциялау үшін алдымен концентрациясы төмен тұзды буфферді (0.1M LiCl қосылған лизис буффері) қолдана отырып, ядролық ақуыздарды экстракциялағаннан кейін, оны центрифугалап, экстракт бөлініп алынды. Бұл фракция концентрациясы төмен тұзбен экстрактталатын ядролық фракция (SENF-LS) деп аталды. SENF-LS фракциясы алынғаннан кейінгі тұнбаға (ядро) 0.2M LiCl қосылған лизис буффері қосылып өңделген соң, центрифугаланып, супернатанты SENF ретінде жинап алынды. Жасалған тәжірибе нәтижесінде цитоплазманы бөліп алғаннан кейін, ядро ақуыздарын аз көлемді (изотонды) тұзды буффермен екі рет экстракцияласа да, ядро қабықшасы бұзылмай құрылымын сақтап, ядроның қабықшасының ішіндегі хромосома тұтас күйінде сақталатындығын көрсетті (Сурет 2). Ядро қабықшасы интерфазаларының ақуыздарын және ядролық ақуыздарды тұзбен экстракциялағаннан кейінгі қалған ядроға несеп буфферін қоса отырып, ультрадыбысты десинтегратор арқылы қалдық ядролық фракциясы (ҚИФ) алынды. Бұл алынған фракциялардың тазалығын, дәлдігін, яғни, олардың компоненттерінің бір-біріне өтіп кетпегендігін иммуноблоттинг талдауы арқылы дәлелдедік.



Сурет 2.- Ядроның ақуыздарын LiCl тұзы арқылы экстракциялағаннан кейінгі ядроның инвертті микроскоптағы суреті: А. 0.1M LiCl қосылған лизис буферімен SENF-LS экстрактталып алынғаннан кейінгі ядроның қалдығы; В. 0.2M LiCl қосылған лизис буферімен SENF экстрактталып алынғаннан кейінгі бұзылмай сақталған ядро



Сурет 3. - MDAMA-435 жасушасын цитоплазмалық және ядролық суб-фракцияларының иммуноблоттинг талдауы. mTOR жасушаның барлық субфракцияларынан анықталды. Цитоплазмалық маркер ER57 цитоплазмалық фракциядан ғана табылды. Ядро мембранасының нуклеолаздық интерфазасында орналасқан Nup153-тің көп бөлігі SENF-LS және SENF фракцияларында айқын көрініп, RNF фракцияларында өте аз мөлшерде байқалды, ал цитоплазмалық фракциядан табылған жоқ. Ядролық ақуыз Hist H3 тек қалдық ядролық фракцияда ғана анықталды

Иммуноблоттинг талдауы бақылау ретінде қолданылған бұрыннан белгілі цитоплазмалық маркер ER57 (Endoplasmic Reticulum 57), ядро қабықшасының маркері Nup153 (Nucleoporin153), ядролық маркер Hist H3 (Histone H3) арқылы жасушалық субфракциялардың өзара араласпай, таза күйінде алынғандығын көрсетті (Сурет 3).

mTOR протеинкиназасы жасушаның барлық цитоплазмалық және ядролық фракцияларында табылды. Оның ең көп бөлігі цитоплазмада болып, ең аз мөлшері ядроға, ал ядро мембранасында ядроға қарағанда көбірек болды. Бұрынғы зерттеулерде mTORC1 және mTORC2 комплекстері негізінен жасушаның цитоплазмасында орналасқандығына байланысты mTOR-дың тек цитоплазмадағы функциясы зерттеліп келді. Алайда, біздің зерттеу нәтижеміз көрсеткендей, mTOR-дың бір бөлігі ядро қабықшасының интерфазаларында және ядро ішінде орналасады. Алынған зерттеу нәтижелері mTOR-дың SENF және RNF фракцияларында mTORC1, mTORC2-ден басқа жаңа комплексінің бар немесе жоқтығын анықтауға, сонымен қатар оның функциясын зерттеуге мүмкіндік береді.

ӘДЕБИЕТТЕР

1. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sabatini, D.M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* (2005); 17: 596-603.
2. Берсімбай Р.И., Булгакова О.В., Омаров Р.Т., Сарбасов Д. Роль mTOR сигнальной системы в регуляции клеточных функций. Доклады НАН РК (2010); 5, с. 82-90.
3. Shaikenov T., Bulgakova O.V., Bersimbay R.I., Sarbassov D.D. Isolation of the mTOR Complexes by Affinity Purification. "mTOR : Methods and protocols" *Methods in Molecular Biology*, USA, 2012, 821: 59-74.

4. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology* (2004); 14: 1296-1302.

5. 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); 307: 1098-1101.

6. Булгакова О.В., Берсимбаев Р.И., Сарбасов Д.С. Регуляция mTOR сигнального пути. Материалы 15 международного курса Александра Холлендера: Взаимодействие генома и окружающей среды, генетическая токсикология (2009); С. 69-70.

7. Laplante M., Sabatini D. mTOR signaling at a glance. *J. of Cell Science*. 2009, 122: 3589-3594

8. Yang Q., Guan K.L. Expanding mTOR signaling. *Cell Research* (2007) 17: 666-681.

9. Desai, B.N., Myers, B.R., et al. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002); 99: 4319-4324.

10. Sabatini, D.M., Barrow, R.K., et al. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signalling. *Science* (1999); 284: 1161-1164.

11. Zhang, X., Shu, L., et al. Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J. Biol. Chem.* (2002); 277: 28127-28134.

12. Drenan, R.M., Liu, X., et al. FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* (2004); 279: 772-778.

13. Withers, D.J., Ouwens, D.M., et al. Expression, enzyme activity and subcellular localisation of the mammalian target of rapamycin in insulin-responsive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998); 241: 704-709.

Казыкен Д., Шайкен Т., Сарбасов Д., Берсимбай Р. И.

Исследование mTOR комплекса новым методом субклеточной фракции

mTOR - один из компонентов основного сигнального пути, регулирующий анаболические процессы в клетках. С целью показать субклеточную локализацию mTOR в нашем исследовании мы разделили клетку млекопитающих на фракции. Биохимический анализ субклеточных фракций показал, что mTOR локализован в цитоплазме, в ядерной фракции, экстрагируемой солью, и во всех остаточных ядерных фракциях.

Kazyken D., Shaiken T., Sarbassov D., Bersimbay R. E.

Study of the mTOR complexes by the new subcellular fractionation method

mTOR is a central component of the essential signaling pathway that controls anabolic processes in cells. In our study, in the purpose of show the sub-cellular localization of mTOR, we have performed a sub-cellular fractionation for mammalian cells. Biochemical analysis of the purified sub-cellular fractions revealed that mTOR is extractable from nuclei by the salt containing buffers and we marked the extracts as SENF and SENF-LS, As well as in residual nuclear fraction (RNF) with smaller amount.

Редакцияға 26.04.2012 қабылданды

Басылымға 30.05.2012 жіберілді