

TOR-ЦЕНТРИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ РЕГУЛЯЦИИ МИТОГЕННЫХ, МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКЕ

© С. Г. Зубова,^{1,2} Ж. В. Шитикова,^{1,2} Т. В. Поспелова^{1,2}

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и ² С.-Петербургский государственный университет;

¹ электронный адрес: egretta_julia@mail.ru

Киназа TOR (target of rapamycin), открытая как мишень действия антибиотика рапамицина, — это консервативная серин-треониновая киназа, которая интегрирует многочисленные вне- и внутриклеточные сигналы, регулируя клеточный рост, синтез белка и метаболизм. Киназа mTOR млекопитающих существует в виде двух комплексов: рапамицин-чувствительного TORC1 и рапамицин-устойчивого mTORC2, контролируемых в клетке разными программами. Идентификация mTOR как интегрального компонента сигнального пути PI3/АКТ, который deregулирован в ходе канцерогенеза, а также существование перекреста между тумор-супрессорным p53-каскадом и mTOR говорят о ее уникальной роли в процессе неопластического роста. В настоящем обзоре рассматриваются различные аспекты регуляции киназы mTOR, взаимосвязь киназы с основными сигнальными каскадами клетки и использование ее как мишени при лечении рака, диабета, ожирения, нейродегенеративных изменений и наследственных синдромов старения.

Ключевые слова: TOR, старение, рапамицин, опухолевый рост.

Несмотря на активное изучение mTOR в течение последних 10 лет, мы только начинаем понимать всю сложность сигнальных взаимодействий, которые она регулирует. Открытие антибиотика рапамицина и выявление его основной мишени у дрожжей и млекопитающих — TOR (target of rapamycin) — имеет фундаментальное значение для выяснения молекулярных механизмов канцерогенеза и его терапии. Киназа млекопитающих mTOR — мишень рапамицина — является центральным регулятором пролиферации за счет интеграции сигналов от ростовых факторов, питательных веществ и уровня энергии. Киназа mTOR существует в виде двух различных белковых комплексов — mTORC1 и mTORC2. Канонический рапамицин-чувствительный комплекс mTORC1 известен как основной регулятор белкового синтеза и роста клеток. Активация PI3K/АКТ-пути приводит к активации mTORC1 за счет инактивации путем фосфорилирования комплекса белков туберозного склероза (TSC1—TSC2), главного репрессора mTORC1. Обнаружено, что недавно открытый комплекс mTORC2 способен активировать фосфорилированием киназу АКТ — ключевой регулятор роста клеток, выживания и метаболизма. Выявление mTOR как основной мишени PI3K/АКТ-сигнального пути вместе с растущим числом данных о deregуляции его в случае рака различного генеза у человека говорит о необходимости еще более пристального изучения mTOR-каскада для разработки новых стратегий терапии рака.

Задачей настоящего обзора было описание той роли, которую играет mTOR в опухолегенезе, клеточном старении, аутофагии, энергетике клетки и продолжительности жизни особи.

Основные функции киназы mTOR

Превращение нормальной клетки в опухолевую сопровождается сменой путей передачи сигналов из внешней среды. Уникальным свойством опухолевых клеток является их способность к автономной пролиферации при слабой зависимости от поступления ростовых факторов, аминокислот и глюкозы (Weinberg, 1995). Это приводит к тому, что клетка получает в организме селективные преимущества и, размножаясь бесконтрольно, убивает носителя опухоли. Открытие группы генов, которые получили название протоонкогенов, а также генов опухолевых супрессоров было важным моментом в понимании молекулярных основ онкогенеза (Weinberg, 1995). Оказалось, что белковые продукты онкогенов и опухолевых супрессоров являются интегральными компонентами многочисленных сигнальных путей передачи сигналов от ростовых факторов, контролируемых пролиферацию нормальных клеток (Копнин, 2000). Превращение протоонкогенов в онкогены путем соответствующих мутаций приводит, таким образом, к активации или инактивации разнообразных путей передачи сигналов, лежащих в основе автономной пролиферации клеток.

Кроме независимости опухолевых клеток от ростовых факторов было обнаружено, что они имеют принципиально другой тип метаболизма, который характеризуется высокой эффективностью производства энергии в клетках. Этот тип метаболизма получил название аэробного гликолиза и известен как эффект Варбурга (Warburg, 1924). После длительного периода неполного понимания его важности для процесса канцерогенеза его начали ак-

тивно исследовать как возможную мишень для противоопухолевого действия различных агентов.

Интересна история открытия серин-треониновой киназы mTOR. Сначала был обнаружен антибиотик рапамицин из бактерии *Streptomyces higroscopicus*, обитающей в почвах о-ва Рапа Нуи, входящего в архипелаг о-вов Пасхи (Vezina et al., 1975), а в 1991 г. был обнаружен белок, активность которого он подавляет. Этот белок был назван TOR (Heitman et al., 1991). Первоначально рапамицин был использован как препарат для лечения грибковых заболеваний, а затем вошел в клиническую практику в качестве средства, предотвращающего отторжение трансплантата и облегчающего аутоиммунные заболевания (Bierer et al., 1991; Sehgal, 2003). Позднее было обнаружено, что рапамицин обладает противоопухолевыми свойствами и подавляет метастазирование (Eng et al., 1984; Guba et al., 2002). В настоящее время известно, что в опухолевых клетках активность TOR повышена и что происходит переключение внутриклеточных сигнальных путей, связанных с работой этой киназы. TOR вовлечена в контроль за процессами дифференцировки, старения, апоптоза и аутофагии (Guertin, Sabatini, 2007). Хотя функции mTOR еще недостаточно изучены, уже ясно, что mTOR является центральным компонентом сложной сигнальной сети, которая регулирует размер клеток, их пролиферацию, размер животного и продолжительность его жизни (Oldham et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Первый комплекс киназы mTORC1 чувствителен к рапамицину и уже известен как основной регулятор синтеза белка и размера клетки. В этом комплексе mTOR ассоциирована с высококонсервативным белком Раптор (regulatory associated protein of mTOR) и белками LST8, FKBP38, DEPTOR и PRAS40. Киназа АКТ/ПКВ стимулирует mTOR путем фосфорилирования димера, образованного продуктами опухоли-супрессорных генов туберозного склероза TSC1—TSC2, который в свою очередь негативно регулирует активность комплекса mTORC1. Это приводит к прямому фосфорилированию рибосомных киназ S6 (S6K1 и S6K2), а также белков 4E-BP1 и 4E-BP2, ингибирующих факторы инициации элонгации. Это фосфорилирование стимулирует трансляцию мРНК, пролиферацию и клеточный рост (Sarbasov et al., 2005).

В клетках млекопитающих киназа TORC1 активируется аминокислотами, несущими заряд (аргинином, глутамином, гистидином и лизином), и нейтральными (лейцином, фенилаланином, триптофаном, тирозином и валином) (Fox et al., 1998). Таким образом, этот белок может функционировать как чувствительный элемент, определяющий уровень аминокислот в клетке многоклеточного организма (Oldham et al., 2000).

Второй mTOR-содержащий комплекс mTORC2 включает в себя белок Риктор (rapamycin-insensitive companion of mTOR) и белки LST8, SIN1, DEPTOR и PROTOR (Sarbasov et al., 2005). Функции mTORC2 выявляются с помощью высокоспецифического ингибитора mTORC1 рапамицина. Комплекс mTORC2 фосфорилирует АКТ по Ser473, а также ПКCa (протеинкиназа Ca). Эти киназы вместе с киназой S6K принадлежат к классу AGC-киназ семейства PI3K. Таким образом, оба комплекса mTOR фосфорилируют киназы семейства AGC. Киназа S6K1 фосфорилирует рибосомальный белок S6, функции которого недостаточно ясны, но по степени фосфорилирования S6 часто определяется активность mTORC1 (Sarbasov et al., 2005). Применение рапамицина приводит к подавлению активности mTORC1 и связыванию ре-

прессора трансляции 4E-BP1 с фактором инициации элонгации eIF4E, в результате чего подавляется синтез белка. Фактор инициации элонгации eIF4E имеет онкогенную природу (Graff et al., 2007; Mamane et al., 2007). В процессе онкогенеза инициация трансляции становится неконтролируемой. Этот фактор способен менять весь набор транслируемых на рибосомах мРНК, в результате чего в ходе онкогенеза транслируются мРНК, активирующие развитие опухоли (Graff et al., 2007). В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что применение рапамицина может быть успешным для терапии опухолей (Graff et al., 2007). Однако согласно литературным данным, большинство опухолей слабо чувствительны к рапамицину (Huang, Houghton, 2001).

Обобщая имеющиеся в литературе данные, можно сказать, что активность комплекса mTORC1 определяет рост клеток (их размер) в ответ на поступление аминокислот, ростовых факторов и изменение энергетического ресурса. Под контролем mTORC1 находятся процессы трансляции, транскрипции, биогенеза рибосом и аутофагии (Guertin, Sabatini, 2007). Комплекс mTORC2 модулирует клеточную пролиферацию и выживание, фосфорилируя и активируя АКТ/ПКВ, ПКС и GSK1 (сывороточная глюкокортикоид-индуцибельная протеинкиназа 1). Кроме того, mTORC2 регулирует организацию актинового цитоскелета (Jacinto et al., 2004).

Взаимосвязь опухоль-супрессорного пути p53 и mTOR-каскада

Значимость гена *mtor* в развитии онкологических заболеваний стала очевидной после открытия его взаимосвязи с работой опухолевого супрессора p53 (Feng et al., 2005). Известно, что после генотоксического стресса p53 активируется и индуцирует альтернативные события в клетке — блок клеточного цикла (check point control) для эффективной репарации повреждений, апоптоз, если повреждения носят множественный характер, или клеточное старение. В случае генотоксических стрессов активация p53, являющегося транскрипционным фактором, приводит к транскрипции четырех генов, которые контролируют активность каскада mTORC1. К их числу относятся гены *pten*, *igf-1-bp3*, *tsc-2* и ген бета-субъединицы киназы AMP, которые контролируют работу разветвленного TOR-каскада через разные пути. При этом создается такая сеть сигнальных путей, которая позволяет клетке преодолеть стресс или нарушение геномной стабильности за счет блока клеточного цикла, исключения синтеза белка и повышения антиапоптотической активности. Следовательно, в случае мутаций p53, когда он не способен снять действие позитивных регуляторов, киназа mTORC1 может оставаться активированной, вызывая нарушение процессов, координирующих нормальный клеточный гомеостаз.

Опухолевый супрессор p53, контролируя процессы апоптотической гибели и предотвращая размножение генетически дефектных клеток, выступает как хранитель геномной стабильности, однако в определенных случаях может запускать программу старения. Это происходит в том случае, когда блок клеточного цикла не отменяется, клетка не делится, активность mTOR остается высокой и начинается гипертрофический рост клеток, который является одним из маркеров клеточного старения (Sugrue et al., 1997).

Активация p53 приводит к ингибированию mTOR через те же сигнальные пути, которые работают в случае нехватки энергии: происходят активация киназы AMP и последующая активация комплекса TSC1—TSC2. Индукция аутофагии также служит неотъемлемой частью опухоли-супрессорного действия p53 (Feng et al., 2005). Таким образом, активация p53 негативно регулирует IGF-1/mTOR-зависимый клеточный рост и клеточную пролиферацию, но при этом позитивно регулирует апоптоз и аутофагию.

Взаимосвязь киназ mTOR, PI3K и АКТ/ПКВ

Нарушение регуляции серин-треониновой киназы АКТ/ПКВ выявляется в опухолях различной этиологии (Vivanco, Sawyers, 2002). Активация АКТ/ПКВ зависит от фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) 1-го класса, которая активируется рецепторными тирозинкиназами и G-связывающими рецепторами (O'Reilly et al., 2006). PI3K производит вторичный липидный мессенджер PtdIns(3,4,5)P₃, который прямо связывается с АКТ/ПКВ и киназой, зависимой от фосфоинозиотида PDK1, что приводит к перемещению этих киназ к плазматической мембране (Corradetti, Guan, 2006). После этого события PDK1 фосфорилирует АКТ/ПКВ по Thr308, однако для полной активации АКТ/ПКВ необходимо фосфорилирование киназы по Ser473, которое осуществляется mTORC2 (Corradetti, Guan, 2006). Будучи активированной, АКТ/ПКВ фосфорилирует многочисленные белки, вовлеченные в клеточную пролиферацию, метаболизм и клеточный рост (размер клеток). Одной из мишеней АКТ/ПКВ является сама киназа mTOR, которая также является членом семейства киназ, связанных с фосфатидил-инозитолом (PIKK). Собственно мишенью АКТ/ПКВ является белок TSC2, фосфорилирование которого меняет активность комплекса TSC1—TSC2, влияющего на ГТФазу Rheb, которая контролирует активность mTORC1 (Huang, Manning, 2008). Активация mTORC1 приводит к фосфорилированию киназ S6K1,2, которые формируют петлю негативной регуляции, подавляя активность субстрата IRS-1 (Corradetti, Guan, 2006), разобщая IRS и PI3K и, как следствие, редуцируя активность PI3K-каскада (Foster, Fingar, 2010). Существование этой петли негативной регуляции mTORC1/S6K1 ведет к состоянию инсулиновой резистентности, а нокаут S6K1 у мышей повышает их чувствительность к инсулину. Кроме того, S6K1 фосфорилирует белок Риктор по Thr1135, что приводит к уменьшению активности mTORC2 (Julien et al., 2010). Таким образом, петля mTORC1/S6K1 оперирует по крайней мере в двух направлениях, супрессируя PI3K и mTORC2.

Кроме того, сигнальную цепь от рецептора инсулина до S6K1 негативно регулирует опухолевый супрессор PTEN, который часто мутирован или делетирован в опухолях разных типов, в том числе в глиобластоме, при раке эндометрия и простаты (Keniry, Parsons, 2008). PTEN — липидная фосфатаза (фосфатаза киназ), которая является антагонистом функции PI3-киназы. Утрата функционально активной PTEN приводит к повышению активности АКТ/ПКВ за счет повышения жизнеспособности клеток, а также стимуляции клеточной пролиферации (Steelman et al., 2011).

Интересно, что применение рапамицина приводит к фосфорилированию субстрата инсулинового рецептора IRS-1, что усиливает инсулиновый сигналинг и активирует киназу PI3 и АКТ/ПКВ (Shi et al., 2005). Таким образом, включается важный антиапоптотический каскад. Недавно было показано, что в клетках, обработанных рапамицином, увеличивается чувствительность PI3K/АКТ-пути к инсулину, что позволяет предполагать участие киназы mTORC1 в ингибировании инсулинового пути в нормальных клетках. Влияние mTORC1 на инсулиновый путь предполагалось ранее, однако наиболее ясно этот эффект виден в нокаутных клетках, где комплекс TSC1—TSC2 отсутствует, и повышенная активность mTORC1—S6K1 ведет к сильному ослаблению способности PI3K активироваться инсулином и белками IRS1,2 (Manning et al., 2005). В нормальных клетках это влияние mTORC1 на PI3K- и АКТ-каскады служит негативной петлей обратной связи, которая лимитирует работу АКТ/ПКВ-каскада, однако в клетках с конститутивной активацией mTORC1 (в частности, в отсутствие функционального комплекса TSC1—TSC2) эта негативная петля конститутивно ингибирует АКТ-каскад и его мишени, вовлеченные в процесс клеточного выживания и пролиферации (Manning et al., 2005).

Так, показано, что семейство транскрипционных факторов FOXO (forkhead box O), которые могут вызывать апоптоз или блок клеточного цикла в зависимости от эпигенотипического контекста, обычно ингибируются за счет АКТ/ПКВ-опосредованного фосфорилирования и выхода из ядра (Zhang et al., 2011). Однако эти же FOXO-белки не фосфорилируются и остаются в ядре даже при действии ростовых факторов в опухолевых клетках или в опухолях у мышей, где комплекс TSC1—TSC2 отсутствует (Harvey et al., 2008). В большинстве случаев, когда ген *tsc* разрушен, длительная обработка клеток рапамицином отчасти восстанавливает способность инсулина стимулировать сигнальный путь PI3K/АКТ (Harrington et al., 2004). При этом siRNA против Раптора делает то же самое, что указывает на mTORC1 как на главный регулятор этого процесса (Shah, Hunter, 2006).

Исследования негативной регуляции mTOR изменили взгляды на участие регуляторных процессов в клеточном старении и их влиянии на продолжительность жизни особей. Известно, что нарушение клеточных сигнальных путей, регулирующих активацию рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-I) у *Caenorhabditis elegans* и дрозофилы, приводит к увеличению продолжительности жизни (Dorman et al., 1995; Hwangbo et al., 2004). Применение рапамицина также увеличивает продолжительность жизни этих особей (Jia et al., 2004; Karahi et al., 2004). У грызунов продолжительность жизни регулируется через гипоталамо-гипофизарный тракт и зависит от уровня IGF-I. При исследовании мышей с поврежденным аллелем гена *igf-I* было установлено, что они имеют уменьшенный размер, но фертильны и жизнеспособны. При анализе скорости роста было выявлено, что такие мыши имеют нормальную массу при рождении, но отстают в постнатальном развитии. Изучение продолжительности жизни таких особей позволило установить, что самки в 18 % случаев живут дольше, однако продолжительность жизни самцов не меняется (Sell et al., 2007). Продолжительность жизни у мышей регулирует и рецептор IGF-I. Гомозиготные нокауты по этому гену нежизнеспособны, а гетерозиготные мыши живут в среднем на 26 % дольше их диких сородичей. Масса тела гетерози-

готных мышей через 20 сут после рождения была на 8 % меньше, чем у их диких сверстников (Holzenberger et al., 2003).

У многоклеточных организмов за энергетический гомеостаз и рост клеток отвечают инсулин и IGF-сигнальная система (Efstratidis, 1998). Инсулин и IGF активируют две главные ветви сигнальных каскадов: Ras/MAPK-путь, который отвечает за пролиферацию, и PI3K-путь, который отвечает за клеточный рост, выживание и метаболический гомеостаз. PI3K осуществляет сигналинг путем продукции PIP3, который действует как активатор АКТ/ПКВ. В свою очередь путь PI3K/АКТ и путь Ras/Raf/ERK активируют TORC1 (Shaw et al., 2006). На TORC1 сходятся сигнальные пути двух противоположных процессов. Все митогенактивируемые пути, такие как Ras, Raf-1 и B-Raf, которые индуцируют пролиферацию, одновременно могут индуцировать клеточное старение и активировать TORC1-сигнальный путь (Blagosklonny, 2006). Кроме того, путь PI3K-mTORC1 активирован в опухолях многих типов и является важным компонентом трансформированного фенотипа (Katso et al., 2001).

Киназа mTORC2 фосфорилирует АКТ/ПКВ, которая способствует трансформации клеток путем фосфорилирования множества субстратов, в первую очередь транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к подавлению апоптоза и усилению клеточной пролиферации (O'Reilly et al., 2006). Таким образом, АКТ/ПКВ как главный эффектор PI3K-пути служит одновременно активатором mTORC1 и субстратом для mTORC2 (Guertin; Sabatini, 2007). Комплекс mTORC1 фосфорилирует и активирует S6K1 и инактивирует ингибиторы инициации трансляции 4E-BP1,2, активируя, таким образом, синтез белка. Активация трансляции способствует быстрой пролиферации, увеличивая уровень транскрипционных факторов с высоким оборотом, например таких как Hif1, который индуцирует метаболические изменения, ведущие к аэробному гликолизу, индуцирует ангиогенез (Bernardi et al., 2006) и экспрессию онкогена *c-myc* (Schmidt, 1999).

Многие исследования указывают на активацию mTORC1 в опухолях, хотя остается неясно, какие компоненты белкового комплекса (сама mTOR или Раптор) играют главную роль в трансформации клеток (Sarbasov et al., 2005). Рапамицин, который обладает, как считается, противоопухолевыми свойствами, блокирует преимущественно активность mTORC1, но есть данные о том, что он затрагивает также сборку комплекса mTOR2 (Sarbasov et al., 2006). Действие рапамицина, его проапоптотические и противоопухолевые эффекты подавлены в клетках, экспрессирующих мутантную АКТ/ПКВ, или в клетках с делецией гена *pten*, который, будучи фосфатазой, отвечает за дефосфорилирование и инактивацию АКТ/ПКВ. Такие клетки резистентны к рапамицину (Sarbasov et al., 2006). Можно предположить, что длительное действие рапамицина увеличивает фосфорилирование АКТ, что поддерживает пролиферацию клеток (O'Reilly et al., 2006). При этом клетки не только начинают делиться, но и исчезает гипертрофия, свойственная старению. Кроме того, в этом случае можно говорить о замедлении процесса старения рапамицином. Действие рапамицина сопровождается появлением пула мелких клеток, способных к пролиферации (Demidenko et al., 2009). Таким образом, старение клетки может отменяться (или замедляться) рапамицином, и этот процесс сопровождается уменьшением размера клеток.

При блокировании mTORC1-пути частично ингибируются Ras-индуцированная трансформация, формирова-

ние колоний в мягком агаре и рост опухолей у бестимусных мышей (Skeen et al., 2006; Romanov et al., 2011). Таким образом, можно предполагать, что рапамицин оказывает действие, обратное его известным терапевтическим свойствам — стабилизирует опухолевые линии, повышая их выживаемость за счет фосфорилирования и активации АКТ/ПКВ. АКТ имеет несколько субстратов, которые обладают антиапоптотическими свойствами. Это BAD (Datta et al., 1997) и MDM2 (Zhou et al., 2001). Кроме того, активированная киназа АКТ/ПКВ переходит в ядро, где фосфорилирует факторы транскрипции, что приводит к включению антиапоптотического сигналинга и готовит клетку к вступлению в клеточный цикл (Brunet et al., 1999; Levine et al., 2006). Активная АКТ/ПКВ в свою очередь может вновь активировать киназу mTORC1, которая дает позитивный сигнал для клеточного роста и деления, и затем вновь активирует АКТ/ПКВ через mTORC2. Таким образом, замыкается цикл регуляции, существующий за счет того, что АКТ/ПКВ регулирует mTORC1 и одновременно служит субстратом для mTORC2 (Guertin, Sabatini, 2007). Как уже говорилось выше, комплекс mTORC2 нечувствителен к рапамицину, его стимулируют ростовые факторы. Однако считается, что mTORC2 может фосфорилировать АКТ/ПКВ независимо от стимуляции ростовыми факторами (Guertin, Sabatini, 2007).

Таким образом, в то время как mTORC1 регулирует процессы трансляции и биогенеза рибосом, mTORC2 играет важную роль в фосфорилировании и последующей активации АКТ/ПКВ. Интересно, что mTORC1 негативно регулирует АКТ/ПКВ, но действует ли она прямо или через mTORC2, долго оставалось неизвестным. Недавно было показано, что фосфорилирование Риктора требует активности mTORC1 и, более того, активности киназы S6. Было обнаружено, что Риктор фосфорилируется напрямую киназой S6 по Thr1135 *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, фосфорилирование субстратов АКТ/ПКВ (транскрипционных факторов FOXO1,3 и киназ GSKα/β) в этих клетках также повышено (Julien et al., 2010). В этой связи можно отметить, что мыши, нокаутные по белку Риктор, жизнеспособны, но нокаут по белку Раптор летален (Guertin et al., 2006).

В нормальной клетке комплекс mTORC1 преимущественно локализован в цитоплазме и ассоциирован с клеточными мембранами, в том числе с мембранами митохондрий, эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (Liu, Zheng, 2007). Сигналы, воспринимаемые mTORC1, начинаются предположительно от клеточной мембраны, а дальше mTORC1, распределяясь между мембраной и ядром, фосфорилирует S6K и другие мишени (Li et al., 2007).

Регуляция активности mTOR белками туберозного склероза TSC1,2

Активность mTORC1 регулируется комплексом TSC1—TSC2, состоящим из белков хамартина и туберина (Way et al., 2009). Этот белковый комплекс был выявлен у больных с патологией головного мозга, которая была описана Бурневиллем в конце XIX в. и получила название синдром туберозного склероза. Большинство пациентов с таким наследственным заболеванием имеют мутации генов *tsc1* и *tsc2*, кодирующие белки хамартин или туберин соответственно. Утрата аллели туберина ве-

дет к синдрому туберозного склероза, сопровождающемуся предрасположенностью к образованию опухолей во многих органах. В большинстве случаев опухоли образуются в головном мозге, коже, почках, легких и в сердце. Нейропатология, связанная с TSC2, сопровождается эпилепсией, задержкой развития, дефектами поведения и различными формами аутизма. Хамартин и туберин формируют TSC-комплекс, который ингибирует индуцируемый инсулином сигнальный путь mTORC1/S6K/4E-BP1. Это подавление происходит непосредственно через Rheb-GTP — малый Ras-подобный белок, который в норме активирует TORC1. Утрата TSC1 или TSC2 приводит к активации Rheb-GTPаз и конститутивной активации mTOR1 (Huang, Manning, 2009). Способность рапамицина подавлять комплекс mTOR1 привела к гипотезе, согласно которой рапамицин может заменить TSC при утрате его функций. Эта гипотеза нашла подтверждение в экспериментах на клетках *in vitro* и на мышах. Было установлено, что рапамицин отменяет припадки эпилепсии у мышей с нокаутами по гену *tsc1* (Zeng et al., 2008). Кроме того, рапамицин улучшает выживаемость, восстанавливает клеточный размер и миелинизацию аксонов на нейрональной модели (Meikle et al., 2008).

Было установлено существование механизма обратной связи от mTORC1, изменяющего PI3K/АКТ-каскад выше самой PI3K через белок IRS-1. Наиболее заметна работа этой петли при разрушении комплекса TSC1—TSC2, когда возникает ситуация, напоминающая удаление ростовых факторов (Shan, Hunter, 2006). В исследованиях на мышинных эмбриональных фибробластах (МЭФ) с нокаутом по генам *tsc1* и *tsc2* было обнаружено снижение фосфорилирования АКТ/ПКВ по Thr308 и Ser473 и в меньшей степени по Thr450, что говорит о поражении при таких нокаутах множества сигнальных путей и позволяет предполагать, что нокаут по *tsc1* и *tsc2* нарушает регуляцию активности АКТ/ПКВ (Huang, Manning, 2009). Данные о комплексном характере активации АКТ/ПКВ и существовании mTORC1-опосредованного ингибирования выше PI3K в таких клетках говорят о том, что в этот процесс может быть вовлечен комплекс mTORC2. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по выявлению киназной активности mTORC2 с использованием для иммунопреципитации антител против белка Риктор и экзогенного белка АКТ/ПКВ в качестве субстрата (Huang, Manning, 2009). Было показано, что активность mTORC2 несколько ниже в *tsc1*—/— или *tsc2*—/—МЭФ, а также в клетках HeLa, для которых использовали si-RNA против *tsc2*. И наоборот, повышенная экспрессия *tsc2* в клетках дикого типа увеличивает киназную активность mTORC2 (Huang et al., 2009).

Важно отметить, что активность mTORC2, стимулированная инсулином, не восстанавливается в *tsc2*—/—нокаутах после пролонгированной обработки рапамицином или siRNA-нокадаунах против белков Rheb и Раптор, несмотря на то что все эти обработки блокировали активность mTORC1 и восстанавливали инсулиновый сигнал к PI3K. Фосфорилирование АКТ/ПКВ по Ser473 уменьшено в клетках с нокаутом по *tsc2*—/— по сравнению с реконструированными клетками с конститутивно активной формой PI3K, что приводит к обходному пути механизма обратной связи. Кроме того, стабильная экспрессия мутантного (по активности GAP) белка TSC2 частично восстанавливает активность mTORC2 и фосфорилирование АКТ/ПКВ в *tsc2*—/—МЭФ без выраженного влияния

на активность mTORC1 в таких клетках. Суммируя эти данные, можно сказать, что комплекс TSC1—TSC2 вызывает активацию mTORC2 независимо от Rheb, mTORC и mTORC1-опосредованной негативной петли на PI3K (Huang et al., 2009).

Для дальнейшего подтверждения идеи о вовлечении комплекса TSC1—TSC2 в регуляцию активности mTORC2 изучали изменение уровня фосфорилирования протеинкиназы PKC α (по Ser657) в *tsc2*—/—нокаутах МЭФ. Оказалось, что изменение сходно с изменением активности PKC α в МЭФ, дефектных по белкам Риктору, Sin1 и mLST8 (Huang, Manning, 2009). Обнаружили, что PKC α не меняет активность при активации mTORC1 и что длительное действие рапамицина еще больше подавляет фосфорилирование PKC α в клетках с нокаутом по *tsc2*—/— (Huang, Manning, 2009). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что регуляция активности mTORC2 дефектна в *tsc2*—/—нокаутных клетках и осуществляется не через mTORC1-зависимую обратную связь (Huang, Manning, 2009).

Энергетический статус клетки регулирует mTORC1 через активацию AMP-киназы. Эта киназа активируется аллостерически за счет уровня AMP. Высокий уровень AMP в клетке отражает низкий энергетический статус, а соотношение AMP/АТФ выше при энергетическом стрессе (Carling, 2004). В ответ на низкий энергетический статус AMP-киназа фосфорилирует несколько мишеней, усиливает катаболические и подавляет анаболические реакции, регулируя mTORC1 прямым фосфорилированием TSC2. Этот механизм приводит к подавлению активности mTORC1 (Inoki et al., 2006).

Недавно обнаружено, что mTORC1 может фосфорилировать адапторный рецепторсвязывающий белок ростовых факторов Grb10, что приводит к его стабилизации и ведет к ингибированию PI3K и митогенактивируемых киназных путей (Yonghao Yu, 2011). Поскольку экспрессия Grb10 часто снижена в различных злокачественных опухолях, уменьшение его количества наряду с мутациями гена *pten*, известного как опухоль-супрессорная фосфатаза, могут быть отнесены к важнейшим событиям канцерогенеза. Полученные данные говорят в пользу того, что Grb10 может быть отнесен к опухолевым супрессорам, которые регулируются mTORC1-киназой. Grb10, будучи субстратом mTORC1, подавляет PI3K в клетках мышей, у которых отсутствует TSC2, являющийся опухолевым супрессором и негативным регулятором киназы mTORC1 (Hsu et al., 2011). Это открывает новые перспективы в исследовании роли каскада mTOR в процессе канцерогенеза.

Активность mTOR и работа митохондрий

Получены данные, свидетельствующие о том, что присутствие функционально активного IGF-I-сигнального пути нарушает функции митохондрий (Sell, Lorenzini, 2007). Окислительный стресс в результате дисфункциональной митохондрий приводит к повреждению ДНК и ускорению укорочения теломер. Кроме того, свободные радикалы повреждают РНК, липиды и белки (Heward et al., 2007). Известно, что у дрозофилы продолжительность жизни уменьшается, если антиоксидантный фермент супероксиддисмутазы (СОД) мутирована, и удлиняется при повышенной экспрессии СОД. Манипуляции с экспрессией СОД достаточны для продления жизни, но механизм

увеличения продолжительности жизни связан, скорее всего, не с повышением устойчивости к стрессу, а с изменением метаболизма клеток (Curtis et al., 2007).

Известно, что свободные радикалы вызывают не только повреждения макромолекул, но и активируют определенные внутриклеточные сигналы (Blagosklonny et al., 2006). Считалось, что старение — стохастический нерегулируемый процесс. Однако исследования, проведенные на дрожжах, червях, мухах и мышах, показали, что старение жестко детерминировано и регулируется определенными путями внутриклеточных сигналов. В первую очередь это путь, ведущий от инсулинового рецептора к mTORC1, который отвечает за ограниченное питание организма. Второй путь также затрагивает mTORC1, но начинается от митохондриальной цепи переноса электронов (Floyd et al., 2007). В последние годы было показано, что оба пути взаимодействуют друг с другом (Floyd et al., 2007).

Роль IGF-I-сигналинга и АКТ/ПКВ в регуляции энергетического метаболизма клетки привлекает к себе внимание исследователей. Опухолевые клетки усваивают глюкозу и продуцируют АТФ активнее, чем нормальные клетки, за счет ускоренного гликолиза. В этих клетках, как было показано Варбургом, активнее производится молочная кислота (Warburg, 1924). АКТ/ПКВ и PI3K увеличивают выживаемость клеток и опухолевый рост за счет стимуляции метаболизма глюкозы. Активированная АКТ/ПКВ увеличивает уровень поверхностных транспортеров глюкозы и регулирует экспрессию и положение митохондриальных гексокиназ, которые катализируют начальные этапы гликолиза (Majewski et al., 2004). Недавно были описаны прямая роль mTORC1 в усилении митохондриального окислительного фосфорилирования, а также роль mTORC1 в регуляции продукции свободных радикалов митохондрией (Schieke, Finkel, 2006; Schieke et al., 2006). Таким образом, с одной стороны, свободные радикалы регулируют активность mTORC1, а с другой — mTORC1 регулирует продукцию свободных радикалов митохондрией и сопрягает гликолиз с метаболизмом митохондрии (Floyd et al., 2007).

Инсулин и рецептор IGF-I индуцируют экспрессию митохондриального переносчика пиримидиновых нуклеотидов PNC1. Митохондриальные переносчики связывают метаболические пути и митохондрии в цитоплазме, транспортируя нуклеотиды, метаболиты и кофакторы через непроницаемую митохондриальную мембрану. Они необходимы для генерации энергии, синтеза и деградации аминокислот, синтеза внутримитохондриальных ДНК и РНК, синтеза белка и других клеточных функций. Повышенная экспрессия PNC1 приводит к увеличению размеров клетки, а подавление PNC1 является соответственно причиной уменьшения размера клеток и замедления их пролиферации. Когда подавляется экспрессия PNC1, митохондриальный уровень УТФ значительно снижается. Инсулин и IGF-I индуцируют экспрессию PNC1 (Floyd et al., 2007). Кроме того, в опухолевых клетках наблюдали повышенную экспрессию PNC1 (Floyd et al., 2007). Показано, что S6K1 и 4E-BP1 фосфорилируются не только в ответ на активацию mTORC1 ростовыми факторами, но и в ответ на нарушение функций митохондрий. В связи с этим было выдвинуто предположение о существовании обратной петли регуляции гомеостаза между mTORC1 и митохондрией.

Стабильность комплекса mTORC1 коррелирует с повышением окислительного фосфорилирования и окисли-

тельной способности митохондрии (Schieke et al., 2006). Это наблюдение говорит о том, что mTORC1 должен напрямую взаимодействовать с митохондрией. Действительно, методом иммунопреципитации было обнаружено, что комплекс mTOR—Раптор непосредственно связан с митохондриальной и цитоплазматической фракциями (Schieke et al., 2006). Разрушение комплекса mTOR—Раптор фармакологически (рапамицином) или генетически (с помощью siРНК против белка Раптор) приводит к соответствующим изменениям в метаболизме, при котором митохондриальная активность снижается. Повышение активности mTORC1 приводит к повышению энергетического статуса клетки — увеличению белкового синтеза, биогенезу рибосом и соответственно повышению митохондриальной активности (Schieke et al., 2006).

Известно, что активность mTORC1 негативно регулируется белковым продуктом гена *tsc2*. Нокаут по гену *tsc2* приводит к двукратному увеличению активности mTORC1. В клетках, нокаутных по *tsc2*, возрастают уровень окислительного фосфорилирования и окислительная активность митохондрий (Schieke et al., 2006). В то же время в клетках, обработанных рапамицином, снижается синтез АТФ. В связи с этим предположили, что mTORC1 стимулирует энергетическую потребность клетки, усиливая трансляцию путем повышения активности S6K1. Но, как оказалось, выключение S6K1 при помощи si-РНК не изменяет метаболизма митохондрий (Schieke et al., 2006). Нокаут гена, кодирующего белок Раптор, приводит к уменьшению потребления кислорода. Нокаут по гену белка Риктор, формирующего комплекс mTORC2, наоборот, увеличивает потребление кислорода и окислительную активность (Schieke et al., 2006). В нокаутных по Риктору клетках уровень комплексов mTOR—Раптор был увеличен в 1.5 раза, что говорит о том, что белки Раптор и Риктор конкурируют при формировании комплексов mTORC1 и mTORC2 за связывание с TOR-киназой (Schieke et al., 2006).

В процессе работы на *C. elegans* и дрозофиле было выдвинуто предположение о том, что ингибирование TOR увеличивает продолжительность жизни особей и индуцирует переключение синтеза АТФ с митохондриального пути на гликолитический (Schieke et al., 2006; Curtis et al., 2007).

Стресс-киназа JNK и mTORC1

Недавно было показано, что стресс-киназа JNK способна продлевать жизнь дрозофилы (Wang et al., 2005). У дрозофилы JNK отвечает за устойчивость к окислительному стрессу и включает защитные программы организма, в число которых входит повышение экспрессии транскрипционных факторов FOXO. Считается, что белок гена *foxo* — место взаимодействия сигнальных путей, идущих от IIS (Insulin/IGF/Signalling) и JNK. FOXO интегрируют информацию о стрессах внешней среды и достаточности питания, а также определяют соответствующий биологический ответ. Когда клеточная система получает информацию о том, что она может не ограничивать рост, когда энергетические ресурсы достаточно высоки, клетка не подвергается стрессу, IIS активен, киназа JNK выключена и FOXO инактивирован. Однако при недостатке питания, угрозе со стороны окружающей среды IIS не передает сигнал, JNK активируется, а FOXO транслируется в ядро.

FOXO индуцирует экспрессию генов, которые имеют множество эффектов, как в клетке, так и в организме в целом, но чаще всего это задержка старения (Wang et al., 2005). Индукция гена *thor* редуцирует синтез белка и клеточный рост, сокращая энергетические потребности клетки в неблагоприятной ситуации. Другие гены-мишени, такие как гены белков теплового шока, предположительно исправляют повреждения, нанесенные стресс-агентами, и препятствуют накоплению токсических белковых агрегатов.

Есть интересные данные о том, что в мозге взрослых мух дрозофил уровень JNK высокий именно в инсулинпродуцирующих клетках. По-видимому, таким образом осуществляется защита от неблагоприятных условий окружающей среды на уровне организма. У млекопитающих В-клетки поджелудочной железы (аналог инсулинпродуцирующих клеток мухи) снижают продукцию инсулина в ответ на окислительный стресс и активацию JNK. В то же время имеет место обратная ситуация, когда дефосфорилирование JNK при помощи MAPK-фосфатазы 1 индуцирует экспрессию инсулина в этих клетках. По всей видимости, регуляция активности IIS при помощи JNK является эволюционно консервативной. В клетках млекопитающих JNK ингибирует IIS через фосфорилирование и ингибирование IRS-1. Это взаимодействие отвечает за устойчивость к инсулину при ожирении у мышей. Сокращение циркулирующего инсулина при JNK-опосредованной активации FOXO может быть механизмом, определяющим баланс между ростом организма и его защитой от повреждения (Wang et al., 2005).

Ингибирование киназы TORC1 вызывает активацию ERK-ветви MAP-киназного каскада и стимулирует пролиферацию, что свидетельствует о необходимости сочетанного применения ингибиторов TORC1 и MAP-киназ для эффективного подавления пролиферации опухолевых клеток (Carracedo et al., 2008). Было установлено, что активность mTORC1 непосредственно регулируется не только PI3K/AKT, но и MAP-киназными путями через комплекс TSC1—TSC2, который контролирует mTORC1 путем повышения GTP-азной активности Rheb, активирующего mTORC1 (Foster, Fingar, 2010). Таким образом, TSC-комплекс контролирует одновременно пути внутриклеточной сигнализации, идущие от PI3K/AKT и Ras-MAP-киназ. Ингибирование mTORC1 приводит к активации AKT, в том числе за счет активации субстратов рецепторных тирозинкиназ, таких как у рецептора PDGF и IRS (Harrington et al., 2004; Zhang et al., 2007).

mTOR-каскад и ответ на протеотоксический стресс

В литературе существуют многочисленные данные о влиянии теплового шока на активацию комплекса mTORC1 и его мишени. В зависимости от продолжительности стресса и его интенсивности, а также иных факторов возможны изменения активности mTORC1. Различные стрессовые воздействия, например ультрафиолетовое облучение, обработка H₂O₂ и тепловой шок, вызывают повышение активности mTORC1 с последующим ее уменьшением при продолжительном или повторяющемся воздействии (Jurivich et al., 1991; Ding et al., 2002). Было показано, что шапероны могут участвовать в регуляции mTORC1-сигналинга. Так, умеренный стресс приводит к небольшому уменьшению доступных белков

теплового шока (HSPs) и усиливает активность mTORC1, тогда как сильный стресс и полное отсутствие доступных шаперонов подавляют mTORC1 (Quian et al., 2010). В покоящихся фибробластах повышение температуры вызывает увеличение фосфорилирования рибосомального белка S6, тогда как в делящихся клетках происходит его быстрое дефосфорилирование (Jurivich et al., 1991). Другие авторы (Vries et al., 1997) не наблюдали снижения активности S6K, несмотря на уменьшение фосфорилирования 4E-BP1.

Регуляция белкового синтеза в ответ на стресс может происходить на уровне фосфорилирования факторов инициации трансляции. Известно, что тепловой шок вызывает одновременное дефосфорилирование факторов инициации трансляции 4E (eIF-4E) и BP1 (4E-BP1), что способствует их прочному связыванию друг с другом и ингибирует трансляцию экзпириванных мРНК. Это связывание обратимо и регулируется на уровне фосфорилирования 4E-BP1 комплексом TORC1 (Wan, Helman, 2008).

Некоторые HSPs могут взаимодействовать с компонентами комплексов mTOR 1 и 2 как в норме, так и при стрессе. Белок теплового шока Hsp90 способен связываться с Раптором и позитивно регулировать активность киназы S6K1 (Quian et al., 2010). Обработка клеток ингибитором белка Hsp90 гелданамицином вызывает разрушение связи Hsp90 с Раптором без влияния на связь последнего с mTOR (Quian et al., 2010). Это приводит к подавлению способности комплекса mTORC1 фосфорилировать S6K1 и 4E-BP1 и, следовательно, к ингибированию белкового синтеза. Другой представитель семейства HSP Hsp70 связывается с Риктором и участвует в образовании комплекса mTORC2, а также в регуляции его активности. Интересно, что при тепловом шоке у клеток с подавленной экспрессией Hsp70 активность mTORC2 ингибируется, тогда как в контрольных клетках она возрастает. В то же время нарушение экспрессии Hsp70 не влияет на активность комплекса mTORC1 (Martin et al., 2008).

Недавние исследования показали, что совместное применение ингибитора mTORC1 рапамицина и ингибитора белка Hsp90 17-амиламино-17-диметоксигелданамицина (17AAG) приводит к остановке пролиферации и индукции апоптоза в клетках множественной миеломы с эффектом, значительно превосходящим аддитивный (Kasdan et al., 2005). В клетках гепатоцеллюлярной карциномы подавление Hsp90 при одновременном использовании с рапамицином способствует прекращению активации сигнальных каскадов AKT и NF-κB, вызываемой ингибиторами mTOR, а также способствует уменьшению экспрессии PDGF-Rβ и VEGFR-2 в эндотелиальных клетках и клетках гладких мышц сосудов *in vivo* (Lang et al., 2009).

Активность mTORC1 и аутофагия

Аутофагия была впервые описана Кристианом де Дювом в 1963 г. как процесс деградации в лизосомах поврежденных белков и органелл (De Duve, 1963). Аутофагия представляет собой процесс, который эволюционно связан с переходом клетки на особый тип метаболизма при нехватке в окружающей среде питательных веществ. Процесс начинается с того, что фрагменты цитоплазмы и поврежденные органеллы заключаются в везикулы с двойной мембраной, которые формируются из цитоплазматической мембраны и, сливаясь с лизосомами, передают им свое содержимое для деградации и последующего

использования образующихся макромолекул (Klionsky, 2005). Существуют три основных концептуальных взгляда на аутофагию. Ее рассматривают, во-первых, как тип клеточной гибели наряду с апоптозом и некрозом. Во-вторых — как механизм выживания клетки в неблагоприятных условиях за счет рециркуляции питательных веществ. И третий взгляд рассматривает аутофагию как механизм старения клетки. В пользу третьего подхода говорит тот факт, что гены, ответственные за аутофагию, активируются в процессе старения, более того, перенос генов, контролирующих аутофагию, может индуцировать в клетке старение (Narita et al., 2009).

Аутофагии в настоящее время уделяется пристальное внимание исследователей в связи с той ролью, которую она играет в опухолевых и нейродегенеративных процессах. С одной стороны, активация аутофагии в опухолевых клетках может приводить к их гибели, и такая ситуация нередко наблюдается при применении TOR-киназных ингибиторов (Zang, Zheng, 2012). В то же время аутофагия может спасти опухолевые клетки при проведении лучевой и химиотерапии за счет процессов уничтожения поврежденных белков и рециркуляции аминокислот, из которых строятся новые белки. Аутофагия может наблюдаться и при увеличении активности TOR, как это описано при старении (Narita et al., 2009). В этом случае аутофагия, как показано, может быть причиной старения и может спасти старые клетки, сохраняя оптимальные размеры клеток при гипертрофии, предотвращая их гибель от неконтролируемого увеличения размеров.

Парадокс аутофагии заключается в том, что опухолевый рост блокируют как стимуляторы аутофагии (рапамидин), так и ее ингибиторы (метил аденин, флоракин). Было показано, что в клетках стромы опухоли под воздействием окислительного стресса включается процесс аутофагии, и впоследствии опухолевые клетки могут использовать рециркулирующие вещества, получая их из клеток стромы. Такие взаимоотношения опухоли и стромы способствуют росту опухоли вне зависимости от ангиогенеза. Более того, антиангиогенная терапия индуцирует аутофагию в строме, создавая стромальную гипоксию, что способствует прогрессии опухоли (Martinez-Outschoorn et al., 2010).

Особую роль в процессе аутофагии играет опухолевый супрессор p53. Многие клеточные стрессы могут стимулировать процесс аутофагии, который сопровождается активацией p53. В то же время при выключении или фармакологическом ингибировании p53 аутофагия может индуцироваться. Активация процесса аутофагии увеличивает выживаемость p53-нокаутных опухолевых клеток в условиях гипоксии или голодания, позволяя им поддерживать высокий уровень АТФ (Tasdemir et al., 2008). Множество различных индукторов аутофагии, таких как голодание, рапамидин и токсины, повреждающие эндоплазматический ретикулум, стимулируют протеосомную деградацию p53. Ингибирование деградации p53 предотвращает активацию аутофагии в клетках различных линий (Tasdemir et al., 2008).

Аутофагия играет важную роль в ответе клетки на стресс, в устойчивости к патогенам и продлении клеточной жизни. В дополнение к ее роли в деградации белков аутофагия может индуцировать программируемую клеточную гибель, отличную от апоптоза и называемую программируемой клеточной гибелью II типа, т. е. аутофагическую гибель (Bursch et al., 2004). Этот процесс имеет место в различные периоды развития организма, например

при споруляции у дрожжей, образовании плодового тела у *Dictiostelium discoideum*. В клетках млекопитающих регуляторы mTORC1 по-разному влияют на аутофагию. Р3К/АКТ/ПКВ-путь является причиной ингибирования аутофагии, а PTEN, антагонист АКТ/ПКВ-пути, является позитивным регулятором этого процесса (Klionsky, 2005).

Аутофагия играет существенную роль в определении продолжительности жизни клеток млекопитающих, и частичная редукция способности к аутофагии может служить причиной опухолевого роста. По крайней мере один из эволюционно и физиологически консервативных генов, отвечающих за аутофагию (*Atg6/beclin1*), часто инактивирован в опухолевых клетках. Исследования на мышцах позволяют считать этот ген опухолевым супрессором (Tasdemir et al., 2008).

Существуют в настоящее время две не исключающие друг друга гипотезы, объясняющие, почему подавление аутофагии может стимулировать онкогенез и прогрессию опухолей. В первую очередь нарушение способности клеток подвергаться аутофагии может способствовать гибели клеток некрозом. Это может создать очаги локального воспаления, которые стимулируют опухолевый рост. Вторая гипотеза сводится к тому, что подавление аутофагии приводит к нестабильности генома (Tasdemir et al., 2008). В дополнение к ее роли в выживании во время голодания аутофагия вовлечена во множество процессов, включая развитие, старение, смерть, патогенетические инфекции, стресс, онкогенез и клеточный рост (Melendez, Neufeld, 2008). Различные воздействия, которые стимулируют пролиферацию, такие как ростовые факторы, частичная гепатэктомия и восстановление после голодания, ингибируют аутофагию, в то время как воздействия, подавляющие пролиферацию, такие как контактное ингибирование, распластывание на субстрате, старение, индуцируют аутофагию. Старение клетки сопровождается ее гипертрофией, и аутофагия может служить компенсаторным механизмом, обеспечивающим определенное соотношение размера ядра и цитоплазмы.

Как уже говорилось выше, аутофагия считается программой клеточной гибели, отличной от апоптоза. Это связано с тем, что при аутофагии формируются аутофагосомы и аутолизосомы, а при апоптозе клетка гибнет за счет своих лизосомальных ферментов без фагосом. В настоящее время известно примерно 20 генов, отвечающих за процесс аутофагии (Scott et al., 2007). Тем не менее процесс апоптоза является частью аутофагии и индукция аутофагии при помощи гена *Atg1* приводит не только к образованию аутофагосом, но и к активации каспаз и даже фрагментации ДНК. Было установлено также, что высокая экспрессия гена *Atg1* подавляет активность mTORC1 (Scott et al., 2007).

Активность mTOR и реорганизация актинового цитоскелета

В реорганизации актинового цитоскелета активная роль принадлежит комплексу mTORC2. Он лежит выше по положению в сети сигнальных взаимодействий GTPаз Rho. Именно нокдаун по mTORC2, а не по mTORC1 прекращает полимеризацию актина и клеточное распластывание при добавлении ростовых факторов сыворотки. Кроме того, нокдаун по mTORC2, а не по mTORC1 отменяет фосфорилирование паксиллина и сборку белков фокальной адгезии (Jacinto et al., 2004).

В регуляции процессов апоптоза и старения активная роль в клетке принадлежит цитоскелету. Известно, что ионные каналы митохондрии регулируются актином (Gourlay, Ayscough, 2005). Когда состояние актина меняется, вольтзависимые анионные каналы митохондрии закрываются, мембранный потенциал митохондрии увеличивается и клетка становится устойчивой к проапоптотическим воздействиям. Когда актин находится в стабильном состоянии, потенциалзависимые анионные каналы открываются, мембранный потенциал митохондрии падает, клетка становится чувствительной к апоптозу, который, помимо других факторов, может индуцировать сама митохондрия (Gourlay, Ayscough, 2005). В этой ситуации из митохондрий могут выходить проапоптогенные белки, самым известным из которых является цитохром *c* (Gourlay, Ayscough, 2005). В процессах апоптоза и старения активную роль играют белки, регулирующие актин. Например, таким свойством обладает кофилин. Этот белок является членом семейства кофилин/ADF и регулирует динамику актина, деполимеризуя актиновые филаменты и организуя рециркуляцию образующихся мономеров (Gourlay, Ayscough, 2005).

Известно, что активная форма кофилина связывается с митохондрией после инициации апоптоза. В результате этого митохондрии начинают терять цитохром *c* и клетка полностью реализует апоптоз (Chua et al., 2003). Кофилин активен в дефосфорилированном состоянии, и его функции связаны с увеличением способности свободных концов актиновых филаментов осуществлять полимеризацию (Ichetovkin et al., 2002). Активный статус кофилина прямо связан с метастатической активностью опухолевых клеток. Последние исследования показали, что кофилин регулирует особая LIMK-киназа, которая фосфорилирует кофилин по Ser3 *in vitro* и *in vivo* и вызывает реорганизацию цитоскелета, фосфорилируя и инактивируя кофилин (Amano et al., 2001).

LIMK является мишенью лежащего выше семейства малых GTPаз, которые включают в себя белки RhoA, Rac и Cdc42. Все эти белки вовлечены в регуляцию актинового цитоскелета. Rho индуцирует сборку стресс-фибрилл, Rac регулирует формирование ламеллоподий, а Cdc42 отвечает за вытягивание филоподий (Ridley et al., 1999). Все эти белки активны в фосфорилированном состоянии. Протоонкоген Ras ведет к активации Raf, который активирует MAP-киназный каскад (Lim et al., 1996), и одновременно Ras стимулирует транскрипцию ингибитора циклинзависимых киназ p21Waf.

Было показано, что трансформация фибробластов онкогенным *ras* приводит к конститутивной активации киназы MEK и инактивации киназного пути Rho/ROCK/LIMK, что приводит к разрушению актинового цитоскелета (Lee, Helfman, 2004). Ингибирование формирования стресс-фибрилл увеличивает подвижность *ras*-трансформированных фибробластов и отвечает за увеличение их способности к метастазированию. Недавно было показано, что рапамицин ингибирует подвижность клеток, и это происходит за счет подавления реорганизации F-актина (Liu et al., 2008). Рапамицин может подавлять реорганизацию F-актина, ингибируя фосфорилирование белков, ответственных за фокальную адгезию, таких как Fак, паксиллин и p130 (Liu et al., 2008), а кроме того, он подавляет реорганизацию цитоскелета и клеточную подвижность за счет подавления активности Rho A (Liu et al., 2010). Под действием рапамицина клетки уменьшаются в размере, их цитоскелет разбирается. Таким образом, рапа-

мицин может рассматриваться как агент, меняющий структуру цитоскелета и таким образом отменяющий старение.

Увеличение продолжительности жизни мышей при действии рапамицина

Недавно было показано, что рапамицин увеличивает продолжительность жизни у млекопитающих (Harrison et al., 2009). К этому времени уже было известно, что ингибирование TOR-сигналинга генетически или фармакологически продлевает жизнь дрожжей, нематод и дрозофилы. Авторы этих исследований показали, что если начать кормить мышей, достигших 600-суточного возраста, рапамицином, то продолжительность жизни самок увеличивается на 14, а самцов — на 9%. Этот результат был получен в трех независимых экспериментах на генетически гетерогенных мышах. Авторы пришли к выводу о том, что рапамицин продлевает жизнь, замедляя наступление гибели организма от опухолей. Альтернативная версия состоит в предположении, что рапамицин замедляет механизмы старения либо способствует обоим процессам. Уровень рапамицина в крови этих мышей был одинаков у самок и самцов и составлял примерно от 60 до 70 нг/мл. Видимо, на клеточном уровне рапамицин не установленным пока образом регулирует ответ на стресс, нормализуя энергетический и метаболический статус клетки.

В этих экспериментах не менялась масса мышей, что удивительно, но рапамицин оказывал влияние на содержание фосфорилированного белка S6. После его применения содержание pS6 как у самок, так и у самцов падало почти в 4 раза. Эти результаты подчеркивают значимость TORC1 в механизмах продления жизни не только у беспозвоночных и одноклеточных, но и у млекопитающих (Harrison et al., 2009). TORC1, таким образом, координирует рост и выживаемость, обеспечивая устойчивость к потенциально летальному стрессовому воздействию. Видимо, именно эти механизмы лежат в основе обеспечения продления жизни при помощи рапамицина.

Исторически рапамицин пытались использовать как противоопухолевое средство, которое обладает антипролиферативным и антиангиогенным свойствами (Guba et al., 2002). Однако, как было показано, он малоэффективен при лечении разных типов рака.

Недавно было предложено использовать рапамицин как средство против старения (Blagosklonny, 2006). Действительно, было показано, что рапамицин способен отменять гипертрофию клеток и сохранять пролиферативный потенциал клетки (Blagosklonny, 2006). Кроме того, как и многие препараты такого класса, рапамицин снимает гиперактивность иммунной системы (Martel et al., 1977). Как известно, активность иммунной системы сопровождается повышенной секрецией свободных радикалов многими клетками-участниками иммунного ответа, что способствует старению организма. На клеточном уровне рапамицин блокирует киназу mTORC1, что приводит к дефосфорилированию мишеней mTORC1 — белков S6K1,2 и 4E-BP1,2, снижению mPНК-трансляции, прекращению сборки рибосом, уменьшению клеточной массы и возобновлению деления клетки. Снижение активности mTORC1 рапамицином может приводить также к подавлению сборки комплексов mTORC2, что ведет к снижению фосфорилирования АКТ/ПКВ, к подавлению активности малых ГТФаз, приводящих к преобразованию цитоскелета и от-

мене основных признаков старения клетки, связанных с изменением формы клеток и их распластыванием. Можно предположить, что отмена гипертрофии является одним из механизмов отмены клеточного старения или его задержки. Известно также, что рапамицин отменяет способность перекиси водорода активировать путь PI3K/TORC1/S6 и увеличивать клеточный объем и содержание белка в клетке (Blagosklonny, 2006). Таким образом, рапамицин задерживает клеточное старение путем подавления активности сигнальных путей, активированных в процессе старения в результате нарушения механизмов обратной связи.

Показано, что киназа S6K1 регулирует продолжительность жизни и у млекопитающих (Selman et al., 2009). Нокаут по ее гену приводит к увеличению продолжительности жизни мышей примерно на 10 %. Кроме того, у этих животных исчезают болезни, которые, как правило, связаны со старением. В частности, у таких мышей не наблюдали диабета, гипертонии, атеросклероза и остеопороза (Selman et al., 2009).

Рапамицин продляет жизнь трансгенным мышам, склонным к образованию опухолей. Рапамицин снижал массу тела животных, удлинял время их жизни за счет подавления опухолеобразования, уменьшая размер и количество опухоли (Anisimov et al., 2010).

Принципиально новая информация о роли mTOR в нормализации статуса клеток была получена на клетках больных прогерией (синдромом Хатчинсона—Гилфорда) (Cao et al., 2011). При этом заболевании развивается преждевременное старение организма. Считается, что причиной болезни служит генетическое нарушение — точечная мутация в гене ламина А. Мутантный белок известен как прогерин. Прогерин накапливается в клетках и служит причиной прекращения их деления и преждевременного старения. В клетках с повышенным содержанием прогерина (HGPS) можно наблюдать блеббинг ядра, более тонкую ядерную мембрану, увеличение количества ядерных пор, сокращение содержания периферического гетерохроматина, модификацию гистонов, замедление DDR (DNA damage response) и изменение экспрессии генов. Ламин А входит в состав ядерной ламины, которая обеспечивает механическую организацию ядерных структур и отвечает за организацию хроматина, экспрессию генов и репликацию ДНК, поэтому вследствие накопления мутантной формы ламина А — прогерина — происходит нарушение этих процессов. Обработка клеток HGPS рапамицином отменяет ядерный блеббинг, ускоряет деградацию прогерина и замедляет старение. По версии М. Благосклонного, рапамицин способствует активации процесса аутофагии, в результате чего клетки ускоренно освобождаются от прогерина и таким образом нормализуется структура ядра (Blagosklonny, 2011). Кроме того, рапамицин может ингибировать псевдо-DDR (ответ, возникающий без реальных разрывов ДНК) и (или) ингибировать гиперсекреторную функцию клеток и таким образом компенсировать генетическое нарушение на эпигенетическом уровне. Таким образом, предполагается, что рапамицин может найти применение при терапии больных прогерией (Cao et al., 2011).

Заключение

История изучения mTOR еще не завершена. Уже существуют неопровержимые доказательства того, что клеточные механизмы и сигнальные пути, регулирующие

старение, контролируются киназой mTOR. Здесь мы попытались выделить важные направления исследований, которые говорят о ведущей роли mTOR в регуляции старения, аутофагии, синтеза белков и многих других клеточных программ. Сегодня можно говорить о том, что mTOR играет в канцерогенезе позитивную и негативную роль за счет активации аутофагии. С одной стороны, аутофагия может приводить к гибели опухолевых клеток, а с другой — поддерживать их рост за счет рециркуляции белков. Киназа mTOR может также считаться предпочтительной мишенью для активации процессов старения в опухолевых клетках и снижения пула пролиферирующих клеток. Генетические подходы показали существование перекреста между программами, контролирующими старение и аутофагию. Активация аутофагии контролируется mTOR и приводит к увеличению продолжительности жизни, как это происходит в случае ограничения калорий. Причинно-следственные связи, если таковые имеются, между старением и mTOR-зависимой регуляцией клеточного редокс-гомеостаза менее ясны и только начинают исследоваться. Ключевые факторы, которые регулируют продолжительность жизни через активацию аутофагии, могут включать в себя p53, FOXOs и сиртуины, которые могут быть мишенями в борьбе с возрастными заболеваниями. Некоторые генетические исследования дают убедительные доказательства того, что снижение синтеза белка может приводить к продлению жизни, по крайней мере у мышей, через eIF4E. Пока нет установленной связи между трансляцией, инсулиновым сигналингом и продолжительностью жизни. Не исключено, что ограничение калорий влияет на продолжительность жизни через S6-киназы и биогенез рибосом.

Подавление mTOR рапамицином может быть перспективным направлением лечения прогерии. Клетки, в которых подавляется mTOR и включается аутофагия, освобождаются от дефектов, связанных с мутациями в ламине, что приводит к повышению их пролиферативного потенциала, который при прогерии крайне низок. Аутофагия снижается с возрастом, и ее активация может быть полезна при лечении нейродегенеративных заболеваний, позволяя клетке избавиться от белков, вызывающих нейродегенеративные патологии. Подавление mTOR может быть полезно при терапии диабета, поскольку при низком уровне mTOR восстанавливается чувствительность к инсулину. Очевидно, что в настоящее время необходимо продолжать исследования для выявления молекулярных связей mTOR с процессом старения. Такая работа позволит установить, когда и как использовать коррекцию mTOR-каскада в терапевтических целях для лечения различных болезней, в первую очередь для лечения рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01152), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и С.-Петербургского государственного университета (контракт 1.37.122.2011).

Список литературы

- Копнин Б. П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65 (1) : 5—33.
- Atano T., Tanabe K., Eto T., Narumiya S., Mizuno K. 2001. LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated

kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* 354 : 149—159.

Anisimov V. N., Zabezhinski M. A., Popovich I. G., Piskunova T. S., Semenchenko A. V., Tyndyk M. L., Yorova M. N., Antoch M. P., Blagosklonny M. V. 2010. Rapamycin extends maximal lifespan in cancer-prone mice. *Amer. J. Pathol.* 176 : 2092—2097.

Bernardi R., Guernah I., Jin D., Grisendi S., Alimonti A., Teruya-Feldstein J., Cordon-Cardo C., Simon M. C., Rafii S., Pandolfi P. P. 2006. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.* 442 : 779—785.

Bierer B. E., Jin Y. J., Fruman D. A., Calvo V., Burakoff S. J. 1991. FK 506 and rapamycin: molecular probes of T-lymphocyte activation. *Transplant Proc.* 6 : 2850—2855.

Blagosklonny M. V. 2006. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle.* 18 : 2087—2102.

Blagosklonny M. V. 2011. Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough. *Aging.* 3 : 685—691.

Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M. E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96 (6) : 857—868.

Bursch W., Ellinger A., Gerner C., Schulte-Hermann R. 2004. Autophagocytosis and programmed cell death. In: *Autophagy*. Georgetown: Landes Bioscience. TX. 287—303.

Cao K., Graziotto J. J., Blair C. D., Mazulli J. R., Erdos M. R., Krainc D., Collins F. S. 2011. Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson—Gilford progeria syndrome cells. *Science Transl. Med.* 3 : 1—11.

Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade — unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* 29 : 18—24.

Carracedo A., Ma L., Teruya-Feldstein J., Rojo F., Salmena L., Alimonti A., Egia A., Sasaki A. T., Thomas G., Kozma S. C., Papa A., Nardella C., Cantley L. C., Baselga J., Pandolfi P. P. 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* 118 : 3065—3074.

Chua B. T., Volbracht C., Tan K. O., Li R., Yu V. C., Li P. 2003. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat. Cell Biol.* 12 : 1083—1089.

Coleman M. L., Densham R. M., Croft D. R., Olson M. F. 2006. Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene.* 25 : 2708—2716.

Corradetti M. N., Guan K.-L. 2006. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene.* 25 : 6347—6360.

Curtis C., Landis G. N., Folk D., Wehr N. B., Hoe N., Wasakar M., Abdueva D., Skvortsov D., Ford D., Luu A., Badrinath A., Levine R. L., Bradley T. J., Tavaré S., Tower J. 2007. Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. *Genome Biol.* 8 : R262.

Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91 : 231—241.

De Duve C. 1963. The lysosome. *Sci. Amer.* 208 : 64—72.

Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Pospelova T. V., Blagosklonny M. V. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 8 : 1888—1895.

Ding M., Li J., Leonard S. S., Shi X., Costa M., Castranova V., Vallyathan V., Huang C. 2002. Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction. *Mol. Cell. Biochem.* 234—235 : 81—90.

Dorman J. B., Albiner B., Shroyer T., Kenyon C. 1995. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 141 : 1399—1406.

Efstratiadis A. 1998. Genetics of mouse growth. *Int. J. Develop. Biol.* 42 : 955—976.

Eng C. P., Sehgal S. N., Vézina C. 1984. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J. Antibiot. (Tokyo).* 37 : 1231—1237.

Feng Z., Zhang H., Levine A. J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 8204—8209.

Floyd S., Favre C., Lasorsa F. M., Leahy M., Trigiant G., Stroebel P., Marx A., Loughran G., O'Callaghan K., Marobio C. M., Slotboom D. J., Kunji E. R., Palmieri F., O'Connor R. 2007. The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 3545—3555.

Foster K. G., Fingar D. C. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR) conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.* 285 : 14 071—14 077.

Fox H. L., Kimball S. R., Jefferson L. S., Lynch C. J. 1998. Amino acids stimulate phosphorylation of p70(S6k) and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 274 : C206—C213.

Gourlay C. W., Ayscough K. R. 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 583—589.

Graff J. R., Konicek B. W., Vincent T. M., Lynch R. L., Monteth D., Weir S. N., Schwier P. 2007. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduced tumor growth without toxicity. *J. Clin. Invest.* 117 : 2638—2648.

Guba M., von Breitenbuch P., Steinbauer M., Koehl G., Flegel S., Hornung M., Bruns C. J., Zuelke C., Farkas S., Anthuber M., Jauch K. W., Geissler E. K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 8 : 128—135.

Guertin D. A., Sabatini D. M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 12 : 9—22.

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. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Develop. Cell.* 11 : 859—871.

Harrington L. S., Findlay G. M., Gray A., Tolkacheva T., Wigfield S., Rebholz H., Barnett J., Leslie N. R., Cheng S., Shepherd P. R., Gout I., Downes C. P., Lamb R. F. 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166 : 213—223.

Harrison D. E., Strong R., Sharp Z. D., Nelson J. F., Astle C. M., Flurkey K., Nadon N. L., Wilkinson J. E., Frenkel K., Carter C. S., Pahor M., Javors M. A., Fernandez E., Miller R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 460 : 392—395.

Harvey K. F., Mattilia J., Sofer A., Bennet F. C., Ramsey M. R., Ellisen L. W., Puig O., Hariharan I. K. 2008. FOXO-regulated transcription restricts overgrowth of Tsc mutant organs. *J. Cell Biol.* 180 : 691—696.

Heitman J., Movva N. R., Hall M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253 : 905—909.

Heward C., Su Y., Cortez C., Tan R., Harman S. M. 2007. A multi-parameter biomarker set for oxidative stress assessment in human samples. Current directions in studying mechanisms of aging. *Age.* 29 : 109.

Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Gélouën A., Even P. C., Cervera P., Le Bouc Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 421 : 182—187.

Hsu P. P., Kang S. A., Rameseder J., Zhang Yi., Sabatini D. M. 2011. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science.* 332 : 1317—1322.

Huang S., Houghton P. J. 2001. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist. Updat.* 4 : 378—391.

Huang J., Manning B. D. 2008. The TSC1—TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 412 : 179—190.

- Huang J., Manning B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Transactions*. 37 : 217—222.
- Huang J., Wu S., Wu C.-L., Manning B. D. 2009. Signal events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res.* 69 : 6107—6114.
- Hwangbo D. S., Gershman B., Tu M. P., Palmer M., Tatar M. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*. 429 : 562—566.
- Ichetovkin I., Grant W., Condeelis J. 2002. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12 : 79—84.
- Inoki K., Zhu T., Lindvall C., Guan K. L. 2006. TSC2 integrate Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 126 : 955—968.
- Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M. A., Hall A., Hall M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biol.* 6 : 1122—1128.
- Jia K., Chen D., Riddle D. L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*. 131 : 3897—3906.
- Julien L.-A., Carriere A., Moreau J., Roux P. P. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell Biol.* 30 : 908—921.
- Jurivich D. A., Chung J., Blenis J. 1991. Heat shock induces two distinct S6 protein kinase activities in quiescent mammalian fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 148 : 252—259.
- Kapahi P., Zid B. M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* 14 : 885—890.
- Kasdan L. A., Lu G., Singha U., Lentzsch S., Roodman G. D., Ghobrial I. M. 2005. Combination of the mTOR inhibitor Rapamycin and HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) inhibits proliferation and induces apoptosis in Multiple Myeloma (MM). *J. Clinical Oncol. ASCO Annual Meeting Proceedings*. 23, Part I of II (Supplement) : 9609.
- Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J., Waterfield M. D. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 17 : 615—675.
- Keniry M., Parsons R. 2008. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*. 27 : 5477—5485.
- Klionsky D. J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118 : 7—18.
- Lang S. A., Moser C., Fichtner-Feigl S., Schachtschneider P., Hellerbrand C., Schmitz V., Schlitt H. J., Geissler E. K., Stoeltzing O. 2009. Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 49 : 523—532.
- Lee S., Helfman D. M. 2004. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J. Biol. Chem.* 279 : 1885—1891.
- Levine A. J., Feng Z., Mak T. W., You H., Jin S. 2006. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Develop.* 20 : 267—275.
- Li W., Petrmpol M., Molle K. D., Hall M. N., Battegay E. J., Humar R. 2007. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ. Res.* 100 : 79—87.
- Lim L., Manser E., Leung T., Hall C. 1996. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur. J. Biochem.* 242 : 171—185.
- Liu L., Chen L., Chung J., Huang S. 2008. Rapamycin inhibits F-actin reorganization and phosphorylation of focal adhesion proteins. *Oncogene*. 27 : 4998—5010.
- Liu L., Luo Y., Chen L., Shen T., Xu B., Chen W., Zhou H., Han X., Huang S. 2010. Rapamycin inhibits cytoskeleton reorganization and cell motility by suppressing RhoA expression and activity. *J. Biol. Chem.* 285 : 38 362—38 372.
- Liu X., Zheng X. F. 2007. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell*. 18 : 1073—1082.
- Majewski N., Nogueira V., Bhaskar P., Coy P. E., Hay N. 2004. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell*. 16 : 819—830.
- Mamane Y., Petroulakis E., Martineau Y., Sato T. A., Larsson O., Rajasekhar V. K., Sonenberg N. 2007. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF-4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE*. 2 : e242.
- Manning B. D., Logsdon M. N., Lipovsky A. I., Abbott D., Kwiatkowski D. J., Cantley L. C. 2005. Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Develop.* 19 : 1773—1778.
- Martel R. R., Klicius J., Galet S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55 : 48—51.
- Martin J., Masri J., Bernath A., Nishimura R. N., Gera J. 2008. Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 : 578—583.
- Martinez-Outschoorn U. E., Whitaker-Menezes D., Pavlides S., Chiavarina B., Bonuccelli G., Trimmer C., Tsirigos A., Migneco G., Witkiewicz A. K., Balliet R., Mercier L., Wang C., Flomenberg N., Howell A., Lin Z., Caro J., Pestell R. G., Sotgia F., Lisanti M. P. 2010. The autophagic tumor stroma model of cancer or «battery-operated tumor growth». A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle*. 9 : 4297—4306.
- Meikle L., Pollizzi K., Egnor A., Kramvis I., Lane H., Sahin M., Kwiatkowski D. J. 2008. Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *J. Neurosci.* 28 : 5422—5432.
- Melendez A., Neufeld T. P. 2008. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development*. 135 : 2347—2360.
- Narita M., Young A. R., Narita M. 2009. Autophagy facilitates oncogen-induced senescence. *Autophagy*. 7 : 1046—1047.
- Oldham S., Montagne J., Radimerski T., Thomas G., Hafen E. 2000. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Develop.* 14 : 2689—2694.
- O'Reilly K. E., Rojo F., She Q. B., Solit D., Mills G. B., Smith D., Lane H., Hofmann F., Hicklin D. J., Ludwig D. L., Baselga J., Rosen N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 66 : 1500—1508.
- Qian S. B., Zhang X., Sun J., Bennink J. R., Yewdell J. W., Paterson C. 2010. mTORC1 links protein quality and quantity control by sensing chaperone availability. *J. Biol. Chem.* 285 : 27 385—27 395.
- Ridley A. J., Allen W. E., Peppelenbosch M., Jones G. E. 1999. Rho family proteins and cell migration. *Biochem. Soc. Symp.* 65 : 111—123.
- Romanov V. S., Bardin A. A., Zubova S. G., Bykova T. V., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2011. p21 Waf1 is required for complete oncogenic transformation of mouse embryo fibroblasts by Elad5 and c-Ha-ras oncogenes. *Biochimie*. 93 : 1408—1414.
- Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 596—603.
- Sarbassov D. D., Ali S. M., Sengupta S., Sheen J. H., Hsu P. P., Bagley A. F., Markhard A. L., Sabatini D. M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell*. 22 : 159—168.
- Schieke S. M., Finkel T. 2006. Mitochondrial signaling, TOR and life span. *Biol. Chem.* 387 : 1357—1361.
- Schieke S. M., Phillips D., McCoy J. P., Aponte A. M., Shen R. F., Balaban R. S., Finkel T. 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen con-

sumption and oxidative capacity. *Biol. Chem.* 281 : 27 643—27 652.

Scott R. C., Juhasz G., Neufeld T. P. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* 17 : 1—11.

Sehgal S. N. 2003. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* 35 : 7S—14S.

Sell C., Lorenzini S. 2007. Aging in IGF-1 hypomorphic mice. Current directions in studying mechanisms of aging. *Age.* 29 : 105—106.

Selman C., Tullet J. M., Wieser D., Irvine E., Lingard S. J., Choudhury A. I., Claret M., Al-Qassab H., Carmignac D., Ramadani F., Woods A., Robinson I. C., Schuster E., Batterham R. L., Kozma S. C., Thomas G., Carling D., Okkenhaug K., Thornton J. M., Partridge L., Gems D., Withers D. J. 2009. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 326 : 140—144.

Shah O. J., Hunter T. 2006. Turnover of the active fraction of IRS1 involves Raptor-mTOR and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol. Cell Biol.* 26 : 6425—6434.

Shaw R. J., Cantley L. S. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumour cell growth. *Nature.* 441 : 424—430.

Shi Y., Yan H., Frost P., Gera J., Lichtenstein A. 2005. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol. Cancer Ther.* 4 : 1533—1540.

Sidani M., Wessels D., Mounneimne G., Ghosh M., Goswami S., Sarmiento C., Wang W., Kuhl S., El-Sibai M., Backer J. M., Eddy R., Soll D., Condeelis J. 2007. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J. Cell Biol.* 179 : 777—791.

Skeen J. E., Bhaskar P. T., Chen C. C., Chen W. S., Peng X. D., Nogueira V., Hahn-Windgassen A., Kiyokawa H., Hay N. 2006. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell.* 10 : 269—280.

Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Kempf R. C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazarino M. C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A. M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J. A. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 3 : 192—222.

Sugrue M. M., Shin D. Y., Lee S. W., Aaronson S. A. 1997. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 9648—9653.

Tasdemir E., Maiuri M. C., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergny M., D'Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu C., Harper F., Nannmark U., Samara C., Pinton P., Vicencio J. M., Carnuccio R., Moll U. M., Madeo F., Paterlini-Brechot P., Rizzuto R., Szabadkai G., Pierron G., Blomgren K., Tavernarakis N., Codogno P., Cecconi F., Kroemer G. 2008. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 10 : 676—687.

Vezina C., Kudelski A., Sehgal S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo).* 28 : 721—726.

Vivanco I., Sawyers C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2 : 489—501.

Vries R. G., Flynn A., Patel J. C., Wang X., Denton R. M., Proud C. G. 1997. Heat shock increases the association of binding protein-1 with initiation factor 4E. *J. Biol. Chem.* 272 : 32 779—32 784.

Wan X., Helman L. J. 2008. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: implications for human cancer. In: *Oncogene proteins: structure, functions and analyses.* New York: Nova Sci. Publ., Inc. 87—115.

Wang M. C., Bohmann D., Jasper H. 2005. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell.* 121 : 115—125.

Warburg O. 1924. Über den stoffwechsel der carcinom zelle. *Biochem. Z.* 152 : 309—344.

Way S. W., McKenna J., 3rd, Mietsch U., Reith R. M., Wu H. C., Gambello M. J. 2009. Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18 : 1252—1265.

Weinberg R. A. 1995. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 758 : 331—338.

Yokoo T., Toyoshima H., Miura M., Wang Y., Iida K. T., Suzuki H., Sone H., Shimano H., Gotoda T., Nishimori S., Tanaka K., Yamada N. 2003. p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278 : 52 919—52 923.

Yonghao Yu., Yoon S.-O., Poulogiannis G., Yang Q., Blenis J. 2011. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science.* 332 : 1322—1326.

Zeng L. H., Xu L., Gutmann D. H., Wong M. 2008. Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol.* 63 : 444—453.

Zhang H., Bajraszewski N., Wu E., Wang H., Moseman A. P., Dabora S. L., Griffin J. D., Kwiatkowski D. J. 2007. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.* 117 : 730—738.

Zhang H., Stallock J. P., Ng J. C., Reinhard C., Neufeld T. P. 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Develop.* 14 : 2712—2724.

Zang Y., Zheng S. 2012. mTOR-independent 4E-BP1 phosphorylation is associated with cancer resistance to mTOR kinase inhibitors. *Cell Cycle.* 11 : 594—603.

Zhang X., Tang N., Hadden T. J., Rishi A. K. 2011. Akt, FOXO and regulation of apoptosis. *Biochim. biophys. acta.* 1813 : 1978—1986.

Zhou B. P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B., Hung M. C. 2001. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3 : 973—982.

Поступила 28 IV 2012

TOR-CENTRIC CONCEPT OF REGULATION MITOGENIC, METABOLIC
AND ENERGETIC SIGNAL PROCESSING IN CELL*S. G. Zubova,^{1,2} Zh. V. Shitikova,^{1,2} T. V. Pospelova^{1,2}*¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University;
¹ e-mail: egretta_julia@mail.ru

Kinase TOR (target of rapamycin), discovered as a target of antibiotic rapamycin, the evolutionarily conservative serine / threonine kinase that integrates numerous extra-cellular and intracellular signals, regulating cell growth, protein synthesis and metabolism. Mammalian kinase (mTOR) exists in two complexes: the rapamycin-sensitive TORC1 and rapamycin resistant mTORC2, controlling in the cell different programs. Identification of mTOR as integral component PI3/Akt way that deregulated during carcinogenesis, as well as the existence of a cross-talk between the tumor-suppressor p53 cascade and mTOR demonstrates its unique role in the process of neoplastic growth. This review discusses the various aspects of the regulation of the kinase mTOR, the relationship with the general cell-signaling pathways and its use as a target for the cancer, diabetes, obesity, neurodegenerative changes and hereditary syndromes of aging.

Key words: mTOR, senescence, rapamycin, tumour growth.
