

УДК 57.052.6

Белок рабин-8 взаимодействует с GTP-азой Rheb и ингибирует фосфорилирование Ser235/Ser236 в белке S6 малой рибосомной субъединицы

А. А. Пархитко^{1,2,3*}, О. О. Фаворова¹, Е. Р. Henske^{2,3}¹ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, USA, 19111³Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 1 Blackfan Circle, Boston, USA, 02155

*E-mail: parhitko@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Серин/треониновая протеинкиназа mTOR, взаимодействуя с белками Raptor, mLST8, PRAS40 и Deptor, образует киназный комплекс mTORC1, играющий ключевую роль в регуляции биосинтеза белков, транскрипции, клеточного метаболизма, апоптоза и аутофагии, в частности посредством направленного фосфорилирования киназ белка S6 малой рибосомной субъединицы. Известно, что киназный комплекс mTORC1 активируется факторами роста и аминокислотами через активацию GTP-азы Rheb. В представленной работе впервые показано, что сверхэкспрессия в культуре клеток эмбриональной почки человека белка Rabin8 (далее – рабин-8), функционирующего в качестве фактора обмена гуаниновых нуклеотидов для GTP-азы Rab8, приводит к снижению фосфорилирования Ser235/Ser236 в рибосомном белке S6. Напротив, снижение экспрессии белка рабин-8 с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК, small interfering RNA) приводит к повышению уровня фосфорилирования Ser235/Ser236 в белке S6. Показано также, что рабин-8 связывается с GTP-азой Rheb. Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании ранее неизвестного механизма модуляции функциональной активности киназного комплекса mTORC1 и о регуляции управляемых им процессов, в первую очередь биосинтеза белков. Принимая во внимание роль рабина-8 как одного из важных регуляторов процесса образования клеточной реснички (цилиогенеза), можно предположить существование связи между этими процессами и образованием первичной реснички.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА комплекс mTORC1, Rheb, рабин-8, белок S6 малой рибосомной субъединицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМЕМ – питательная среда Игла в модификации Дульбекко; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; GAP-белки – активирующие GTP-азу белки; mTOR – протеинкиназа, мишень для рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin); Rheb – GTP-аза, гомолог белка Ras (Ras homolog enriched in brain); siРНК – малые интерферирующие РНК; TBST – буфер для блотинга (Tris-Buffered Saline and Tween 20).

ВВЕДЕНИЕ

Высококонсервативная серин/треониновая протеинкиназа mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень для рапамицина у млекопитающих) принадлежит к семейству фосфатидилинозитолкиназ PIKK (phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases) и является ключевым ферментом mTOR-сигнального пути, регулирующего накопление клеточной массы у многих эукариот. В качестве каталитической субъединицы mTOR входит в состав

двух функционально различных гетероолигомерных комплексов: mTORC1 и mTORC2. mTORC1 представляет собой функциональный димер, содержащий по две субъединицы каждого из белков: mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with sec-13), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) и Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) [1, 2]. Основная функция mTORC1 – фосфорилирование в ответ на сигналы внешней среды широкого спек-

тра эффекторов, регулирующих процессы белкового синтеза, клеточного деления, апоптоза и аутофагии [3, 4]. mTORC1 регулирует трансляцию путем прямого фосфорилирования белка 4E-ВР (translation initiation factor 4E binding protein), связывающегося с фактором инициации 4Е, и киназ S6K1 и S6K2 белков S6 малой рибосомной субъединицы [5]. Эти киназы, в свою очередь, активируют процессы трансляции, фосфорилируя белок S6, а также ряд других белков (SKAR, PDCD4, eEF-2K, eIF4B). Определение уровня фосфорилирования белка S6 с помощью фосфоспецифических антител против Ser235/Ser236 используется для оценки киназной активности комплекса mTORC1 [6].

Активность комплекса mTORC1 регулируется множеством различных стимулов, таких, как ростовые факторы, аминокислоты, глюкоза и кислород. При этом используются два основных механизма – направленные модификации компонентов этого комплекса или регуляция GTP-азы Rheb, которая в связанном с GTP состоянии взаимодействует непосредственно с mTORC1 и активирует его. Основной регулятор GTP-азы Rheb – это гетеродимерный комплекс, который состоит из двух белков-супрессоров опухолевого роста: активирующего GTP-азу белка (GAP-белка) туберина и гамартина, стимулирующего переход GTP-азы Rheb из активной GTP-связанной формы в неактивную GDP-связанную. Их инактивация приводит к тому, что GTP-аза Rheb находится в стабильно активной форме и активирует комплекс mTORC1. В результате повышается белоксинтезирующая активность и наблюдается неконтролируемое деление клеток [7].

Показано также, что туберин и гамартин влияют на формирование первичной реснички [8]. В образовании первичной реснички участвует и GTP-аза Rab8, и взаимодействующий с ней фактор обмена гуаниновых нуклеотидов рабин-8 [9], который активирует Rab8, стимулируя высвобождение GDP и связывание GTP [10].

Исходя из сказанного, мы предположили, что рабин-8 также может выполнять роль регулятора GTP-азы Rheb, участвующей в работе комплекса mTORC1. В представленной работе показано, что сверхэкспрессия белка рабин-8 приводит к снижению активности комплекса mTORC1, а подавление с помощью siРНК синтеза рабина-8, как и туберина, приводит к активации mTORC1. Методом коиммунопреципитации показано, что белок рабин-8 действительно взаимодействует с GTP-азой Rheb. На основе представленных данных можно заключить, что белок рабин-8, связываясь с GTP-азой Rheb, действует как негативный регулятор киназного комплекса mTORC1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и препараты

Культуру клеток эмбриональной почки человека HEK293 (АТСС, США) культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Gibco», США) или без нее. Использовали антитела к белку рабин-8 («Proteintech», США), туберину («Abcam»), Мус, β-актину и mTOR, фосфоспецифические антитела к Ser235/Ser236 рибосомного белка S6 («Cell Signaling», США) и кроличьи IgG («Santa Cruz Biotechnology», США).

Трансфекция

Для трансфекции культуры клеток HEK293 плазмидными конструкциями использовали реагент Eugene 6 («Roche», США), а различными siРНК – Trans-IT ТКО («Mirus», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Клетки HEK293 трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1, вектором, экспрессирующим рабин-8, контрольным вектором pCMVTag3A или вектором, экспрессирующим слитый белок Мус-Rheb, порознь или попарно. Через 24 ч после трансфекции клетки дважды промывали и добавляли среду с ростовыми факторами или без них. Через 24 ч после замены среды киназную активность комплекса mTORC1 анализировали по уровню фосфорилирования рибосомного белка S6 с помощью иммуноблотинга с использованием фосфоспецифических антител против Ser235/Ser236 белка S6. Клетки HEK293 также трансфицировали контрольной siРНК, siРНК против mРНК белка рабин-8 или туберина («Dharmacon», США), и через 24 ч после трансфекции клетки дважды промывали и добавляли среду с ростовыми факторами или без них.

Коиммунопреципитация

С целью изучения возможности коиммунопреципитации белка рабин-8 с Мус-Rheb и реципрокной коиммунопреципитации белка Мус-Rheb с белком рабин-8 и киназой mTOR клетки обрабатывали буфером для лизиса («Cell Signaling», США). Клеточные экстракты инкубировали с антителами к рабину-8 или Мус в течение 12 ч при 4°C. Полученные комплексы осаждали инкубацией с белок-А-агарозой в течение 1 ч при 4°C с последующим центрифугированием. Белки элюировали, добавляя буфер Лэммли, наносили на денатурирующий градиентный 4–20% полиакриламидный гель и после электрофореза переносили на поливиниловые мембраны (Immobilon-P, «Millipore», США). Мембраны выдерживали в буфере TBST (137 mM NaCl, 0.1% Твин-20, 20 mM Трис, pH 7.6) («Cell Signaling», США), содержащем 5% сухого молока, в течение 1 ч, а затем инкубировали с вы-

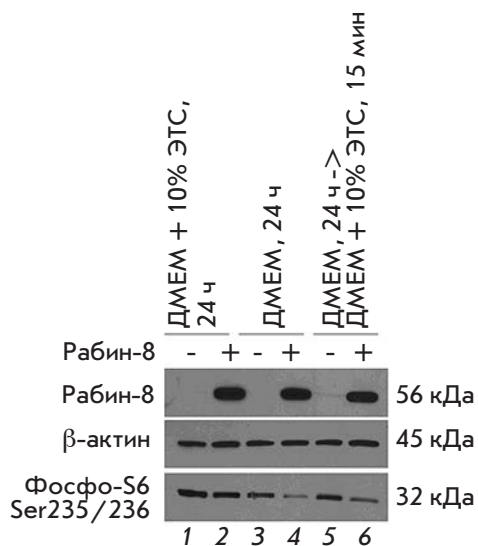


Рис. 1. Сверхэкспрессия рабина-8 в культуре клеток HEK293 снижает активность киназного комплекса mTORC1. Клетки трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1 (дорожки 1, 3, 5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (дорожки 2, 4, 6). Активность mTORC1 анализировали по уровню фосфорилирования рибосомного белка S6 с помощью иммуноблоттинга с фосфоспецифическими антителами против S6 (Ser235/Ser236) в среде, содержащей ростовые факторы (дорожки 1, 2), в отсутствие ростовых факторов (дорожки 3, 4) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожки 5, 6). Уровни рабина-8 и β-актина оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами.

бранными первичными антителами при 4°C в течение ночи, промывали 2 раза по 5 мин в буфере TBST и добавляли соответствующие вторичные антитела («Amersham», США). Мембраны промывали 3 раза по 10 мин в буфере TBST, хемилюминесцентный сигнал регистрировали при экспозиции с рентгеновской пленкой («Kodak», США), используя набор для хемилюминесценции («Perkin-Elmer», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рабин-8 снижает активность киназного комплекса mTORC1

Роль белка рабин-8 в регуляции активности комплекса mTORC1 мы выясняли с использованием наиболее часто применяемой в таких опытах клеточной линии HEK293 [11]. Клетки трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1 (рис. 1, дорожки 1, 3, 5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (рис. 1, дорожки 2, 4, 6). В случае контрольного вектора при наличии в среде ростовых факторов (рис. 1, дорожка 1) ком-

плекс mTORC1 активирован, о чем свидетельствует уровень фосфорилирования рибосомного белка S6 (нижняя панель). В отсутствие ростовых факторов (рис. 1, дорожка 3) происходит частичное ингибирование киназной активности mTORC1, а последующая кратковременная стимуляция клеток, выдержанных в таких условиях, средой, содержащей ростовые факторы (рис. 1, дорожка 5), приводит к полной реактивации комплекса mTORC1. Высокий уровень белка рабин-8, обусловленный трансфекцией клеток вектором, экспрессирующим рабин-8 (верхняя панель), не влиял на активность киназного комплекса mTORC1 (рис. 1, дорожка 2) в среде, содержащей ростовые факторы, но приводил к снижению активности mTORC1 в их отсутствие (рис. 1, дорожка 4) и при реактивации этого комплекса средой, содержащей ростовые факторы (рис. 1, дорожка 6).

Ингибирование экспрессии рабина-8 или туберина приводит к активации киназного комплекса mTORC1

Полученные при сверхэкспрессии рабина-8 данные о влиянии этого белка на активность киназного комплекса mTORC1 мы подтверждали с использованием siРНК – коротких синтетических РНК-дуплексов, которые в составе комплекса со специальными белками вызывают направленную дегградацию комплементарной им мРНК. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали siРНК, не имеющую комплементарной последовательности в геномных мРНК человека (контрольная siРНК), и siРНК против мРНК туберина – белка, который, как указывалось выше, образует гетеродимерный комплекс с гамартином. Этот комплекс ингибирует активность GTP-азы Rheb и соответственно киназного комплекса mTORC1. При трансфекции клеток контрольной siРНК (рис. 2, дорожки 1, 4, 7) так же, как и при трансфекции контрольным вектором (см. рис. 1), присутствие в среде ростовых факторов (рис. 2, дорожка 1) приводит к активации киназы mTORC1. В отсутствие ростовых факторов (рис. 2, дорожка 4) наблюдается ингибирование киназной активности mTORC1. При кратковременной (15 мин) стимуляции средой с ростовыми факторами клеток, выдержанных в среде без ростовых факторов в течение 24 ч (рис. 2, дорожка 7), происходит реактивация комплекса mTORC1. Снижение экспрессии как туберина, так и белка рабин-8, наблюдаемое при трансфекции siРНК против мРНК этих белков, стимулировало активность mTORC1 при наличии в среде ростовых факторов (рис. 2, дорожки 2, 3). В отсутствие ростовых факторов активность комплекса mTORC1 в клетках, трансфицированных siРНК против мРНК туберина, незначительно увеличивалась

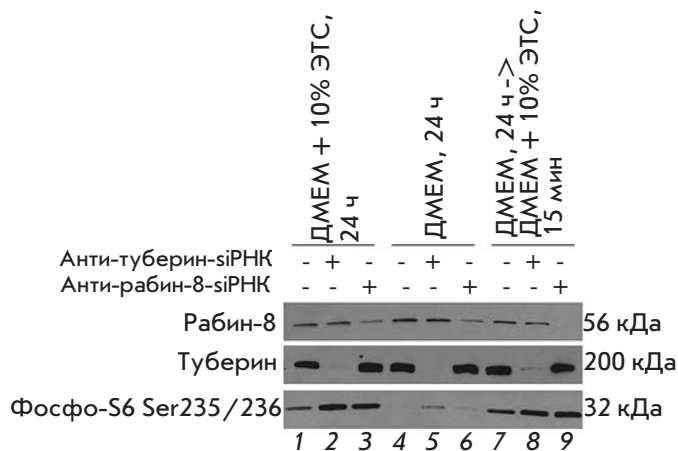


Рис. 2. Ингибирование экспрессии белка рабин-8 или туберина приводит к активации киназного комплекса mTORC1. Ингибирование экспрессии белка рабин-8 по механизму РНК-интерференции в культуре клеток HEK 293 приводит к активации киназного комплекса mTORC1 (дорожки 3, 9), как и в положительном контроле с антитубериновой siРНК (дорожки 2, 8). Активность комплекса mTORC1 анализировали как на рис. 1 в среде, содержащей ростовые факторы (дорожки 1–3), в отсутствие ростовых факторов (дорожки 4–7) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожки 7–9). Уровни рабина-8 и туберина оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами. Контрольная siРНК – дорожки 1, 4, 7.

(рис. 2, дорожка 5). При трансфекции siРНК против мРНК рабина-8 активность mTORC1 не изменялась (рис. 2, дорожка 6) по сравнению с трансфекцией контрольной siРНК, а при реактивации средой, содержащей ростовые факторы, активность mTORC1 была выше, чем в контроле (рис. 2, дорожки 8, 9).

Коиммунопреципитация белков рабин-8, Rheb и mTOR

Как следует из полученных нами результатов, рабин-8 является негативным регулятором киназного комплекса mTORC1. Возможность взаимодействия между рабином-8, Rheb и mTOR мы изучали при помощи трансфекции культуры клеток HEK293 одновременно контрольными векторами рсDNA3.1 и рСMVTag3A (рис. 3А, дорожка 1) или двумя векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (рис. 3А, дорожки 2–4), в среде, содержащей (рис. 3А, дорожки 1, 2) или не содержащей ростовые факторы (рис. 3А, дорожка 3), а также при последующей кратковременной стимуляции клеток,

выдержанных в течение 24 ч без ростовых факторов, средой, содержащей ростовые факторы (рис. 3А, дорожка 4). Для изучения взаимодействия рабина-8 и Rheb мы провели коиммунопреципитацию клеточных лизатов с антителами против рабина-8 и последующий иммуноблоттинг с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb (рис. 3Б). Оказалось, что взаимодействие Rheb с рабином-8 не зависит от присутствия ростовых факторов в среде (рис. 3Б, дорожки 2–4). При этом мы не обнаружили Rheb при иммунопреципитации с антителами против рабина-8 в контрольном лизате без экспрессии Мус-Rheb (рис. 3Б, дорожка 1) или в лизате, в котором для коиммунопреципитации использовали неспецифические контрольные кроличьи IgG (рис. 3Б, дорожка 5). Чтобы подтвердить взаимодействие белков рабин-8 и Rheb, мы провели реципрокную коиммунопреципитацию. Клеточные лизаты инкубировали с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb, а для последующего иммуноблоттинга использовали антитела против mTOR и рабина-8. Как и ожидалось, Rheb и mTOR взаимодействовали в присутствии ростовых факторов в среде (рис. 3Б, дорожки 2 и 4). Rheb и рабин-8 также взаимодействовали между собой в среде, содержащей ростовые факторы (рис. 3Б, дорожки 2 и 4), однако в отсутствие ростовых факторов мы не обнаружили как взаимодействия Rheb с рабином-8, так и Rheb с mTOR (рис. 3Б, дорожка 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе мы впервые показали, что рабин-8 регулирует фосфорилирование Ser235/Ser236 в рибосомном белке S6. Ранее было установлено, что Ser235/Ser236 фосфорилируется протеинкиназой S6K1 в результате активации киназного комплекса mTORC1, а ингибитор mTORC1, рапамицин, полностью блокирует фосфорилирование этих остатков при любых условиях [2]. В соответствии с этим уровень фосфорилирования Ser235/Ser236 в белке S6 можно рассматривать как удобный индикатор киназной активности mTORC1. Полученные нами данные позволяют предположить, что рабин-8 регулирует активность этого комплекса. Однако роль фосфорилирования белка S6 в регуляции белкового синтеза до конца не установлена. Так, получили линии мышей, в белке S6 у которых все подвергающиеся фосфорилированию аминокислотные остатки заменили нефосфорилируемыми остатками аланина, однако, уровень белкового синтеза в клетках различного типа у этих мышей остался таким же, как у мышей дикого типа [12].

Мы определяли уровень фосфорилирования Ser235/Ser236 белка S6 в различных условиях: при росте клеток в среде, содержащей ростовые фак-

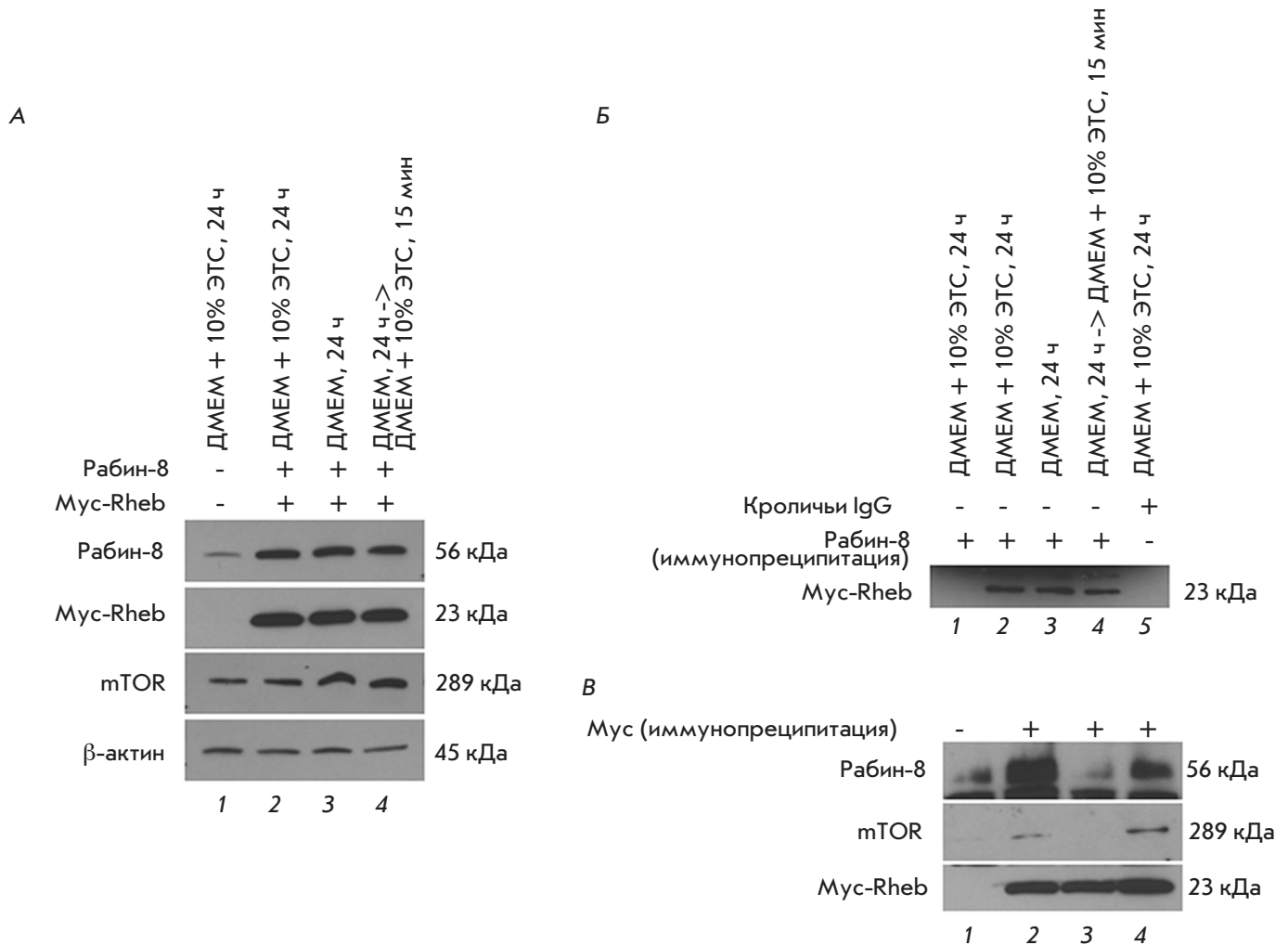


Рис. 3. Коиммунопреципитация белков рабин-8 и Rheb, экспрессированных в клетках HEK293 после их трансфекции соответствующими векторами. Уровни рабина-8, туберина, mTOR и β-актина оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами. **А** – Уровень экспрессии белков рабин-8, Мус-Rheb и mTOR после котрансфекции клеток контрольными векторами pcDNA3.1 и pCMVTag3A (дорожка 1) или векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (дорожки 2–4), в среде с ростовыми факторами (дорожки 1, 2), без ростовых факторов (дорожка 3) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожка 4). **Б** – Коиммунопреципитация лизатов как на рис. 3А с использованием антител к белку рабин-8 (дорожки 1–4) или с контрольными кроличьими IgG-антителами (дорожка 5) и последующим иммуноблотингом с антителами против Мус. Для иммунопреципитации с контрольными кроличьими IgG использовали лизат как на рис. 3А (дорожка 2). **В** – Коиммунопреципитация лизатов как на рис. 3А с использованием антител против эпитопа Мус и последующего иммуноблотинга с антителами против рабина-8, mTOR и Мус.

торы (ДМЕМ + 10% ЭТС), при выдерживании клеток в среде без ростовых факторов (ДМЕМ), а также при кратковременной стимуляции ростовыми факторами (ДМЕМ → ДМЕМ + 10% ЭТС) клеток, выдержанных в среде, не содержащей ростовые факторы. Так как регуляция киназного комплекса mTORC1 осуществляется на нескольких уровнях, использование различных условий роста позволяет лучше понять механизмы регуляции [13]. Во всех случаях

мы использовали среду ДМЕМ, содержащую аминокислоты, поскольку отсутствие аминокислот приводит к полному ингибированию киназного комплекса mTORC1 независимо от его негативного регулятора туберина [14]. В отсутствие ростовых факторов происходит активация GAP-белка туберина, стимулирующего переход GTP-азы Rheb из активной GTP-связанной в неактивную GDP-связанную форму, что приводит к ингибированию киназного комплекса

mTORC1 [15, 16]. В этих условиях любые изменения, ингибирующие GAP-активность туберина или независимо от туберина стимулирующие переход GTP-азы Rheb в активное состояние, будут активировать киназный комплекс mTORC1, что мы и наблюдали. Мы также использовали кратковременную стимуляцию ростовыми факторами клеток, выдержанных в среде без ростовых факторов, для дифференциации изменений активности киназного комплекса mTORC1, протекающих с разной скоростью. Мы обнаружили, что при росте клеток в полной среде, содержащей ростовые факторы, снижение экспрессии рабина-8 стимулировало активность mTORC1, но сверхэкспрессии рабина-8 недостаточно для ингибирования этого комплекса. В среде без ростовых факторов снижения экспрессии рабина-8 недостаточно для реактивации комплекса mTORC1, но сверхэкспрессия рабина-8 усиливает ингибирование киназного комплекса mTORC1. Сверхэкспрессия рабина-8 замедляла реактивацию киназного комплекса mTORC1, вызванную кратковременной стимуляцией средой с ростовыми факторами, при том, что снижение экспрессии рабина-8 стимулировало реактивацию. Эти результаты позволяют предположить, что рабин-8 подавляет активацию киназного комплекса mTORC1 ростовыми факторами.

Мы впервые показали, что рабин-8 связывается с основным регулятором киназного комплекса mTORC1 – GTP-азой Rheb, что важно для понимания механизма регуляции mTORC1 белком рабин-8. Однако нельзя исключить, что рабин-8 может взаимодействовать и с другими компонентами комплекса mTORC1, так как при иммунопреципитации мы смогли обнаружить в комплексе с рабином-8 и Rheb каталитическую субъединицу mTOR. Не исключена возможность и того, что рабин-8 может опосредованно взаимодействовать с Rheb – через неизвестный белок или в комплексе с туберином или гамартином. Однако, учитывая, что оба белка – и Rab8, и Rheb, относятся к семейству GTP-аз и участвуют в регуляции образования первичной реснички [9], мы предполагаем, что рабин-8 влияет на активность киназного комплекса mTORC1 через GTP-азу Rheb. В пользу этого предположения свидетельствуют также опыты по коиммунопреципитации, когда, используя антитела против эпитопа Мус в белке Мус-Rheb, мы не об-

наружили ослабления взаимодействия между белками рабин-8 и Rheb в среде без ростовых факторов. При этом взаимодействие между Rheb и mTOR было нарушено, что согласуется с ранее опубликованными данными [1]. Мы не обнаружили взаимодействия между белками рабин-8 и Rheb в опытах по реципрокной коиммунопреципитации с белками против рабина-8, что может объясняться разной аффинностью антител к данным белкам.

Возможность взаимодействия белков рабин-8 и Rheb позволяет предположить новый Rheb-зависимый механизм регуляции образования первичной реснички, не зависящий от активности киназного комплекса mTORC1 [8]. Согласно этому предположению, при взаимодействии Rheb и рабина-8 происходит перераспределение функции Rheb от регуляции комплекса mTORC1 к регуляции образования первичной реснички. В последнее время была обнаружена связь между нарушениями функции цилиогенеза и различными заболеваниями, выделенными в отдельную группу цилиопатий. К заболеваниям этой группы относятся, в частности, поликистозная болезнь почек, синдром Барде-Бидля и другие [17]. Недавно выявили связь между нарушениями цилиогенеза и ожирением [18]. Помимо этого, первичная ресничка регулирует активность сигнальных путей Hedgehog и Wnt, нарушение которых связано с развитием опухолей в различных органах [19]. Стоит также отметить, что активация киназного комплекса mTORC1 наблюдается во многих типах опухолей [20] и необходима для их прогрессии. Следовательно, понимание механизмов регуляции и взаимосвязи комплекса mTORC1 и процессов образования первичной реснички должно привести к появлению новых подходов к лечению цилиопатий, ожирения и онкологических заболеваний. ●

Работа выполнена в рамках межинститутского сотрудничества между Российским государственным медицинским университетом им. Н.И. Пирогова (кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии) и Фокс-Чейзовским онкологическим центром (США, Филадельфия). Авторы благодарят О.Г. Кулакову и Д.И. Хабибуллина за полезные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 310–322.
2. Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2011. V. 12. P. 21–35.
3. Chan E.Y. // Sci. Signaling. 2009. V. 2. P. pe51.
4. Mizushima N. // Curr. Opin. Cell Biol. 2010. V. 22. P. 132–139.
5. Wullschlegel S., Loewith R., Hall M.N. // Cell. 2006. V. 124. P. 471–484.
6. Ma X.M., Blenis J. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2009. V. 10. P. 307–318.
7. Astrinidis A., Henske E.P. // Oncogene. 2005. V. 24. P. 7475–7481.

8. Hartman T.R., Liu D., Zilfou J.T., Robb V., Morrison T., Watnick T., Henske E.P. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 151–163.
9. Nachury M.V., Loktev A.V., Zhang Q., Westlake C.J., Peranen J., Merdes A., Slusarski D.C., Scheller R.H., Bazan J.F., Sheffield V.C., et al. // *Cell.* 2007. V. 129. P. 1201–1213.
10. Hattula K., Furuholm J., Arffman A., Peranen J. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. P. 3268–3280.
11. Sancak Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A.L., Nada S., Sabatini D.M. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 290–303.
12. Ruvinsky I., Sharon N., Lerer T., Cohen H., Stolovich-Rain M., Nir T., Dor Y., Zisman P., Meyuhos O. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2199–2211.
13. Peterson T.R., Laplante M., Thoreen C.C., Sancak Y., Kang S.A., Kuehl W.M., Gray N.S., Sabatini D.M. // *Cell.* 2009. V. 137. P. 873–886.
14. Smith E.M., Finn S.G., Tee A.R., Browne G.J., Proud C.G. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 18717–18727.
15. Ballif B.A., Roux P.P., Gerber S.A., MacKeigan J.P., Blenis J., Gygi S.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 667–672.
16. Manning B.D., Tee A.R., Logsdon M.N., Blenis J., Cantley L.C. // *Mol. Cell.* 2002. V. 10. P. 151–162.
17. Hildebrandt F., Benzing T., Katsanis N. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 364. P. 1533–1543.
18. Mok C.A., Heon E., Zhen M. // *Clin. Genet.* 2010. V. 77. P. 18–27.
19. Duldulao N.A., Li J., Sun Z. // *Protein Cell.* 2010. V. 1. P. 726–736.
20. Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. P. 1075–1083.