

УДК 577.322

А.А. Жылкибаев

Евразийский национальный университет им Л.Н.Гумилева, г. Астана, Казахстан  
e-mail: askokshe@mail.ru

### **Выявление влияния мTOR комплекса на транспорт рибосомальных белков при питательном истощении**

Синтез рибосомальных белков контролируется взаимодействием множества сигнальных систем в клетке. Роль мTOR комплекса в биосинтезе рибосомальных белков заключается в координации нуклео-цитоплазматического транспорта зависящего от наличия питательных веществ и ко-факторов. В данной работе показано понижение содержания рибосомальных белков rpS3 и rpL26 в ядерной фракции при субклеточном фракционировании. Также при проведении аминокислотного истощения в клетках MEF Rictor<sup>-/-</sup> замечена одинаковая регуляция как и при диком типе линии клеток MEF, что исключает участие мTOR комплекса 2 при транспорте белков в ядро. Характер снижения уровня белков в ядерной фракции свидетельствует о стабильной регуляции транспорта белков путем протеинкиназной сигнальной системы мTOR комплекса.

**Ключевые слова:** Рибосомальные белки, мTOR, субклеточное фракционирование.

А.А. Жылкибаев

### **Қоректік зат тауыстыру шартында рибосомалық ақуыздардың тасымалындағы мTOR комплексінің әсерін анықтау**

Рибосомалық ақуыздардың синтезі жасуша ішіндегі көптеген күрделі сигналдық жүйе процесстері арқылы қадағаланады. Рибосомалық ақуыздардың тасымалдануында мTOR сигналдық жолының ролі зор. Өйткені ол нуклео-цитоплазмалық тасымалды қоректік заттардың болына қарай бақылайды. Берілген жұмыста rpS3 және rpL26 рибосомалық ақуыздарының ядролық және ядро алдындағы фракцияларында азаюы амин қышқылдарын уақыт өлшемі бойынша сарқылтумен байланысты екені анықталды. Әрі Риктор нөл жасушалар мен бақылаушы жасушалардағы ақуыздардың салыстырмалы түрде бірдей төмендеу бұл процеске мTOR 2 комплекстің қатыспайтығын дәлелдейді. Уақыт есебіне қарай рибосомалық ақуыздардың төмендеу деңгейі мTOR комплексінің белсенділігімен реттелетіні түсіндіріледі.

**Түйінді сөздер:** рибосомалық ақуыздар, мTOR, суб жасушалық фракциялау.

А.А. Zhylkibayev

### **Determination of mTOR complex influence in ribosomal protein transport under amino acid starvation condition**

Synthesis of ribosomal proteins controlled by regulation of many processes in cells. Role of mTOR pathway in ribosomal protein transport is coordinating of nucleocytoplasmic transport which depends on nutrient availability. In our research we have detected low abundance of ribosomal proteins rpS3 and rpL26 in prenuclear and nuclear fraction of MEF cells. In addition, same decreasing level of ribosomal protein in Rictor null cells compared to control cells indicates that mTORC2 does not involve in ribosomal biogenesis. Character of decreasing of ribosomal protein in nuclear fraction by time points explained that this process is regulated by activity of mTOR protein kinase.

**Keywords:** ribosomal proteins, mTOR, sub-cellular fractionation.

Биогенез рибосомальных белков это динамический процесс, включающий координацию взаимодействия между рибосомальными РНК, рибосомальными белками и ко-факторами. Хорошо изучен вопрос регулирования рибосомального белка S6 посредством мTOR комплекса.

Интеграция многих сигнальных каскадов с участием мTOR комплекса проявляет чувствительность к доступности пищевых и энергетических запасов в клетке. Тем самым контролирует такие важные клеточные процессы как рост, деление, клеточный цикл и общий метаболизм клетки [1].

Интенсивное исследование процессов транспорта белков дает толчок для раскрытия механизма регуляции нуклео-цитоплазматического взаимодействия.

Отличительным признаком регуляции роста в прокариотических и эукариотических клетках является тесная связь между экстремальными условиями и синтезом рибосом. Синтез рибосом это комплекс процессов, требующий больших энергетических затрат. Установлено что при уменьшении концентрации питательных веществ, в частности аминокислот, синтез белков резко понижается. Показано также, что при пролиферации клеток *HeLa* продуцируется 7500 рибосом в минуту, что требует синтеза около 300 000 рибосомальных белков. Поэтому для сохранения ресурсов клетка должна лимитировать синтез белков под контролем доступности питательных веществ. Исследования проведенные на дрожжах и клетках млекопитающих показали, что зависимый от наличия питательных веществ биогенез рибосом, опосредован мTOR сигнальным путем [2].

мTOR (*mammalian Target of rapamycin*) – серин/треониновая киназа которая принадлежит семейству фосфо-иннозитид-3 киназ [3]. Это основной компонент естественного регулирования анаболических процессов в эукариотической клетке. мTOR комплекс 2 отличается от 1 комплекса содержанием белков. Риктор является компонентом второго комплекса, который в отличие первого комплекса содержащего Раптор, регулирует клеточную пролиферацию и выживаемость [4].

Целью данного исследования являлось выявить регуляцию транспорта рибосомальных белков посредством мTOR комплекса при аминокислотном истощении в клетках мышинных эмбриональных фибробластов.

### Материалы и методы

Материалы были получены из следующих источников: DMEM/F12 из компании **Life technologies**. Фетальная сыворотка от **HyClone**. Коктейль протеазных ингибиторов-Roche. RPMI-1640 без аминокислот – **Invitrogen**. Атитела к gpS-6 – **Cell signaling**, антитела к gpL-26 – **Santa Crus Biotechnology**. Конъюгированные с HRP анти-мышинные и анти-кроличьи антитела были получены из компании **Invitrogen**.

### Культивирование линии клеток.

Первичная линия клеток мышинных эмбриональных фибробластов (MEF) была получена из 12 недельного эмбриона мыши, а также линия клеток мышинных эмбриональных фибробластов (MEF Rictor-/-) с пониженным уровнем риктора по описанию [5]. Клетки были культивированы в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки, пенициллин/стрептомицин при 5% CO<sub>2</sub> и 37° С. Все приведенные выше клеточные линии культивировались при плотности позволяющей делиться клеткам на протяжении всего эксперимента.

### Лизис клеток и иммуноблоттинг

Перед лизированием все клетки были промыты охлажденным ФСБ (фосфатно-солевым буфером) при 4° С, лизисный буфер 1 содержит: 40 ммоль/л HEPES (pH 7,5), 120 ммоль/л NaCl, 1 ммоль/л EDTA (этилен диамид тетрауксусная кислота), 10 ммоль/л Na-пирофосфат, 10 ммоль/л натрия глицерофосфат, 50 ммоль/л NaF, 1% Тритон X-100, и коктейль ингибиторов протеаз (Roche) [6]. Буфер 2 был приготовлен с дополнительным добавлением 200 ммоль/л LiCl. Лизированные клетки инкубировали в течении 30 минут при 4°С, после лизиса образцы были центрифугированы при 500gx5 мин. Растворимые цитозольные фракции клеточных лизатов были отобраны, клеточный осадок был лизирован буфером 2 в течении 1 часа при 4°С дальнейшее центрифугирование при 16000gx15 мин дало возможность фракционировать преядерные и ядерные образцы. Клеточные лизаты, содержащие равное количество концентрации белка, были разделены с помощью одно направленного вертикального электрофореза в полиакриламидном градиентном геле 4-15% (Bio-Rad). После разделения белки были перенесены на мембрану (Immobilon-Millipore) и визуализированы с помощью иммуноблоттинга.

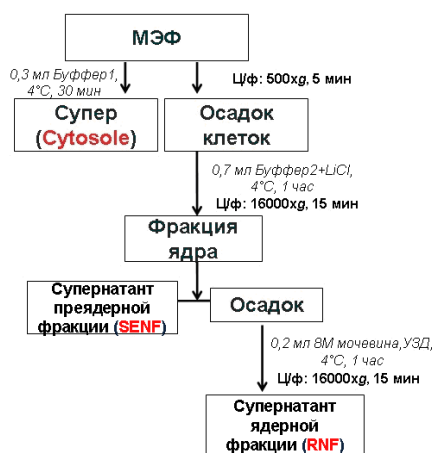
### Результаты и их обсуждение

Нами была изучена зависимость от питательных веществ рибосомальных белков при пониженной стабильной экспрессии риктора в клетках мышинных эмбриональных фибробластов. Первичные линии клеток: MEF и MEF Rictor-/- были лизированы разными буферными системами методом субфракционирования (рисунки 1).

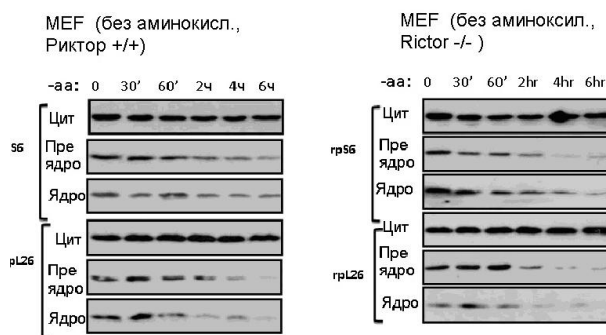
Ранее было показано, что при добавлении специфичного протеинкиназного ингибитора мTOR комплекса–pp242 уровень рибосомальных белков в преядерной фракции понижается. В связи с этим было интересным изучить нуклео-цитоплазматическую аккумуляцию рибосомальных белков. Естественное блокирование ФМТОР сигнальной системы путем аминокислотного истощения указало на понижение количества белка в ядерных фракциях в соответствии с продолжением истощения до 6 часов. Проанализированные фракции: цитозоля, преядерной оболочки и ядра, демонстрируют понижение уровня содержания рибосомальных белков **rpS6** и **rpL26** в преядер-

ной и ядерной фракциях после 2 часов истощения аминокислотами (RPMI-1640 без аминокислот). Однако в цитозольных фракциях уровень этих белков при этом не изменяется (Рисунок 2).

Результаты наших опытов показали роль серин/треонин зависимого сигнального пути в биогенезе рибосом. Схожее понижение уровня рибосомальных белков в преядерной и ядерной фракциях MEF Риктор -/- и клеток MEF Риктор +/- указывает на независимую от мTOR комплекса 2 регуляцию транспорта рибосом в ядре. Тем самым было показано, что понижающийся уровень рибосомальных белков зависит от активности мTOR комплекса.



**Рисунок 1** – Схематическое изображение получения исследуемых образцов методом субклеточного фракционирования



**Рисунок 2** – Насыщение ядерной фракции рибосомальными белками **rpS6** и **rpL26**

## Литература

- 1 Rosner M, Schipany K, Hengstschlager M. Phosphorylation of nuclear and cytoplasmic pools of ribosomal protein S6 during cell cycle progression // *Amino Acids*. – 2013. – Vol.44. – P.1233–1240.
- 2 Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases // *Oncogene*. – 2006.- Vol.25. – P. 6384-6391.
- 3 Guertin, D. A. and Sabatini, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer // *Cancer Cell*. – 2007. – Vol.12. – P. 9-22.
- 4 Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycininsensitive and raptorindependent pathway that regulates the cytoskeleton // *Curr. Biol*. – 2004. – Vol. 14. – P. 12961302.
- 5 Shiota C, Woo JT, Lindner J, Shelton KD, Magnuson MA. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability // *Dev. Cell*. – 2006. – Vol. 11 – P.583-589.
- 6 Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB // *Mol. Cell*. – 2006. – Vol.22. – P.159–168.