

Министерство высшего образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

На правах рукописи

КОЧЕТКОВА

Елена Юрьевна

**РОЛЬ АУТОФАГИИ В ОТВЕТЕ RAS-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ КИНАЗНЫХ ИНГИБИТОРОВ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Поспелова Татьяна Викторовна

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2019

Оглавление

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	5
1. Введение.....	6
1.3. Научная новизна.....	9
1.4. Теоретическое и практическое значение работы	9
1.5. Апробации	10
1.6. Личный вклад автора.....	10
1.7. Финансовая поддержка	11
1.8. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ	11
2. Обзор литературы	14
2.1. Трансформация клеток.....	14
2.2. Ras/Raf/MEK/ERK-каскад.....	17
2.2.1. Ras/Raf/MEK/ERK-сигнальный каскад, его функции и другие MAP-каскады.....	17
2.2.2. Ras и его мишени в опухолевой трансформации	19
2.3. Аутофагия.....	21
2.3.1. Стадии аутофагии и их регуляция	21
2.3.2. Митофагия	25
2.3.3. Роль аутофагии в злокачественной трансформации клеток.....	26
2.3.4. Аутофагия в ответе на любое воздействие на клетку	28
2.4. mTOR-киназа, ее функции и роль в злокачественной трансформации ...	30
2.4.1. Структура и функции mTOR.....	30
2.4.2. Применение ингибиторов mTOR-киназы в противоопухолевой терапии	34
2.5. Клеточное старение, его регуляция и роль в норме и в канцерогенезе ...	35
2.5.1. Особенности пространственной организации старых клеток.....	36
2.5.2. Взаимоотношение процессов аутофагии и старения	40
2.6. Типы клеточной гибели.	41
2.6.1. Апоптоз.....	42
2.6.2 Взаимоотношения аутофагической гибели и апоптоза	44
3. Материалы и методы	47
3.1. Материалы	47
3.1.1. Клеточные линии	47

3.1.2. Ингибиторы	47
3.1.3. Антитела	48
3.2. Методы.....	50
3.2.1. Трансфекция клеток.....	50
3.2.2. Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста	50
3.2.3. Оценка пролиферативной активности клеток	50
3.2.4. Оценка клоногенной выживаемости клеток	51
3.2.5. Проточная цитометрия	51
3.2.6. Иммунофлуоресценция	51
3.2.7. Анализ морфологии клеток.....	52
3.2.8. Вестерн-блоттинг	52
3.2.9. Анализ фрагментации ДНК методом электрофореза в агарозном геле..	53
3.2.10. Анализ активности каспаз.....	53
3.2.11. Анализ активности протеасом.....	54
3.2.12. Оценка целостности митохондрий.....	54
3.2.13. Измерение количества активных форм кислорода (АФК)	54
3.2.14. Измерение уровня лактата в среде культивирования	55
3.2.15. Анализ активности лизосом с помощью LysoTracker Green	55
3.2.16. Трансмиссионная электронная микроскопия	55
3.2.17. Анализ ассоциированной со старением бета-галактозидазы	55
3.2.18. Измерение содержания белка в клетках	55
3.2.19. Оценка размера клеток	56
3.2.20. Анализ активности лизосомальной бета-галактозидазы	56
3.2.21. Статистическая обработка	56
4. Результаты	57
4.1. Трансформанты ERas восстанавливают жизнеспособность при ингибировании MEK/ERK-пути за счет активации цитопротективной AMPK-зависимой аутофагии.....	57
4.2. Стареющие клетки не способны завершать аутофагию в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути и гибнут апоптозом.	70
4.2. Нарушение терминации аутофагии в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK-пути связано с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом в цитоплазме.....	88

4.3. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках приводит к релокализации онкогенного Ras с цитоплазматической мембраны в цитозоль, что может блокировать его анти-апоптотические функции.....	90
4.5 Комбинация индуктора старения и ингибитора MEK/ERK снижает жизнеспособность Bcl2-оверэкспрессирующих клеток	92
4.6. Подавление активности mTORC1 не приводит к восстановлению AMPK-зависимой аутофагии и жизнеспособности стареющих клеток при ингибировании MEK/ERK-пути.....	95
4.7. MEK/ERK-путь необходим для активации аутофагии в ответ на ДНК-повреждение, вызванное облучением.....	108
4.8. Индукция старения делает KRas-экспрессирующие клетки человека A549 чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути.	113
5. Обсуждение	116
6. Заключение и выводы.....	125
6.1. Заключение	125
6.2. Выводы.....	126
7. Список литературы	127
БЛАГОДАРНОСТИ	149

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АМПК - 5'-AMP-activated protein kinase

Atg – Autophagy-related genes

4ЕВР1 – Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1.

ERK – Extracellular signal-regulated kinase

HDAC – Histone Deacetylase, деацетилаза гистонов

HDACI – Histone Deacetylase Inhibitor, ингибитор гистоновых деацетилаз

LAMP1 – Lysosome-Associated Membrane Protein 1

LC3 - Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

МАРК – Mitogen-Activated Protein Kinase

МЕК – Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase

mTOR – mammalian Target of Rapamycin

mTORC1 – mTOR Complex 1

mTORC2 – mTOR Complex 2

NaBut – бутират натрия

PI3K – Phosphatidil-Inositol-3-kinase

SASP – Senescence-associated secretory phenotype, ассоциированный со старением секреторный фенотип

TASCC – TOR-Autophagy Special Coupling Compartment

TSC1,2 – Tuberous sclerosis complex 1,2

Ulk1 - Unc-51-like kinase 1

АФК – Активные формы кислорода

1. Введение

1.1. Актуальность проблемы

Несмотря на значительный прогресс в борьбе с опухолевыми заболеваниями, они остаются, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), одной из основных причин смерти человека. Злокачественная трансформация клетки – это многоэтапный процесс, связанный с активацией онкогенов и инактивацией опухолевых супрессоров (Hanahan and Weinberg, 2000). В ходе малигнизации клетка приобретает способность к неограниченной пролиферации, независимой от ростовых факторов и субстрата, и геномную нестабильность (Hanahan and Weinberg, 2011). Основные опухолевые супрессорные программы, которые являются барьерами на пути перерождения клеток – это программы апоптоза и клеточного старения. В ходе становления трансформированного фенотипа эти программы супрессируются (Hanahan and Weinberg, 2011). В опухолевых клетках старение можно реактивировать разными способами, в первую очередь повреждением ДНК. В процессе старения клетки сохраняют жизнеспособность и развивают гипертрофный, гиперсекреторный фенотип, который отвечает за секрецию цитокинов и ростовых факторов, способствующих трансформации микроокружения (Rodier and Campisi, 2011; Campisi, 2011). Более того, в определенных условиях старение может становиться обратимым, и клетки вновь начнут пролиферировать. Таким образом, требуется искать пути, которые позволят вновь активировать апоптоз или иные типы запрограммированной клеточной гибели, такие, как некроз и аутофагическая гибель. Несмотря на то, что аутофагия ранее представлялась как механизм спасения клеток в ответе на стресс, было обнаружено, что аутофагия в определенных условиях может вызывать регулируемую клеточную гибель (Kroemer and Levine, 2008).

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что процесс аутофагии активируется в раковой клетке в ответ на действие любых

противоопухолевых агентов. Аутофагия – это эволюционно консервативный процесс, при котором избыточные или неправильно упакованные белки, а также поврежденные органеллы изолируются в двумембранные везикулы – аутофагосомы, и перевариваются при последующем слиянии аутофагосом с лизосомами (Levine and Klionsky, 2004). Аутофагия способствует поддержанию гомеостаза клетки в норме, а также в ответе клетки на стресс и при нехватке питательных веществ (Levine et al, 2011). При действии на опухолевую клетку тумор-супрессорных агентов аутофагия может играть цитопротективную роль, практически отменяя действие цитостатиков. Уникальным примером в этом отношении являются Ras-экспрессирующие опухолевые клетки, жизнеспособность и туморогенность которых зависят от аутофагии (Kim et al, 2011; Guo et al, 2011; Guo et al, 2013; Guo et al, 2016).

Малая ГТФаза Ras относится к одному из наиболее часто мутирующих онкогенов. Мутации Ras встречаются примерно в 30% всех опухолей (Fernando-Medarde and Santos, 2011; Lawrence et al, 2014; Tao et al, 2016). Современная стратегия борьбы с Ras-экспрессирующими клетками связана с разработкой киназных ингибиторов Ras/Raf/MEK/ERK-пути. Однако, несмотря на активные разработки ингибиторов, показано, что Ras-экспрессирующие клетки могут быть устойчивыми к действию этих ингибиторов (Kiessling and Rogler, 2015). Важным механизмом развития толерантности в данном случае является аутофагия, активирующаяся в ответ на действие киназных ингибиторов. Аутофагия в Ras-экспрессирующих клетках противостоит действию цитостатиков, поддерживая целостность митохондрий, от которых зависят жизнеспособность и туморогенный потенциал Ras-клеток (Guo, 2011; Guo et al, 2016). Онкогенная активация Ras ведет к конститутивной активности нижележащих сигнальных каскадов, в частности, Ras/Raf/MEK/ERK-каскада, который, в свою очередь, активирует нижележащие мишени. В их число входит киназа mTOR, mammalian Target of Rapamycin (Ma et al, 2005; Carriere et al, 2011), являющаяся ключевым регулятором многих процессов в клетке, прежде всего известная как регулятор старения и аутофагии. В клетках млекопитающих mTOR формирует два

комплекса – mTOR Complex 1 (mTORC1) и mTOR Complex 2 (mTORC2). В Ras-экспрессирующих опухолевых клетках mTORC1 конститутивно активен. mTORC1 стимулирует синтез белков, липидов и нуклеотидов, одновременно ингибируя катаболические процессы, через подавление аутофагии, и способствует, таким образом, активной клеточной пролиферации. Аутофагия в клетке находится под контролем двух основных киназ AMPK и mTOR (Kim et al, 2011). При действии на опухолевую клетку повреждающих агентов активируется AMPK, которая ингибирует mTOR, позволяя развиваться и завершиться процессу цитопротективной аутофагии. Особенностью старых клеток является конститутивно высокая независимая от пула аминокислот и митогенных сигналов, активность mTOR, ингибирующая AMPK- активированную аутофагию, но поддерживающая базальный уровень аутофагии, отвечающий за жизнеспособность клеток. Следовательно, один из главных маркеров старения - конститутивно высокая активность mTOR при действии цитостатиков и киназных ингибиторов, может быть фактором, лишаящим аутофагию ее цитопротективных свойств и вызывающим гибель поврежденных клеток. Таким образом, процессы старения, аутофагии и канцерогенеза тесно связаны и определяют жизнеспособность опухолевых клеток, а целенаправленное их таргетирование в Ras-экспрессирующих клетках будет способствовать их гибели.

1.2. Цели и задачи

Цель работы: использовать экспериментальные подходы, основанные на инактивации аутофагии при одновременном действии индукторов старения и киназных ингибиторов Ras-ERK пути, позволяющие более эффективно элиминировать Ras-трансформированные опухолевые клетки.

Задачи:

1. Оценить эффективность антипролиферативного действия ингибитора MEK/ERK-пути по изменению жизнеспособности и подавлению пролиферативной активности в контрольных и стареющих Ras-экспрессирующих опухолевых клетках.
2. Исследовать закономерности прохождения разных стадий аутофагического ответа в стареющих Ras-трансформантах при подавлении MEK/ERK-пути, вызывающем апоптотическую гибель.
3. Оценить жизнеспособность Ras-трансформантов, индуцированных к старению, при подавлении активности комплекса mTORC1, являющегося регулятором аутофагии.
4. Установить роль MEK/ERK-пути в регуляции аутофагического ответа и поддержании жизнеспособности клеток после ДНК-повреждающего действия ионизирующего облучения.

1.3. Научная новизна

В исследовании показан новый способ массового уничтожения Ras-экспрессирующих опухолевых клеток грызунов и человека, который основан на использовании киназных ингибиторов Ras-пути совместно с ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия, индуцирующим процесс клеточного старения. Неспособность стареющих клеток развивать полноценную цитопротективную аутофагию в ответ на подавление MEK/ERK обусловлена высокой активностью mTORC1, становлением гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа и формированием TASC-компарментов, которые не позволяют аутофагосомам сливаться с лизосомами при подавлении активности MEK/ERK.

1.4. Теоретическое и практическое значение работы

Полученные в исследовании результаты имеют фундаментальное значение для понимания роли аутофагии в поддержании жизнеспособности Ras-

трансформированных опухолевых клеток при действии противоопухолевых агентов. В работе показана уникальная чувствительность индуцированных к старению Ras-трансформированных клеток к действию киназного ингибитора MEK/ERK-пути. Полученные данные позволяют предложить существенно новую стратегию борьбы с Ras-трансформированными клетками, способными приобретать толерантность к противоопухолевым ингибиторам за счет аутофагии, что может иметь практическое значение для разработки противоопухолевой терапии.

1.5. Апробации

Полученные в работе результаты были доложены на: V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института Цитологии РАН, 2017; International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (May 16th-19th, 2017, Paris, France); Cell Symposium: Aging and Metabolism. Sitges, Spain, 9 – 12 июля 2016; Клеточная биология: проблемы и перспективы. 2 - 5 октября 2017, Санкт-Петербург; VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 25–27 апреля 2018, Санкт-Петербург; 26th Euroconference on apoptosis. Cell Death in disease: from small molecules to translational medicine. 10-12 October 2018, Saint-Petersburg; Научной конференции «Современные проблемы физико-химической и клеточной биологии: от молекул к живым системам». Москва, 24-25 октября 2018г.

1.6. Личный вклад автора

Автором выполнен анализ литературных данных по теме исследования, получение основных результатов, написание текстов диссертации, подготовка статей и докладов на конференции; культивирование клеточных культур и выполнение всех экспериментальных процедур. Трансмиссионная электронная микроскопия была выполнена совместно с сотрудниками лаборатории морфологии клетки Мартыновой Мариной Георгиевной и Быстровой Ольгой Алексеевной). Результаты проточной цитометрии были получены совместно с Аксеновым Николаем Дмитриевичем, работа с рентгеновским облучателем осуществлялась Талецким Сергеем Владимировичем.

1.7. Финансовая поддержка.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №14-50-00068.

1.8. Список опубликованных по теме диссертации печатных работ

По теме диссертации опубликовано 6 статей и 4 тезисов.

1. Кочеткова Е.Ю., Быкова Т.В., Зубова С.Г., Поспелова Т.В. Роль MEK/ERK-пути в регуляции HDAC1-индуцированного старения трансформированных эмбриональных фибробластов крысы. Цитология 2014; 56 (8) 581 – 590.
2. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Поспелов В.А., Поспелова Т.В. MEK/ERK-путь необходим для поддержания цитопротективной аутофагии после облучения трансформантов *E1A+cHa-Ras*» Цитология 2016, №58 (12): 947 – 954
3. Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV, Demidov ON. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. Oncotarget 2016; 7 (21): 31563 – 31571. doi: 10.18632/oncotarget.7325.
4. Кочеткова Е.Ю., Демидов О.Н. Влияние регуляторного каскада Wip1-p53 на ответ клеток при действии бутирата натрия и ингибитора MEK/ERK-сигнального пути. Цитология 2017. 59 (4): 285–289

5. Targeted elimination of senescent Ras-transformed cells by suppression of MEK/ERK pathway. Elena Y. Kochetkova, Galina I. Blinova, Olga A. Bystrova, Marina G. Martynova, Valery A. Pospelov, Tatiana V. Pospelova. *Aging* 2017, 9 (11): 2352 - 2375. doi: 10.18632/aging.101325.
6. Suppression of mTORC1 activity in senescent Ras-transformed cells neither restores autophagy nor abrogates apoptotic death caused by inhibition of MEK/ERK kinases. Kochetkova EY, Blinova GI, Bystrova OA, Martynova MG, Pospelov VA, Pospelova TV. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10 (11): 3574 - 3589. doi: 10.18632/aging.101686.
7. V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института Цитологии РАН. Мини-симпозиум «Молекулярная онкология». Тезисы. Подавление RAS/RAf/MEK/ERK-пути приводит к апоптозу *Ras*-трансформированных клеток, претерпевающих HDACi-индуцированное старение. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Зубова С.Г., Быкова Т.В., Пospelova Т.В.
8. International Cell Senescence Association (ICSA) Conference (May 16th-19th, 2017, Paris, France). Тезисы. Targeting MEK/ERK pathway decreases expression of senescence markers and results in apoptotic death of HDACi-senescent tumor cells. E. Kochetkova, G. Blinova, M. Martynova, O. Bystrova, V. Pospelov, T. Pospelova
9. Клеточная биология: проблемы и перспективы. 2 - 5 октября 2017г. Тезисы. Стареющие *Ras*-трансформированные клетки не реализуют протективную аутофагию при ингибировании MEK/ERK-сигнального пути. Соавторы: Блинова Г.И., Мартынова М.Г., Быстрова О.А., Пospelov В.А, Пospelova Т.В.
10. VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 25–27 апреля 2018 года, Санкт-Петербург. Тезисы. MEK/ERK-путь контролирует аутофагию в стареющих *Ras*-экспрессирующих трансформантах через регуляцию активности лизосом. Кочеткова Е.Ю., Блинова Г.И., Пospelov В.А., Пospelova Т.В.

2. Обзор литературы

2.1. Трансформация клеток

Согласно данным ВОЗ, раковые заболевания являются одной из основных причин смерти. Несмотря на годы исследований, многое в механизмах злокачественной трансформации далеко от понимания.

Преобразование нормальной клетки в злокачественную – это комплексный, многоэтапный процесс, ключевыми событиями в котором являются активация онкогенов, инактивация опухолевых супрессоров и потеря контроля стабильности теломер (Hanahan and Weinberg, 2000). Злокачественной трансформации противостоят тумор-супрессорные программы программируемой клеточной гибели и старения, следовательно, для преобразования нормальной клетки в раковую необходимо подавление этих программ. С этими программами связана активность опухолевых супрессоров - белков, чья функция направлена на контроль процессов в клетке с целью не допустить злокачественную трансформацию либо активировать вышеупомянутые тумор-супрессорные программы, если злокачественная трансформация уже была инициирована. Самым известным опухолевым супрессором является p53 (Trp53), чья инактивация наблюдается в более чем 50% опухолей (Levine, 1997). В норме p53 активируется в ответ на повреждения ДНК, вызванные гено- и хемотоксическим стрессом, а также нарушениями в работе систем репарации, на внеплановую или повышенную экспрессию онкогенов, а также на вирусную инфекцию, гипоксию, нарушения в метаболических процессах клетки (Vousden and Lane, 2007). Активировавшись, p53 запускает экспрессию широкого спектра генов, в число которых входят гены про-апоптотических белков семейства Bcl2 (Hemann and Lowe, 2006). Таким образом, p53 является важнейшим компонентом противостояния злокачественной трансформации, и долгое время разработки стратегий терапии опухолей были связаны с попытками реактивировать активность p53. Однако, как показали исследования, механизмы, регулирующие жизнеспособность и устойчивость

опухолевых клеток к терапии, гораздо сложнее и вовлекают в себя не только инактивацию p53.

Супрессировать апоптоз могут сами онкогены, в частности онкогенный Ras, например, через подавление FasL-сигналинга (Sun et al, 2015). Кроме того, в число мишеней ERK1,2-киназ – down-stream-компонентов Ras/Raf/MEK/ERK-каскада – входят антиапоптотические белки семейства Bcl, таким образом, Ras супрессирует апоптоз и на уровне митохондрий. Антиапоптотические функции Ras являются одним из факторов, затрудняющих терапию Ras-экспрессирующих опухолей.

Раковым клеткам присущ ряд характеристик (hallmarks): способность к неограниченной пролиферации, высокая генетическая нестабильность, которая поставляет для отбора новые генетические комбинации, репрограммирование энергетического метаболизма и способность избегать действия защитных механизмов иммунитета (Hanahan and Weinberg, 2011).

Злокачественные клетки поддерживают приобретенную способность к нерегулируемой пролиферации разными способами. Избыточное количество рецепторов к факторам роста вследствие оверэкспрессии кодирующих их генов усиливает чувствительность клеток к митогенным сигналам. Кроме того, раковые клетки могут сами производить необходимые им факторы роста либо стимулировать на производство клетки микроокружения. С другой стороны, конститутивная активность нижележащих сигнальных каскадов вследствие мутации белков-участников также позволяет раковым клеткам пролиферировать независимо от факторов роста (Hanahan and Weinberg, 2011).

Наряду со способностью к нерегулируемой пролиферации, претерпевшие злокачественную трансформацию клетки характеризуются репрограммированием метаболизма, чтобы поддерживать рост и пролиферацию. Особенность энергетического метаболизма, присущая раковым клеткам, была впервые описана Отто Варбургом (Warburg, 1930; 1956; 1956). Нормальные клетки в аэробных условиях расщепляют глюкозу до пирувата в ходе гликолиза в цитозоле. Пируват переносится в митохондрии и там расщепляется до CO₂, с образованием АТФ. В

анаэробных условиях баланс смещен в сторону гликолиза, и в митохондриях идет меньше пирувата. В раковых клетках даже в присутствии кислорода преобладает гликолиз (т.н. аэробный гликолиз). У гликолиза значительно меньше выход АТФ по сравнению с окислительным фосфорилированием в митохондриях - 2 молекулы против 36, и раковой клетке необходимо компенсировать снизившиеся уровни АТФ. Для этого клетки могут стимулировать активность транспортеров глюкозы, в частности, Glut1 (Jones and Thompson, 2009). Тем не менее, митохондрии по-прежнему сохраняют высокую активность во многих видах опухолей. Особо уникальными в этом плане являются Ras-трансформированные опухолевые клетки, в которых большая часть АТФ производится именно за счет окислительного фосфорилирования (Zong et al, 2016). Также было показано, что активность цикла трикарбоновых кислот, а также поставляемые митохондриями в определенном количестве активные формы кислорода необходимы для пролиферации Ras-трансформированных клеток и формирования Ras-экспрессирующих опухолей *in vivo* (Weinberg et al, 2010). Митохондрии служат центральным узлом в координации катаболизма, анаболизма и сигналинга клеток (Zong et al, 2016). Аутофагия необходима Ras-экспрессирующим клеткам в том числе потому, что она поддерживает их уникальный, зависящий от митохондриального метаболизма.

Показано, что во многих опухолях наблюдается нарушение регуляции активности mTOR (Populo et al, 2012). Повышенная активность mTOR поддерживает метаболизм постоянно пролиферирующих клеток, в связи с чем активно разрабатываются различные ингибиторы mTOR (Janes and Fruman, 2008). В Ras-экспрессирующих клетках mTOR, являющийся одной из мишеней Ras/Raf/MEK/ERK-каскада, конститутивно активен и участвует в поддержании их жизнеспособности.

Характеристики опухолевых клеток, серьезно осложняющая терапию рака – устойчивость к противоопухолевым препаратам (drug resistance) и к метастазированию. Устойчивость к противоопухолевым препаратам связана с активацией в клетке цитопротективных процессов и подавления апоптоза, а

также повышением экспрессии генов ABC-транспортеров, обеспечивающих т.н. множественную лекарственную устойчивость (Multi-drug resistance, MDR). Трансформированная клетка способна покинуть опухоль, выйти в циркуляцию в кровеносных сосудах, затем инвазировать в новое место и там сформировать очаг новой опухоли. В норме клетка постоянно контактирует с соседними клетками и межклеточным матриксом; потеря этих связей запускает программируемую гибель клетки. Нарушение экспрессии генов, регулирующих контакты клетка-клетка и клетка-матрикс, наблюдается в агрессивных карциномах (Hanahan and Weinberg, 2011). Для осуществления инвазии клетки карциномы претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход – программу, играющую важную роль в эмбриональном развитии организма.

Все те характеристики, которыми обладают опухолевые клетки, приобретаются благодаря многочисленным перестройкам генома. Определенные мутации могут дать селективное преимущество, в результате чего образуется субклон, способный к неконтролируемому росту и доминирующий в локальном участке ткани.

2.2. Ras/Raf/MEK/ERK-каскад

2.2.1. Ras/Raf/MEK/ERK-сигнальный каскад, его функции и другие MAP-каскады

Показано, что в 30% опухолей встречаются онкогенные мутации Ras. Несмотря на то, что частота встречаемости мутаций Ras ниже, чем, например, мутаций p53, Ras-трансформированные опухоли плохо поддаются терапии из-за свойств, приобретаемых клетками при Ras-трансформации.

Ras относится к семейству малых ГТФаз. ГТФазы представляют собой большое семейство белков, способных связывать и гидролизовать ГТФ. Малые ГТФазы активны в ГТФ-связанной форме. Гидролиз ГТФ в ГДФ ведет к «выключению» ГТФазы. Надо отметить, что сами по себе ГТФазы

характеризуются очень низкой активностью гидролиза ГТФ. За гидролиз ГТФ отвечают GAP, а за образование ГТФ для активации ГТФазы - GEF.

Идентифицированы 4 изоформы Ras: Ha-Ras, N-Ras, Ki-Ras 4A и Ki-Ras 4B, 2 последние образуются в результате альтернативного сплайсинга. Ras функционирует, будучи встроенным в мембрану (клетки либо органелл – ЭПР, Гольджи, митохондрий). Для того, чтобы встроиться в мембрану, Ras претерпевает модификации: его фарнезилирует фарнезил-трансфераза либо геранилгеранилирует геранилгеранил-трансфераза. Эти модификации осуществляется по цистеину (McCubrey et al, 2007).

Активность Ras-ERK сигнального каскада осуществляет передачу сигнала от рецепторов на мембране к транскрипционным факторам и прочим мишеням. Когда с рецепторами связываются лиганды (цитокины, факторы роста, митогены), происходит активация комплекса Shc/Grb2/SOS. Этот комплекс стимулирует замену ГДФ на ГТФ, вследствие чего Ras претерпевает конформационные изменения, активируется и привлекает нижележащий Raf, который претерпевает димеризацию и фосфорилирование по различным сайтам с последующей активацией. Raf – это серин-треониновая киназа. Далее Raf активирует нижележащие киназы MEK1,2 (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase). MEK – это киназы двойной специфичности, они осуществляют фосфорилирование не только по серин/треонину, но и по тирозину. Мишенями MEK1,2 являются киназы ERK1,2 (Extracellular-signal-regulated kinases 1,2). ERK1,2 имеют множество мишеней в ядре (транскрипционные факторы) и в цитоплазме. В число транскрипционных факторов, активируемых ERK1,2, входят Ets-1, c-Jun, c-Fos и c-Myc, а также CREB. Кроме того, ERK-киназы опосредованно активируют транскрипционный фактор NF-κB, фосфорилируя и подавляя таким образом его ингибитор IKK. Спектр цитоплазматических мишеней ERK-киназ не менее широк, он включает протеин-киназы семейства RSK, ряд фосфатаз, белки-регуляторы апоптоза, фосфолипазу A2 (Yoon and Seger, 2006).

Интересно отметить, что ERK1 и ERK2, по всей видимости, различаются по функциям. Известно, что ERK2-нокаутные клетки не могут поддерживать

пролиферацию и рост опухолей (Bessard et al, 2006; Vantaggiato et al., 2006). Кроме того, показано, что ERK2-нокаутные мыши гибнут в ходе эмбрионального развития, в то время как ERK1-нокаутные мыши вполне жизнеспособны и имеют лишь дефекты в формировании тимуса (Pages et al, 1999; Yao et al, 2003; Pages and Pouyssegur, 2004). Можно сделать предположение, что ERK2 может компенсировать отсутствие ERK1, а ERK1 компенсировать недостаток ERK2 не способна.

Ras-ERK сигнальный путь входит в число т.н. MAP-киназных (Mitogen-activated proteins) каскадов. Каждый из входящих в эту группу сигнальных путей состоит из как минимум трех киназ, чье действие приводит к активации мультифункциональной MAP-киназы (ERK в случае Ras-ERK-пути). Кроме Ras/Raf/MEK/ERK-каскада, в число MAP-каскадов входят: JNK-каскад, каскад киназы p38, каскад киназы ERK5, а также мало изученные каскады киназ ERK3, ERK7, NLK (Pearson et al, 2001). Jnk и p38 известны как стресс-киназы, их активация связана с ответом на негативные воздействия. Несмотря на то, что основной мишенью Ras является Raf/MEK/ERK, Ras имеет много других мишеней, в число которых входят стресс-киназные каскады. Способность Ras использовать свои альтернативные мишени для активации цитопротективных процессов в ответ на ингибиторы компонентов Raf/MEK/ERK-пути осложняет разработку стратегий терапии Ras-экспрессирующих клеток, поэтому понимание того, как регулируются цитопротективные процессы в Ras-трансформированных клеток важно для поиска путей элиминации этих клеток.

2.2.2. Ras и его мишени в опухолевой трансформации

Онкогенные мутации Ras были выявлены благодаря его способности трансформировать имморталильные клетки линии NIH/3T3. Мутантный Ras несет точечные мутации в кодонах 12, 13 и 61 (Bos, 1989). Эти мутации ведут к конститутивной, независимой от наличия-отсутствия лиганда активности Ras. По статистике, наиболее часто онкогенным мутациям подвергается KRas, мутации в

его гене обнаружены в случаях рака легкого, кишечника, поджелудочной железы (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS>). Онкогенный Ras постоянно находится в ГТФ-связанном состоянии, мутации в кодонах 12, 13 и 61 делают его нечувствительным к действию GAP (Baines et al, 2011). В раковых клетках Ras-ERK путь конститутивно активен. Следовательно, ERK1,2 обеспечивают постоянную активность нижележащих транскрипционных факторов, что способствует независимой от внешних факторов пролиферации и устойчивости к апоптозу.

Опухолевые клетки, имеющие конститутивно активный Ras-ERK-путь, характеризуются высокой устойчивостью к действию ДНК-повреждающих и противоопухолевых препаратов, таких, как 5-фторурацил, адриамицин, адриацин, паклитаксел (Li et al, 2016). Более 30% опухолей и линий раковых клеток имеют повышенную активность ERK1,2, которые, будучи фосфорилированными, транслоцируются в ядро и там обеспечивают активацию определенных генов. ERK1,2 активируют транскрипционные факторы c-Fos, c-Jun, формирующие комплекс AP1, контролирующей экспрессию спектра генов, чьи продукты необходимы для продвижения по клеточному циклу, а также ответа на стресс и устойчивости к апоптозу. Одна из новых стратегий борьбы с Ras-трансформированными опухолями связана с разработкой киназных ингибиторов для отдельных компонентов этого сигнального пути: Raf (L-779, L-450, ZM336372, Bay 43-9006), MEK1,2 (PD98059, U0126, PD184352, PD0325901). Ингибиторы, подавляющие активность ERK1,2-киназ и самого Ras, пока не разработаны. Однако применение киназных ингибиторов осложняется тем, что Ras-экспрессирующие опухолевые клетки способны преодолеть цитостатическое действие этих ингибиторов и восстановить жизнеспособность и пролиферацию. Клетки достигают этого за счет активации других сигнальных каскадов, компенсирующих недостаток активности Ras-ERK-пути, а также за счет активации цитопротективных процессов, в первую очередь, аутофагии. Помимо этого, активность онкогенного Ras приводит к изменениям в метаболизме клеток, позволяющим им обеспечивать себя субстратами для неограниченной

пролиферации, использовать различные источники ресурсов для производства АТФ и биосинтеза белков и липидов (Kimmelman, 2015). Эти метаболические адаптации включают в себя использование внеклеточных источников питательных веществ, регуляция экспрессии некоторых ключевых метаболических ферментов (например, компонентов гексоаминового пути), поддержание окислительного фосфорилирования. Такие метаболические изменения позволяют клеткам поддерживать жизнеспособность и пролиферацию, в том числе в случае изменений уровня питательных веществ. Процесс аутофагии в Ras-экспрессирующих клетках не только помогает развить устойчивость к противоопухолевым агентам, но и поддерживает их измененный метаболизм. Однако попытки ингибировать процесс аутофагии напрямую, например, хлороквином, оказались эффективны лишь в ряде случаев (Kimmelman, 2015), и поиск способов подавления аутофагии в этих клетках по-прежнему остается высоко актуальным. Таким образом, необходим поиск «слабого места» Ras-экспрессирующих клеток, используя которое, можно увеличить их чувствительность к противоопухолевым агентам.

2.3. Аутофагия

2.3.3. Стадии аутофагии и их регуляция

Недавние исследования показали, что аутофагия – это не просто дополнительный механизм деградации белков, и что этот процесс играет куда более значительную роль для обычных и, что важно, опухолевых клеток. Все клетки характеризуются некоторым базальным уровнем аутофагии, которая участвует в контроле качества белков и органелл, однако в стрессовых условиях (например, голодании) интенсивность аутофагии возрастает. Показано, что действие противоопухолевых агентов индуцирует в раковых клетках процесс аутофагии, восстанавливающий их жизнеспособность. Поэтому аутофагия

является перспективной целью в разработке новых стратегий уничтожения раковых клеток.

На модели дрожжей были открыты более 30 генов, регулирующих аутофагию, которые получили название *Autophagy-related genes* (Atg). Atg-гены оказались консервативными, и большинство из них имеются и у млекопитающих.

Процесс аутофагии состоит из нескольких стадий (Рис 1). На стадии инициации аутофагии образуется фагофора. Для этого необходим комплекс из белков Ulk1 и 2, FIP200 и Atg13. Ulk1 – это серин-треониновая киназа, которая находится под контролем комплекса mTORC1 (Ganley et al, 2009; Hosokawa et al, 2009; Jung et al, 2009). В условиях полной обеспеченности питательными веществами активный mTORC1 фосфорилирует Ulk1 по сайту Ser757, а также фосфорилирует Atg13, что приводит к ингибированию процесса аутофагии. При недостатке питательных веществ mTORC1 диссоциирует от Ulk1-комплекса, вследствие чего Ulk1 активируется и фосфорилирует FIP200, инициируя формирование фагофоры. Фосфорилирование Ulk1 осуществляет также АМПК, но в данном случае оно осуществляется по сайту Ser555 и играет не ингибирующую, а активирующую роль (Lee et al, 2010; Egan et al, 2011). Далее в развитие будущей аутофагосомы вовлекаются белки Atg 14 и 9, Vps34 и 15, Beclin1, Ambra 1, UVRAG (Itakura et al, 2008, Janku et al, 2011). Формирующийся комплекс также называется «коровым комплексом Beclin1». В состав комплекса входят Vps34, Beclin1, Ambra1, а также Atg14L. Был идентифицирован второй вариант этого комплекса, который вместо Ambra1 содержит UVRAG (*UV irradiation resistance-associated gene*) и Bif1, он регулирует созревание аутофагосом и эндосом. Белки Vps34 и Vps15 относятся к классу фосфатадил-инозитол-3-киназ. Их активность обеспечивает производство инозитол-3-фосфата (PI3P), необходимого для формирования аутофагосомы. Показано, что будущая фагофора может образоваться из разных источников: мембран ЭПР, наружной мембраны митохондрий, плазматической мембраны (Axe et al, 2008; Hailey et al, 2010; Ravikumar et al, 2010).

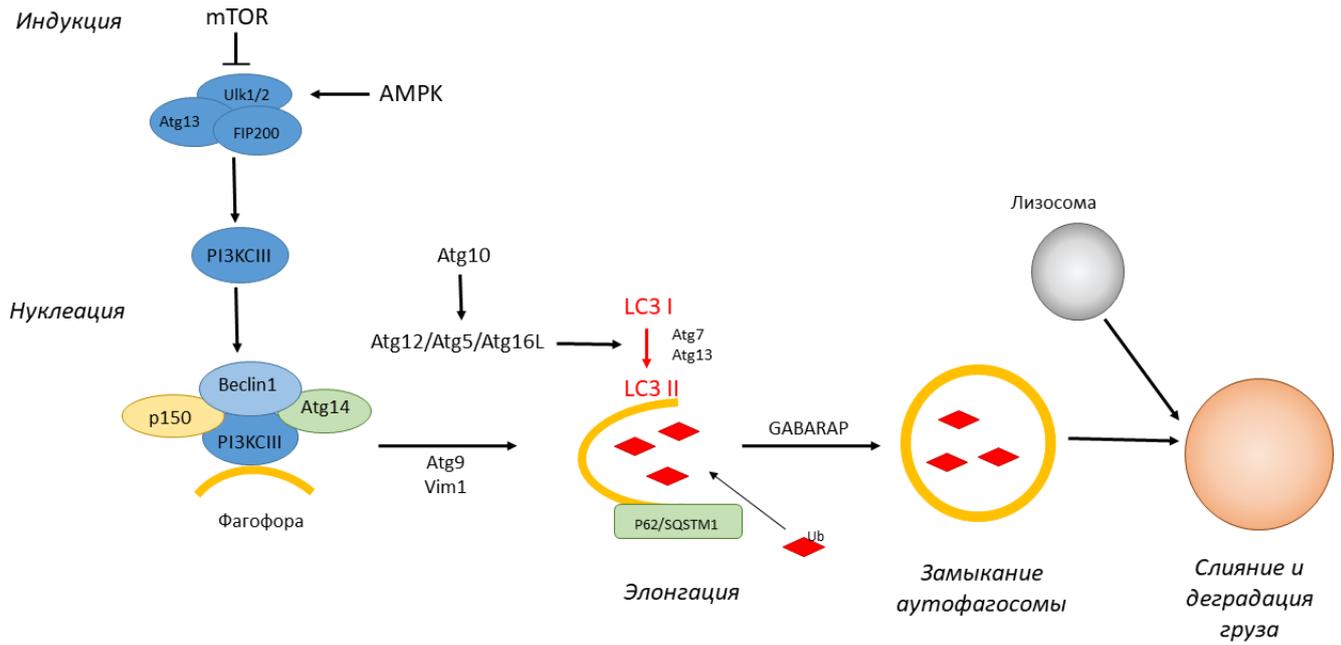


Рис 1. Процесс аутофагии состоит из нескольких стадий (индукция, нуклеация, элонгация, замыкание аутофагосомы и слияние аутофагосомы с лизосомой), каждая из которых регулируется определенными белками и белковыми комплексами.

Далее следует стадия элонгации, для которой важно образование комплекса из белков Atg. Этот комплекс функционирует как убиквитин-лигаза, включающая в себя E1 активирующий энзим и E2 конъюгирующий энзим. В роли E1-подобного энзима выступает Atg7, которая активирует Atg12 и LC3. Будучи активированными, эти белки связываются с E2-подобными энзимами Atg10 и Atg3. Atg12 образует связь с Atg5, это необходимо для образования связи LC3 с фосфатидилэтаноламином (PE). В результате этого цитоплазматическая форма LC3 (LC3I) переходит в мембран-ассоциированную форму LC3 (LC3II), что необходимо для удлинения, созревания и замыкания мембраны аутофагосомы (Kabeya et al, 2000; Nakatogawa et al, 2007). LC3II локализован как на внутренней, так и на внешней мембранах аутофагосомы. После завершения аутофагии LC3 с внутренней мембраны подвергается деградации вместе с содержимым аутофагосомы, а с внешней – отщепляется за счет активности Atg4. Atg5-Atg12-комплекс, по всей видимости, играет роль E3-энзима в ходе липидации LC3 (Hanada et al, 2007); нокаут по гену Atg5 полностью подавляет связывание LC3 с PE (Mizushima et al, 2001).

Как показано, перемещение содержимого в аутофагосому – это селективный процесс, и он регулируется специальными белками-адапторами. Наиболее известным адаптором является белок p62, или Sequestome 1 (SQSTM1). В своем составе он имеет PB1-домен, позволяющий ему взаимодействовать с другими белками, несущими такой же домен, LIR-домен, через который осуществляется взаимодействие с LC3, UBA-домен, связывающийся с полиубиквитиновыми цепями (Katsuragi et al, 2015). Скапливающиеся в клетке неправильно организованные или избыточные белки, поврежденные органеллы подвергаются убиквитинилированию. p62/SQSTM1, в свою очередь, фосфорилируется по сайтам Ser407 и Ser403, это осуществляется киназами Utk1, CK2 и TBK1. Это фосфорилирование усиливает связывание p62/SQSTM1 с убиквитиновыми цепями, отмечающими направляемое на деградацию содержимое. p62/SQSTM1 формирует полимеры за счет своего PB1-домена, связывается с убиквитинилированным содержимым и направляет его в аутофагосомы. При

завершении аутофагического процесса p62/SQSTM1 деградирует вместе с содержимым аутофагосомы. Для этого должно произойти его взаимодействие с LC3 через LIR-домен.

Аутофагия завершается слиянием аутофагосом с лизосомами, вследствие чего образуется аутофаголизосома, а содержимое переваривается. Лизосомы – это органеллы, вовлеченные в процессы эндоцитоза и аутофагии. Лизосомы содержат кислые гидролазы, кислые фосфатазы, протеазы и тп ферменты, за счет работы которых осуществляется расщепление содержимого. Образующиеся в результате молекулы могут быть использованы на синтез новых белков и прочие нужды клетки.

Биогенез лизосом регулируется координированной работой генов, кодирующих лизосомальные белки. Общим для этих генов является *coordinated lysosomal expression and regulation (CLEAR) element*. С этим участком связываются транскрипционные факторы семейства TFEB.

Киназа mTOR принимает участие в регуляции биогенеза лизосом, контролируя транскрипционный фактор TFEB (Settembre et al, 2012). В условиях голодания происходит фосфорилирование TFEB по сайту Ser142, вследствие чего он перемещается в ядро и связывается с генами-мишенями. mTOR в составе mTORC1 фосфорилирует TFEB по сайтам Ser142 и Ser211, предотвращая его транслокацию в ядро (Settembre et al, 2012). Таким образом, активный mTOR выступает как негативный регулятор биогенеза лизосом.

2.3.2. Митофагия

В зависимости от того, что деградируется аутофагическим путем, различают разные виды аутофагии. Митофагия деградирует поврежденные митохондрии, рибофагия – рибосомы, нуклеофагия – компоненты ядра и ДНК-материал, а также аутофагия служит для защиты клеток от вторгшихся патогенов (Levine et al, 2011). Для Ras-трансформированных клеток очень важным является процесс

митофагии, поскольку жизнеспособность и туморогенность этих клеток оказались зависимыми от митохондрий.

В основе процессов, приводящих к деградации поврежденных митохондрий, лежит потеря митохондриями их потенциала мембраны и деполяризация. Наиболее изучен механизм митофагии, регулируемый PINK1-Parkin системой (Jin and Youle, 2012). PINK1 имеет в своем составе mitochondrial targeting sequence (MTS) – последовательность, благодаря которой он направляется в митохондрии через TOM-комплексы на их наружных мембранах (Valente et al, 2004). Во время импорта через внутреннюю мембрану 64 кДа PINK1 превращается в 60кДа форму. Внутри митохондрий PINK1 преобразуется в форму массой 52кДа, которая впоследствии расщепляется митохондриальными протеазами. Таким образом, поддерживается определенная концентрация PINK1. Транслокация с последующим расщеплением PINK1 возможна только в неповрежденные митохондрии, сохраняющие потенциал мембраны. При повреждении и деполяризации митохондрий PINK1 не может быть транспортирован через внутреннюю мембрану и расщеплен, что приводит к накоплению нерасщепленного PINK1 на наружной мембране. Это приводит к привлечению из цитоплазмы E3 убиквитин-лигазы Parkin. Parkin убиквитинилирует белки наружной мембраны, вследствие чего к поврежденной митохондрии привлекаются белки (в том числе адаптор p62/SQSTM1), обеспечивающие деградацию поврежденной органеллы в аутофагосоме (Chan et al, 2011; Geisler et al, 2010);

2.3.3. Роль аутофагии в злокачественной трансформации клеток

Роль аутофагии в злокачественной трансформации клеток долгое время является предметом дебатов ввиду неоднозначности накопленных данных. По всей видимости, роль аутофагии в канцерогенезе двояка. На ранних этапах она может играть тумор-супрессорную роль, а на поздних этапах, в условиях

недостатка кислорода и питательных веществ в опухоли – тумор-промотирующую.

То, что аутофагия может играть тумор-супрессорную роль, было впервые показано на модели мышей с делецией одной аллели гена *Becn1* (*Becn1*). У *Becn1*^{+/-}-мышей была выявлена более высокая частота спонтанного формирования лимфом, гепатокарцином, аденокарцином легкого (Qu et al, 2003; Yue et al, 2003). В клетках с нарушением процесса аутофагии накапливается p62/SQSTM1, что способствует развитию опухоли (Kpmatsu et al, 2007). Нарушения аутофагии приводят к оксидативному стрессу, дерегуляции DDR-ответа, хроническому повреждению тканей, воспалению, нарушению регуляции активности mTOR и NRF2. Эти события способствуют нестабильности генома и активации онкогенов (Karantza-Wadsworth et al. 2007; Mathew et al. 2007, 2009).

Данные о роли аутофагии для Ras-трансформированных клеток также неоднозначны. В работе Yoo et al показано, что онкогенный Ras инициирует деградацию регулятора аутофагии *Becn1* в трансформированных клетках кишечного эпителия при их откреплении, таким образом предотвращая их гибель и стимулируя их пролиферацию (Yoo et al, 2010). С другой стороны, в исследовании Kim et al показано, что трансфекция клеток эпителия молочных желез человека онкогенным KRas индуцировала активное формирование аутофагосом и оверэкспрессию генов *Atg5* и *Atg7* с последующей злокачественной трансформацией клеток. При этом ингибирование экспрессии *Atg5* и *Atg7* малыми шпилечными РНК, как и применение ингибиторов аутофагии, подавляло рост клеток в мягком агаре и формирование опухолей при трансплантации этих клеток мышам (Kim et al, 2011). Экспрессия HRas и KRas онкогенов повышает интенсивность аутофагии (Guo et al, 2011). Аутофагия необходима Ras-экспрессирующим клеткам не только для роста и формирования опухоли, но и для поддержания инвазивности и способности к метастазированию (Lock et al, 2014). Важным аспектом в значимости аутофагии для Ras-трансформированных клеток является поддержание целостности и функционирования митохондрий. Ras-экспрессирующие клетки отличаются своей

зависимостью от активности митохондрий. Так, показано, что при инактивации в KRas-трансформированных клетках опухоли легкого транскрипционного фактора Ttfam нарушается биогенез митохондрий, и такие клетки не могут осуществлять рост опухоли (Weinberg et al, 2010). Эти клетки в аэробных условиях оказались зависимыми от пентозофосфатного пути в большей степени, чем от гликолиза.

Поскольку аутофагия поддерживает работу митохондрий и устойчивость клетки к апоптозу за счет селективной элиминации поврежденных митохондрий, она играет важную роль для Ras-экспрессирующих клеток. Делеция Atg7 в KRas-мутированных клетках рака легкого приводит к нарушению метаболизма митохондрий, повышению уровней активных форм кислорода, снижению общего уровня энергии и пула нуклеотидов в клетках (Guo et al, 2016). Кроме того, аутофагия оказалась необходима для роста Ras-трансформированных опухолей. Генетическое и фармакологическое ингибирование аутофагии приводит к снижению процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях (Kimmelman and White, 2017). На модели генетически модифицированной мыши было показано, что делеция Atg7 подавляет развитие Ras-трансформированных опухолей.

Таким образом, можно однозначно утверждать, что аутофагия играет важную роль в обеспечении жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток, что делает ее перспективной для изучения и решения проблем, связанных с терапией опухолей.

2.3.4. Аутофагия в ответе на любое воздействие на клетку

Показано, что аутофагия является ответом не только на недостаток питательных веществ, факторов роста и гипоксию (Levine and Kroemer, 2008), но и на другие негативные факторы, такие, как высокая плотность и тепловое воздействие (Levine and Klionsky, 2004). Кроме того, аутофагия может активироваться в ответ на онкогенный стресс. Аутофагию стимулирует онкогенный Ras, а в некоторых случаях и онкогенный Myc (Mariño et al, 2014).

Аутофагия может активироваться в ходе DDR-ответа и участвовать в элиминации поврежденной ДНК, деградации белков-участников репарации, а также поставлять материал для производства АТФ, необходимой для активности белков репарации (Vessoni et al, 2013). Также аутофагия обеспечивает деградацию агрегатов белков, чье накопление характеризует многие нейродегенеративные заболевания. Таким образом, аутофагия является важным механизмом противостояния нейродегенеративным заболеваниям, и нарушения аутофагии в ходе синдромов Паркинсона и Альцгеймера, а также энцеопатий, активно исследуются (Levine and Kroemer, 2008).

В опухолевых клетках аутофагия может индуцироваться в ответ на действие противоопухолевых препаратов. Это было показано для клеток рака груди MCF-7 в ответ на действие доксорубина (Guo et al, 2016), для ряда Ras- и BRAF-трансформированных клеток в ответ на ингибиторы Raf вемурафениб и MEK1,2 AS703026 (Sanduja et al, 2016). Традиционно применяемые противоопухолевые препараты направлены на индукцию апоптоза в раковых клетках. Многие про-апоптотические стимулы также активируют аутофагию, и она противостоит стрессу до тех пор, пока стрессовый стимул не достигнет определенного порогового значения или продолжительности (Mariño et al, 2014). Аутофагия может супрессировать апоптоз за счет изоляции и деградации поврежденных митохондрий (митофагия), а также за счет изоляции цитозольных про-апоптотических белков (Mariño et al, 2014). Другой аспект участия аутофагии в ответе на противоопухолевые препараты – это поддержание множественной лекарственной устойчивости (Multi-drug resistance, MDR). Несмотря на то, что связь аутофагии с увеличением уровня ABC-транспортёров, обеспечивающих MDR, пока не полностью ясна, есть данные о корреляции уровня экспрессии генов ABC-транспортёров и ряда аутофагических генов (Li et al, 2017).

На основе этих данных можно сделать вывод, что ингибирование аутофагии усилит чувствительность злокачественных клеток к противоопухолевым препаратам. Комбинированное действие ингибиторов аутофагии и противоопухолевых препаратов, направленных на индукцию гибели клеток,

разрабатывается в клинических исследованиях, однако эффект остается неоднозначным, и поиск способов ингибировать цитопротективную аутофагию в опухолевых клетках актуален.

2.4. mTOR-киназа, ее функции и роль в злокачественной трансформации

2.4.1. Структура и функции mTOR

Одним из ключевых регуляторов аутофагии в клетках является киназа mTOR (mammalian Target of Rapamycin), которая также контролирует множество других процессов. Многочисленные функции TOR привлекли к ней внимание для понимания проблем канцерогенеза, метаболизма и старения, так как достаточно быстро было установлено, что в разных типах опухолей наблюдается нарушение регуляции mTOR-сигнального каскада.

Киназа TOR представляет собой серин/треониновую протеинкиназу с большой молекулярной массой около 300 кДа. Она принадлежит к семейству фосфатидилинозитолкиназ PIKK (phosphatidylinositol 3'-kinase-related kinases), к которому относятся киназы, контролирующие процессы ответа на стресс и репарацию - ATM, ATR, DNA-РК. На N-конце киназы имеются многочисленные HEAT-повторы. На C-конце расположены FK-BP12-рапамицин-связывающий домен и серин-треониновые киназные домены (Yip et al, 2010).

Киназа TOR была впервые описана в 1991 году как белок, который является мишенью рапамицина, вещества, изначально использовавшегося в медицине как иммуносупрессант, предотвращающий отторжение органов при трансплантации. Последующие исследования показали, что многие важные функции TOR у дрожжей и высших эукариотов сходны, что позволяет считать ее центральным регулятором многочисленных сигнальных каскадов в клетке. Функции TOR у дрожжей и высших эукариот включают регуляцию трансляции, метаболизма и транскрипции в ответ на нехватку или стимуляцию питательными веществами и ростовыми факторами.

В клетках млекопитающих mTOR (mammalian TOR) представлена в виде двух комплексов, различающихся по функциям и другим компонентам, а также чувствительности к рапамицину: комплекс mTOR Complex 1 (mTORC1) и комплекс mTOR Complex 2 (mTORC2). Рапамицин-чувствительным является комплекс mTORC1, комплекс mTORC2 рапамицином в течение короткого времени действия не ингибируется, однако через 24 часа, можно видеть падение активности и mTORC2. В состав mTORC1 входят белки Raptor, Pras40, mLST8, FKBP38 и DEPTOR. Следует отметить, что за сборку комплекса mTORC1 отвечает белок Raptor, который одновременно, отвечает за доставку к нему субстратов, подлежащих фосфорилированию, а главное он определяет внутриклеточную локализацию комплекса. Сам mTOR в комплексе выполняет ведущую киназную роль. Белок mLST8 является скэффолдом, mTOR имеет домен для связи с mLST8 (LBE-домен) на С-конце.

Механизм ингибирования активности mTORC1 рапамицином долгое время был не до конца понятен. Тем не менее, было показано, что в клетке рапамицин связывается с белком FK-BP12. Образовавшийся комплекс непосредственно взаимодействует с FRB-доменом mTOR. Комплекс FK-BP12-рапамицин не мешает mTOR взаимодействовать с его субстратами, но вызывает конформационные изменения, нарушающие взаимодействие mTOR с Raptor (Yip et al, 2010).

Регуляторная активность комплекса mTORC1 покрывает широкий спектр процессов в клетке: синтез белка, биогенез рибосом, аутофагия, клеточное старение, биогенез лизосом, динамика и активность митохондрий. Комплекс mTORC1 участвует в регуляции кэп-иницируемой трансляции белка. Его прямая мишень - ингибитор эукариотического фактора инициации трансляции eIF4E, белок 4E-BP1. Обычно этот белок пребывает в гипофосфорилированном состоянии, ингибируя активность eIF4E, а также его взаимодействие с eIF4G. Фосфорилирование, осуществляемое mTORC1, приводит к диссоциации ингибитора, вслед за чем протекает кэп-иницируемая трансляция (Sarbasov et al., 2005; Clemens et al, 2013). Вторая мишень mTORC1 – это киназа S6K/p70.

Будучи активированной, S6 киназа фосфорилирует ряд мишеней, в число которых входит рибосомальный белок S6 (Zoncu et al, 2011). Также через S6K осуществляется петля обратной регуляции mTOR: одной из мишеней S6K является белок IRS – Insulin receptor Substrate. Будучи фосфорилированным S6K, он диссоциирует от инсулинового рецептора, что приводит к снижению активности PI3-киназного пути (Guertin and Sabatini, 2007). Одна из ключевых функций mTOR – это регуляция старения клетки. Различного рода исследования показывают, что активность mTOR может иметь отношение к продолжительности жизни организма в целом (Wu et al, 2013; Neff et al, 2013). В связи с этим сформировалась mTOR-центрическая концепция старения клеток, которая может быть связана со старением организма (Blagosklonny, 2008; Blagosklonny and Hall, 2009; Blagosklonny, 2011).

Основным регулятором mTORC1 является комплекс TSC1,2 (Tuberosis Sclerosis complex 1,2). Он состоит из двух белков – гамартина и туберина, являющихся опухолевыми супрессорами. Туберин содержит GAP домен, контролирующий переход Rheb из активной ГТФ связанной формы, в не активную, связанную с ГДФ. При подавлении TSC1,2 Rheb переходит в ГТФ-связанное состояние, взаимодействует с mTORC1 комплексом и активирует его. Одним из главных регуляторов TSC1,2-Rheb-mTOR-оси является PI3K-каскад. Киназа Akt/PKB способна инактивировать туберин, фосфорилируя его по сайтам Ser 939 и Ser 981, а также Thr 1462 после введения в среду культивирования ростовых факторов. Активация mTORC1 приводит к активации серии анаболических процессов, и в первую очередь активации синтеза белка, синтеза липидов и формированию новых органелл в клетке. Это лежит в основе стимуляции клеточной пролиферации. Позже было обнаружено, что стимуляция клеток ростовыми факторами приводит к фосфорилированию туберина киназами RSK1 (p90 ribosomal S6 kinase (RSK) 1), MK2 (MAPK-activated protein kinase 2) и киназой ERK2. Кроме того, ростовые факторы могут регулировать активность mTORC1 напрямую через фосфорилирование PRAS40.

Удаление ростовых факторов, снижение уровня питательных веществ или энергии, являются сигналами подавления активности mTORC1. При разрушении митохондрий или снижении уровня АТФ в клетке, также происходит подавление активности комплекса mTORC1. Сигналом к началу этого процесса является активация киназы АМПК, которая начинает фосфорилировать туберин и активирует туберин-гамартиновый комплекс. Несмотря на присутствие в среде ростовых факторов, это событие приводит к инактивации mTORC1.

Рапамицин-нечувствительный комплекс mTORC2, кроме общих с mTORC1 компонентов mTOR, DEPTOR и mLST8, содержит белки Rictor, PROTOR1,2 и SIN1. Комплекс mTORC2 известен как регулятор динамики актинового цитоскелета (Jacinto et al, 2004). mTORC2 активируется за счет действия PI3-киназного пути и фосфорилирует свои мишени, в частности, киназу PKB/Akt по сайту Ser473 (Sarbasov et al, 2005). Активировавшаяся Akt обеспечивает активацию mTORC1: она фосфорилирует TSC1,2, а также компонент комплекса mTORC1 Pras40, ингибируя его.

Комплекс mTORC1 является сенсором не только энергии, факторов роста, а также уровня аминокислот (Sengupta et al, 2010). Исследования показали, что регуляцию зависимости mTORC1 от аминокислот осуществляют ГТФазы Rag (Bar-Peled and Sabatini, 2014). Важным является то, что при высоком уровне аминокислот mTORC1 связывается с лизосомами, которые, по всей видимости, являются важными участниками регуляции mTORC1 и контролируемых им процессов.

Киназа mTOR является негативным регулятором аутофагии. В составе mTORC1 она осуществляет ингибирующее фосфорилирование киназы Ulk1 по сайту Ser757. Ингибирование mTOR, в свою очередь, приводит к активации аутофагии. Однако, как оказалось, mTOR способствует смещению баланса от катаболизма к анаболизму не только через подавление аутофагии. mTOR также участвует в регуляции убиквитин-протеасомной системы, УПС (Rosseau and Bertolotti, 2016; Chantranupong and Sabatini, 2016; Zhao and Goldberg, 2016). Вопрос о взаимоотношениях аутофагии и убиквитин-протеасомной системы

деградации активно исследуется, но известно, что эти две системы имеют разные мишени. На аутофагическую деградацию направляются избыточные и неправильно упакованные белки, а также поврежденные органеллы, например, митохондрии. В свою очередь, убиквитин-протеасомная система обеспечивает быструю деградацию короткоживущих белков, например, регуляторов клеточного цикла, p53. Тот факт, что mTOR может подавлять активность не только аутофагии, но и убиквитин-протеасомной системы, свидетельствует об уникальной роли mTOR в поддержании баланса метаболических и биосинтетических процессов в клетке.

2.4.2. Применение ингибиторов mTOR-киназы в противоопухолевой терапии

При исследовании антипролиферативного действия рапамицина было обнаружено, что он способен тормозить пролиферацию ряда опухолей, однако не столь существенно, как можно было предполагать исходя из функций mTOR в клетке. В связи с этим были начаты исследования по разработке ингибиторов другого механизма действия, чем рапамицин. Были синтезированы киназные ингибиторы, подавляющие активность mTOR путем прямого подавления сайтов его фосфорилирования, которые имеют отношение к активности киназы.

В связи с тем, что mTORC1 является одним из основных регуляторов белкового синтеза, синтеза липидов и метаболизма, его роль в регуляции пролиферации не вызывает сомнений. Поэтому в настоящее время разрабатываются многочисленные ингибиторы этого пути. Разработано большое количество производных рапамицина, так называемые рапалоги, с более сильными ингибирующими свойствами - эверолимус, темсиролимус, зотаролимус и другие (Yuan et al, 2009). Ряд препаратов из этого ряда уже одобрен в качестве официально лечебных препаратов и применяется в клинике. Однако, затраченные усилия на синтез этих производных не оправдал надежд, так как лечение различных опухолевых заболеваний не привело к серьезным отличиям, по сравнению с рапамицином. В качестве одной из основных версий

неэффективности действия рапалогов, была выдвинута идея о не полном ингибировании mTORC1 этими производными, и отсутствия подавления киназного комплекса mTORC2.

В связи с недостаточной противоопухолевой эффективностью рапамицина и рапалогов, были разработаны каталитические ингибиторы киназы mTOR, а также ингибиторы, способные одновременно действовать на mTOR и PI3K (Brachmann et al, 2009; Janes and Fruman, 2010). В настоящее время они также проходят проверку на эффективность противоопухолевого действия. Однако, как и в случае в рапалогами, пока достоверно результаты с использованием их, получены не были.

Новый взгляд на проблему возник в связи с появлением данных о том, что ингибирование киназы mTOR и комплекса mTORC1, вызывает активацию процесса аутофагии, роль которой может давать решающий вклад в действие этого класса агентов.

2.5. Клеточное старение, его регуляция и роль в норме и в канцерогенезе

Клеточное старение – это консервативная, генетически детерминированная программа, препятствующая неконтролируемой пролиферации клеток. Различают старение репликативное и ускоренное. Репликативное старение связано с укорочением теломер – участков на конце хромосом, которые предотвращают «слипание». С каждым циклом деления теломеры укорачиваются вследствие недорепликации, пока не достигают критической длины, при которой концы хромосом воспринимаются клеткой как двунитевые разрывы. Это индуцирует систему ответа на повреждения ДНК, активацию p53 и старение. Таким образом, нормальная соматическая клетка может совершить строго определенное число делений, в соответствии с законом Хейфликка, который он вывел, наблюдая за фибробластами человека в культуре (Hayflick, 1965). Число делений, которое клетка может совершить прежде, чем теломеры достигнут критической длины, свое для каждого типа клеток и называется числом Хейфликка.

Ускоренное старение может быть вызвано стрессом или определенными агентами, например, цитостатиками, ретиноидами и ингибиторами гистоновых деацетилаз; клетки могут развить старение в ответ на повреждения ДНК, вызванные облучением, или в ответ на экспрессию онкогена. Онкоген-индуцированное старение было описано в 1997 году Serrano (Serrano et al, 1997): при введении в нормальные фибробласты онкогенного Ras активировался p16^{Ink4}-сигнальный путь, что приводило к блоку клеточного цикла и развитию фенотипа старения. Однако aberrантная активность Ras вкупе с еще одним онкогеном (например, E1A) позволяет подавить тумор-супрессорные программы и ведет к злокачественной трансформации.

Направление клетки на путь старения включает в себя как минимум два необходимых условия. Первое – это подавление циклин-зависимых киназ и, соответственно, арест клеточного цикла. Этого можно достичь через активацию ингибиторов циклин-зависимых киназ. Однако одного ареста клеточного цикла недостаточно, чтобы назвать клетку стареющей. Арест клеточного цикла может происходить в ответ на недостаток питательных веществ, клетка перестает пролиферировать и переходит в т.н. состояние покоя. Состояние покоя обратимо: при появлении в среде питательных веществ клетка возобновит пролиферацию. Клеточное старение, наряду с арестом клеточного цикла, требует активации киназы mTOR (Blagosklonny, 2011). Старение считается необратимой программой, изменение уровня питательных веществ не приводит к его отмене. Отмена/подавление программы клеточного старения требует непосредственного воздействия на mTOR-киназу либо на сигнальные пути, которые поддерживают ее активность (Demidenko et al, 2009; Pospelova et al, 2012; Kolesnichenko et al, 2012), либо старение может быть подавлено за счет аутофагии (Gewirtz, 2013)

2.5.1. Особенности пространственной организации старых клеток

Исследования позволили выделить ряд признаков (hallmarks), характеризующих стареющие клетки. В их число входят истощение теломер,

эпигенетические изменения, дисфункция митохондрий, развитие ассоциированного со старением секреторного фенотипа (Senescence-associated secretory phenotype, SASP), развитие ассоциированной со старением β -галактозидазной активности, формирование ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов (senescence-associated chromatin foci, SAHF)

Стареющие клетки имеют характерную морфологию: они увеличиваются в размере и сильнее расплываются по субстрату, с этим меняется соотношение объемов ядра и цитоплазмы. Старение связано с активным синтезом и накоплением белка.

Эпигенетическая регуляция активности генов осуществляется за счет метилирования-деметиличивания ДНК, пост-трансляционных модификаций гистонов и ремоделирования хроматина. Пост-трансляционные модификации гистонов влияют на их связывание с ДНК и взаимодействие с белками. Как правило, ацетилирование и фосфорилирование гистонов способствует «разрыхлению» хроматина, делая его более доступным для транскрипционных комплексов, в то время как метилирование гистонов усиливает компактизацию и обычно характеризует гетерохроматиновые участки. Поскольку стареющие клетки характеризуются активным синтезом белка, а также программа старения является генетически детерминированной, эпигенетическая регуляция хроматина играет в старении важную роль. На различных моделях (дрожжи, клетки крыс, мышей и человека) было показано, что старение клеток характеризуется такими паттернами модификаций гистонов, как: ацетилирование гистона H3 по положению K9; усиление ацетилирования гистона H3 по положению K20; усиление метилирования гистона H4 по положению K20; увеличение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX). Ацетилирование гистона H3 по положению K56, наоборот, снижается. При этом, интересно отметить, что при старении снижается содержание самих гистонов, в то время как оверэкспрессия генов гистонов приводит к увеличению продолжительности жизни дрожжей (Feser et al, 2010).

Старение связано не только с эпигенетическими изменениями, но и со структурными изменениями самого хроматина – формированием т.н. ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов (SAHF). Это свойство проявляется в формировании участков сильно конденсированного хроматина в ядре. В этих участках полностью подавлена транскрипция ДНК (Narita et al, 2003). В регуляцию формирования SAHF вовлечен опухолюсупрессорный белок Rb. В SAHF преобразуются участки, содержащие определенные гены в частности, E2F; конденсация участка ДНК в SAHF приводит к подавлению транскрипции этих генов (Narita et al, 2003). Кроме того, было показано, что в ядрах стареющих клеток обнаруживаются т.н. фокусы псевдо-DDR – участки, где выявляется фосфорилированная форма гистона H2AX (γ H2AX, появление этой модификации гистона связано с повреждениями ДНК, и γ H2AX играет роль платформы для репаративных комплексов) и фосфо-ATM. Однако другие компоненты DDR, равно как и, собственно, повреждения ДНК в этих участках не детектируются (Pospelova et al, 2009).

Старые клетки развивают гиперсекреторный фенотип, выделяя в межклеточное пространство целый ряд биологически активных веществ. Это свойство носит название ассоциированного со старением гиперсекреторного фенотипа (Senescence-associated secretory phenotype, SASP). Стареющие клетки секретируют широкий спектр цитокинов и хемокинов, факторов роста и внеклеточных матриксных протеаз (Coppe et al, 2010). В составе секретома стареющих клеток обнаружены: интерлейкины 1a, 1b, 6, 7, 13, 15, 8; хемокины MCP и MIP; гамма-интерферон и ряд других провоспалительных факторов; факторы роста – EGF, FGF, VEGF, NGF; матриксные металлопротеазы MMP1,3,10,12,14; сигнальные молекулы TRAIL, ICAM; EGF-R.

С одной стороны, продуцируемый старыми клетками «коктейль» стимулирует подвижность и пролиферацию окружающих клеток, с другой стороны, привлекает клетки иммунной системы. Клетки иммунной системы, в частности, макрофаги, элиминируют старые клетки. Роль старых клеток в организме долгое время оставалась не ясной. С одной стороны, старение является

очевидным барьером для пролиферации клеток, исчерпавших свой лимит длины теломер и характеризующихся геномной нестабильностью. С другой стороны, SASP старых клеток несет угрозу злокачественной трансформации для окружающих клеток, а элиминация этих клеток участниками иммунной системы занимает значительно больше времени, чем быстрый и высокоэффективный апоптоз. Тем не менее, ряд последних исследований позволил определить неочевидную, но важную роль старых клеток для организма: участие в регенерации тканей (Serrano, 2014).

Было показано, что ключевой регулятор старения – киназа mTOR – вовлечена в регуляцию SASP. Ингибирование mTOR в фибробластах, претерпевающих онкоген-индуцированное старение, снижает уровни секреции многих компонентов SASP, в частности, И6 и И8 (Herranz et al, 2015). Также ингибирование mTOR рапамицином подавляет трансляцию мембран-связанного Interleukin-1 α , что приводит к снижению активности NF- κ B сигнального пути (Laberge et al, 2015). В этом исследовании было показано, что ингибирование mTOR снизило способность старых фибробластов стимулировать рост опухолей простаты у мышей, что подтверждает заключение о туморогенных свойствах SASP старых клеток. Кроме того, повышение уровней секреции SASP наблюдается при потере функций p53, а также при экспрессии онкогенного Ras (Coppe et al, 2008).

Исследования последних лет показали, что фенотип старых клеток характеризуется особым распределением ключевых регуляторных белков и органелл в цитоплазме. В старых клетках лизосомы располагаются вокруг ядра и вместе с ними располагается mTOR, который, как показано, в составе комплекса mTORC1 может локализоваться непосредственно на мембранах лизосом (Carroll and Dunlop, 2017). Это приводит к формированию TASC-компарментов (TOR-autophagy spatial coupling compartment; Narita et al, 2011), которые отвечают за развитие гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа старых клеток. Аутофагосом в области TASC нет, в старых клетках они распределены преимущественно по периферии цитоплазмы (Narita et al, 2011, Young et al, 2011).

Таким образом, интенсивность слияния аутофагосом с лизосомами в старых клетках поддерживается на низком уровне, однако достаточном, чтобы поддерживать гомеостаз и противостоять митохондриальной дисфункции (Lopez-Otin et al, 2013). Расположенный вокруг ядра mTORC1 в старых клетках конститутивно активен, независимо от ростовых факторов и питательных веществ (Carroll et al, 2017). Активный mTOR является препятствием на пути развития интенсивной аутофагии, не позволяя таким образом отменить гипертрофный, гиперсекреторный фенотип, то есть программу старения.

2.5.2. Взаимоотношение процессов аутофагии и старения

Как аутофагия, так и старение могут быть индуцированы при стрессовом воздействии на клетку. Однако вопрос о взаимоотношениях этих двух программ остается открытым, поскольку многочисленные исследования дают разные результаты (Gewirtz, 2013). С одной стороны, ряд исследований говорит в пользу того, что аутофагия необходима для развития программы старения. В исследовании Young et al было показано, что аутофагия требуется для перехода клетки из пролиферирующего состояния в состояние старения при введении Ras онкогена в первичные фибробласты (Young et al, 2009). Также при действии на клетки рака груди и кишечника ДНК-повреждающими агентами индуцировались аутофагия и старение, и ингибирование аутофагии приводило к частичному подавлению старения, свидетельствуя о вовлечении аутофагии в развитие старения в ответ на действие доксорубицина (Goehre et al, 2012). С другой стороны, ряд исследований показал, что аутофагия подавляет развитие старения, в то время как ингибирование аутофагии способствует старению (Kang et al, 2011; Wang et al, 2012).

Старение характеризуется активным синтезом и накоплением белка, а также нарушением функциональной активности митохондрий (Lopez-Otin et al, 2013). В этом случае аутофагия может поддерживать жизнеспособность клетки, изолируя поврежденные митохондрии и часть белка. По-видимому, стареющим клеткам

необходим базальный уровень процесса аутофагии, которая должна поддерживаться на определенном низком уровне, достаточном для изоляции поврежденных митохондрий и поддержания гомеостаза. Однако повышенная активность аутофагии может привести к отмене программы старения. Если некий стрессовый стимул (например, применение противоопухолевого агента) индуцирует обе эти программы, то какая из них станет доминантной, может зависеть от ряда факторов: клеточного/тканевого контекста, активности mTOR, активности онкогенов.

2.6. Типы клеточной гибели.

Способность претерпевать гибель является неотъемлемой характеристикой клеток. Регулируемая клеточная смерть (RCD, regulated cell death) может происходить как в стрессовых случаях (стресс-индуцируемая RCD), так и в норме, например, в ходе эмбрионального развития организма, в таком случае ее обозначают как программируемую клеточную гибель (Programmed cell death, PCD).

В соответствии с морфологическими проявлениями, выделяют три типа клеточной гибели. Тип I апоптоз характеризуется конденсацией хроматина (пикноз), фрагментацией ядра (кариоррексис), блеббингом и в итоге формированием т.н. апоптотических телец, которые впоследствии будут поглощены фагоцитами. Тип II аутофагическая гибель характеризуется интенсивной вакуолизацией и разрушением органелл цитоплазмы, но при этом не происходит конденсации хроматина (Kroemer and Levine, 2008). Сложность точной характеристики этого типа программируемой гибели долгое время была связана с тем, что аутофагия традиционно рассматривалась как механизм спасения клеток. На данный момент под аутофагической гибелью понимают механизм гибели, зависящий от компонентов регуляции аутофагии, которые могут быть подавлен/задержан за счет фармакологического или генетического ингибирования аутофагии (Galluzzi et al, 2015; Galluzzi et al, 2018). Тип III некроз

не имеет признаков ни типа I, ни типа II и проявляется в разрушении клеток без их последующего фагоцитоза (Galluzzi et al, 2018).

2.6.1. Апоптоз

Явление апоптоза было впервые описано в 1972г (Kerr et al, 1972). Апоптотические клетки имеют характерную морфологию: блеббинг, сопровождающийся кариорексисом и разделением останков клетки на т.н. апоптотические тельца, которые впоследствии будут поглощены макрофагами.

Апоптоз может быть индуцирован рядом сигналов: стрессовыми воздействиями (накопление активных форм кислорода, повреждения ДНК, тепловой шок, недостаток питательных веществ, гипоксия, заражение клетки вирусом). Выделяют два механизма развития программы апоптоза – внутренний (митохондриальный) и наружный (связанный с сигналингом от рецепторов смерти). Важными участниками сигнальных путей апоптоза являются цистеин-зависимые аспартат-специфичные протеазы, более известные как каспазы (Shalini et al, 2015). Различают иницирующие каспазы (каспаза 8, 9, 10, 2) и исполнительные (эффektorные, экзекуторные) каспазы 3, 6 и 7. Впрочем, для каспазы 2 было показано не только иницирующие, но и экзекуторные функции. Иницирующие каспазы расщепляют нижележащие исполнительные, что приводит к их активации. Эффektorные каспазы расщепляют свои субстраты по сайтам аспартата.

Ключевым событием в запуске апоптоза по митохондриальному пути является повреждение мембран митохондрий, в особенности внутренней. Процесс начинается с увеличения пермеабилитации мембран, в результате чего молекулы из матрикса и межмембранного пространства митохондрий беспрепятственно выходят в цитозоль, а окислительное фосфорилирование нарушается. В цитозоль выходят проапоптотические белки, такие, как цитохром Ц, AIF, эндонуклеаза G и Smac/DIABLO. Цитохром Ц формирует комплекс с апоптоз-активирующим фактором 1 (Apaf1) и прокаспазой 9, этот комплекс называется апоптосома. В

этом комплексе происходит аутоактивация каспазы 9, которая, в свою очередь, активирует эффекторные каспазы 3,6 и 7. Smac/DIABLO в это время связываются с белками IAP, являющимися ингибиторами каспаз, не позволяя им запустить анти-апоптотические программы. AIF и эндонуклеаза G перемещаются в ядро, где AIF вызывает конденсацию хроматина и расщепление ДНК.

В регуляции апоптоза важную роль играют белки семейства Bcl2. Это семейство можно разделить на две группы: группу анти-апоптотических белков, включающую в себя Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B, A1 и Mcl-1, и группу про-апоптотических белков (Bax, Bak, Bim, PUMA, Noxa и другие). В норме про-апоптотическая группа обычно локализуется в цитозоли, кроме белков Bax, Bim, Bak и Bad. Эти белки располагаются на мембране митохондрий, и с ними связываются анти-апоптотические Bcl2 и Bcl-X_L, ингибируя таким образом их активность. При про-апоптотических стимулах активность Bcl2 и Bcl-X_L подавляется разными механизмами.

Развитие апоптоза по «внешнему» пути начинается с рецепторов смерти из суперсемейства рецептора фактора некроза опухолей (Tumor necrosis factor receptor, TNF-R). С рецептором смерти DR2 связывается Fas-лиганд, это приводит к тримеризации рецептора. К тримеризованному рецептору привлекается адапторная молекула FADD, в результате чего формируется death-inducing signalling complex (DISC). В составе DISC FADD взаимодействует с про-каспазами 8 и 10, обеспечивая их аутоактивацию. Активные каспазы 8 и 10 активируют каспазы 3 и 7.

Апоптоз протекает как в эмбриональном развитии (например, в ходе формирования конечностей), так и после (например, в ходе созревания Т-лимфоцитов в тимусе). Кроме того, апоптоз – это важный защитный механизм, препятствующий пролиферации клеток с не поддающимися репарации повреждениями ДНК, способными привести к злокачественной трансформации.

Приобретение устойчивости к апоптозу – неотъемлемое свойство раковых клеток. Ras-трансформированные клетки могут поддерживать устойчивость к апоптозу за счет активности ERK1,2-киназ. Показано, что ERK-киназы вовлечены

в регуляцию белков семейства Bcl2. ERK способствует перемещению и накоплению белка BIM в цитозоль и таким образом препятствует развитию апоптоза – специфической формы апоптоза, индуцируемой за счет потери клеткой связи с матриксом и другими клетками (Buchheit et al, 2015). Также Ras-ERK-путь осуществляет фосфорилирование про-апоптотического белка Bad по Ser112, что поддерживает его инактивацию белками 14-3-3 (Zha et al, 1996). Фосфорилированию ERK1,2-киназами подвергается Bcl2, и, по всей видимости, в зависимости от типа ткани и клеток это фосфорилирование может нести анти-апоптотическую функцию (Deng et al, 2001; Tamura et al, 2004). Ras-ERK-путь может регулировать апоптоз даже на уровне каспаз, фосфорилируя каспазу 9 по Thr125 и ингибируя ее таким образом (Allan et al, 2003). Таким образом конститутивно активный Ras/Raf/MEK/ERK-путь поддерживает устойчивость Ras-трансформированных клеток к апоптозу как на уровне стабилизации митохондриальных мембран через регуляцию Bcl2, так и на уровне каспазы 9.

2.6.2 Взаимоотношения аутофагической гибели и апоптоза

Действующие на клетку стрессовые факторы могут индуцировать как аутофагию, так и апоптоз. Традиционно считается, что аутофагия блокирует апоптоз, а активация каспаз подавляет процесс аутофагии (Mariño et al, 2014).

Связь между сигнальными путями аутофагии и апоптоза выражается во взаимодействии аутофагического белка Beclin1 (его BH3 домена) с антиапоптотическими белками Bcl2 и Bcl-X_L. Клетки регулируют это взаимодействие, чтобы отвечать на неблагоприятные условия окружающей среды. В условиях достатка питательных веществ Bcl2 ингибируют Beclin1. Про-апоптотический белок Bim связывает Beclin1 с микротрубочками, чтобы ингибировать аутофагию. В свою очередь, аутофагия может подавлять апоптоз, изолируя поврежденные митохондрии, про-апоптотические белки, в т.ч. каспазы. Можно заключить, что аутофагия зависит от продолжительности и интенсивности стресса, а также от того, какой сигнальный путь будет преобладать, однако

взаимоотношения этих программ оказываются сложнее. В некоторых случаях, аутофагия может вносить вклад в развитие апоптоза или даже выступать как механизм гибели (аутофагическая гибель).

Аутофагия может способствовать запуску и развитию апоптотической программы разными способами. Было показано, что аутофагосомы могут служить платформами для формирования DISC-комплекса и активации каспазы 8 (Young et al, 2012). Также аутофагия может изолировать антиапоптотические белки (Mariño et al, 2014).

Аутофагическая гибель, хоть и выделяется как тип II, наряду с апоптозом (I) и некрозом (III), до сих пор остается сложным вопросом. Сложность охарактеризования аутофагической гибели связана с тем, что для этого типа гибели пока не найдено четких маркеров, в отличие от апоптоза. Аутофагическую гибель обнаружили по сильной вакуолизации цитоплазмы гибнущих клеток, однако это явление характерно и для некротических и даже апоптотических клеток. Также спорным остается вопрос о вовлечении аутофагических Atg-генов в процесс гибели. Однако в ряде случаев фармакологическое/генетическое ингибирование Atg и других регуляторов аутофагии приводило к подавлению гибели. Поэтому было принято, что аутофагической гибелью считают гибель, которая может быть подавлена ингибированием аутофагических сигнальных путей (Galluzzi et al, 2012). Эксперименты с модифицированным Beclin1 (Tat-Beclin1 – 18 аминокислот консервативного домена Beclin1, слитый с 11 аминокислотами вируса иммунодефицита человека) позволили выделить разновидность аутофагической гибели, которая получила название аутозис (Liu and Levine, 2015). Этот вид гибели характеризуется отсутствием морфологических, биохимических и генетических маркеров апоптоза и некроза, наличием собственной характерной морфологии (в частности, изменениями структуры ядерной мембраны), а также зависимостью от Na^+, K^+ -АТФазы.

Таким образом, аутофагия, исконно являющаяся механизмом спасения клетки, может стать механизмом гибели. Исследование того, какие факторы влияют на

это, внесет вклад в разработку элиминации опухолевых клеток, характеризующихся подавлением апоптотических программ.

Несмотря на прогресс в разработке терапии злокачественных опухолей, они по-прежнему остаются одной из основных причин смерти. Особенную сложность представляют собой *ras*-экспрессирующие опухоли, которые способны противостоять действию индукторов гибели за счет активации цитопротективной аутофагии и приобретать толерантность к действию киназных ингибиторов *Ras/Raf/MEK/ERK*-пути. Таким образом, необходим поиск существенно новой стратегии терапии, которая позволит добиться полной элиминации *Ras*-экспрессирующих опухолевых клеток.

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

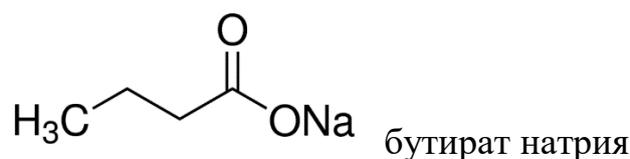
3.1.1. Клеточные линии

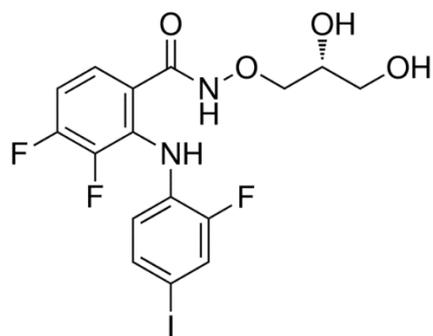
Работа выполнена с использованием эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами *E1Aad5* и *cHa-Ras* с мутациями в положениях 12 и 61 (Клетки ERas). Для оценки роли митохондрий в ответе на противоопухолевые агенты использованы клетки ERas с оверэкспрессией гена *Bcl2* человека (ERas-Bcl2). В работе использована KRas-экспрессирующая линия аденокарциномы легкого человека A549.

Клетки содержались в культуральной среде Иггла в модификации Дальбекко + 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением гентамицина, при температуре 37°C и 5% CO₂.

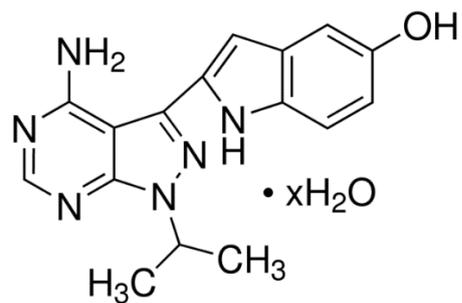
3.1.2. Ингибиторы

Ингибитор деацетилаз гистонов бутират натрия (NaBut) в концентрации 4мМ использован для индукции старения клеток. Активность MEK/ERK-пути ингибировали с помощью PD0325901 (1μМ). Активность mTOR-киназы подавляли с помощью специфического киназного ингибитора pp242 (200нМ). Для ингибирования аутофагии использован Бафиломицин А1. Для ингибирования АМПК использован Compound C (дорсоморфин).

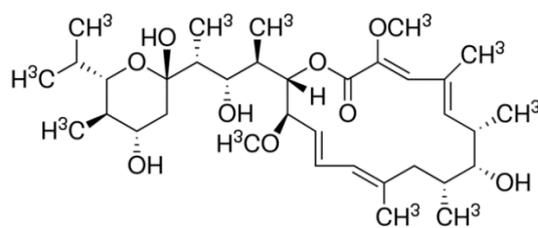




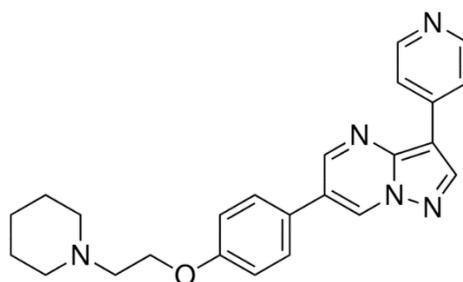
PD0325901



pp242



Бафиломицин А1



Compound C

3.1.3. Антитела

Мишень	Производитель	Каталожный номер
pan-LC3	MBL	#PM036
p62/SQSTM1	BD	#610077

	Transduction	
LAMP1	Santa-Cruz	sc-17768
pan-Ras	Oncogene Science	#OP40
E1A	Santa-Cruz	sc-58658
phospho-Ulk1 Ser757	Cell Signaling	#6888S
phospho-Ulk1 Ser555	EMD Millipore	ABC124
phospho-AMPK Thr172	Cell Signaling	#2535S
phospho-4E-BP1 Thr37/46	Cell Signaling	#2855S
phospho-S6 Ser235/236	Cell Signaling	#2211S
phospho-42/44 MAPK Thr202/Tyr204	Cell Signaling	#4377S
phospho-Akt Ser473	Cell Signaling	#4060S
phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182	Cell Signalling	#9211
TOM20	Santa-Cruz	sc-17764
mTOR	Cell Signaling	#2983S
Goat-anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Flour 488	Invitrogen	A11088
Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 568	Invitrogen	A11031
Goat-anti-Rabbit IgG HRP Conjugated	Sigma-Aldrich	A0545
Rabbit-anti-Mouse IgG	Sigma-Aldrich	A9044

HRP Conjugated		
----------------	--	--

3.2. Методы

3.2.1. Трансфекция клеток.

Для анализа слияния аутофагосом с лизосомами клетки Erag были трансфицированы плазмидой pft-Lc3 (Addgene # 21074). Клетки высевали на 35мм чашки таким образом, чтобы получить конfluence 70%. Трансфекцию осуществляли с помощью липофектамина в соответствии с инструкциями производителя (Lipofectamine 2000, Invitrogen, 11668-027). Через 48 часов после трансфекции клетки пересевали на свежую среду для селекции. Селекция стабильной линии осуществлялась с помощью G418.

3.2.2. Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

Клетки высевали на 12-луночный планшет в плотности 2×10^4 клеток на лунку и культивировали с ингибиторами. Через 24, 72, 120ч эксперимента среду с ингибиторами заменяли на раствор МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем раствор МТТ заменяли на DMSO и инкубировали клетки еще 30 минут. DMSO с растворенным в нем формазаном наносили на лунки 96-луночного планшета (по 80 μ л) и измеряли количество формазана при длине волны 572 нм.

3.2.3. Оценка пролиферативной активности клеток

Пролиферативную активность клеток оценивали при помощи кривых клеточного роста. Клетки высевались на 35мм чашки в плотности 3×10^4 к/чашка. Клетки культивировали с ингибиторами в течение пяти суток. Через 24, 72, 120ч производили подсчет клеток, из расчета по три чашки на точку для каждого варианта.

3.2.4. Оценка клоногенной выживаемости клеток

Клетки высевали на 35мм чашки и культивировали с ингибиторами в течение необходимого времени. В указанное время клетки трипсинизировали и пересеивали на новые 35мм культуральные чашки в среду без ингибиторов в плотности 100клеток/1мл среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в течение времени, необходимого для формирования клонов контрольными, не подвергавшимися воздействию ингибиторов клетками. Затем клетки промывали теплым фосфатно-солевым буфером (PBS) и окрашивали Кристалл-Виолетом в течение 30 мин при комнатной температуре.

3.2.5. Проточная цитометрия

Распределение клеток по фазам клеточного цикла и их размер при действии ингибиторов изучали с помощью метода проточной цитометрии. Клетки после культивирования трипсинизировали, осаждали центрифугированием при 350g в течение 3 мин и промывали PBS. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии 0.01 % сапонины, промывали PBS и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл) в присутствии пропидия иодида при 37 °С в течение 15 мин. Анализ проводили на цитометре Odam (Brucker, Франция).

3.2.6. Иммунофлуоресценция

Клетки культивировали в чашках Петри на покровных стеклах с ингибиторами в течение нужного времени, затем промывали PBS и фиксировали 3% формальдегидом в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали PBS и пермеабелизовали при помощи 0,2% Triton X-100 в течение 20 минут. Затем производилось блокирование при помощи 3% BSA на TBS-T в течение 1.5 часов, после этого клетки инкубировались с первичными поликлональными антителами на 3% BSA на TBS-T в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывались и инкубировались со вторичными антителами Goat-anti-rabbit и Goat-anti-mouse несущими флюоресцентную метку AlexaFluor 488 и Alexa Fluor 543 (Invitrogen) соответственно, а также с DAPI для окрашивания

ядер, в течение часа. Изображения получали при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SL (100-кратное увеличение) и Olympus FluoView 3500 (60X увеличение плюс зум).

3.2.7. Анализ морфологии клеток

Клетки высевали на покровные стекла и культивировали в присутствии ингибиторов в течение необходимого времени, затем стекла промывали PBS и окрашивали эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду в течение 1-1,5 мин при комнатной температуре. Окрашенные стекла промывали проточной водой и заключали в канадский бальзам. Изображения анализировали на микроскопе Pascal при увеличении 40X и 60X.

3.2.8. Вестерн-блоттинг

Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем 1 % Igepal, 0.5 % деоксихолата натрия, 0.1 % SDS, 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 60 мМ NaF, 50-кратный коктейль протеазных и фосфатазных ингибиторов. Предварительно измеряли белок в пробах по методу Брэдфорд для расчета объема наносимых проб. Белки разделяли в SDS-полиакриламидном геле (12, 12,5, 10, 8%). После электрофоретического разделение белки переносили на PVDF-мембрану с помощью мокрого переноса. Блокирование мембраны проводили 10%-ным раствором молока на буфере TBS-T в течение 1 ч, затем мембраны инкубировали с первичными антителами в растворе 5%-ного BSA в буфере TBS-T в течение 10--12 ч при 4 °C. Затем проводили инкубацию со вторичными антителами (Goat-anti-rabbit и Rabbit-anti-mouse) – конъюгатами с пероксидазой хрена, выявляемыми методом ECL. Детекцию сигнала осуществляли с помощью системы гель-документации GeneSys. Денситометрию полос Вестерн-блоттинга производили при помощи программы GelPro3.

3.2.9. Анализ фрагментации ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Клетки высевали на 100мм чашки в плотности 5×10^5 тыс. клеток на чашку и культивировали с ингибиторами. Через 24, 72, 120ч клетки суспензировали и лизировали в буфере (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1M EDTA, 0,5% SDS) в течение 30 мин при +4С. Затем в буфер добавляли 150мМ NaCl и 100 мкг РНКазы А и инкубировали 1 час при 37С. По истечении этого времени в лизаты добавляли 200мкг Протеиназы К и 0,5% SDS и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. ДНК выделяли добавлением $\frac{1}{2}$ объема фенола, $\frac{1}{4}$ объема хлороформа и $\frac{1}{24}$ объема изоамилового спирта в течение 30 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании с последующим центрифугированием, после чего отбирали водную ДНК-содержащую фазу. ДНК осаждали с помощью 0,5М ацетата натрия и двойного объема 96% этанола, промывали 70% этанолом и сушили при 37С, затем растворяли в 50 мкл Tris-EDTA буфера. Измерение ДНК проводили на спектрофотометре. Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в буфере, содержащем 40 mM Tris, 20mM ацетата, 1mM EDTA с бромистым этидием при 100-150V напряжении. Визуализацию нуклеосомного повтора осуществляли с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat (Vilber, Германия). В качестве позитивного контроля использовались клетки ERas, подвергнутые сывороточному голоданию (Nelyudova et al., 2007).

3.2.10. Анализ активности каспаз

Клетки лизировали в буфере (50 mM HEPES-HCl pH 7.4; 0,1% IGEPAL, 0,1% CHAPS, 5mM DTT) в течение 30 мин. Концентрацию белка в пробах измеряли по методу Брэдфорд. Для реакции отбирали 50 мкг белка и инкубировали в реакционном буфере (20mM HEPES-HCl, pH 7.4, 0,1% CHAPS, 2mM EDTA, 5mM DTT) с флуорогенными субстратами: Ac-DEVD-AMC (EMD Millipore) для каспазы 3, Ac-VETD-AMC (Sigma) для каспазы 8 и Ac-LEHD-AFC (EMD Millipore) для каспазы 9. Подвергнутые сывороточному голоданию ERas использовались в качестве позитивного контроля. Измерение проводили при

следующих длинах волн: $E_x/E_m=380/460$ nm (каспаза 3), 435/538 nm (каспаза 8), 400/505 nm (каспаза 9).

3.2.11. Анализ активности протеасом

Клетки лизировали в буфере (50 mM HEPES pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% TRITON X-100, 2mM АТР) в течение 20 мин. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд. 10 мкг белка инкубировали в реакционной смеси (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl) вместе с субстратами #BML-P802-0005 (Enzo) для измерения 20S-протеасомной активности, #BML-AW9785-0005 (хемотрипсин-подобная активность), #BML-ZW9345-0005 (каспаз-подобная активность). Измерение проводили при длинах волн $E_x/E_m=380/460$ и 345/445.

3.2.12. Оценка целостности митохондрий

Клетки высевали на покровные стекла и культивировали с ингибиторами необходимое время. Для окрашивания митохондрий использовались Mitotracker Green, Mitotracker Red, Mitotracker Orange (Thermo Fischer, M7514, M7512, M7510). Красители разводили в среде DMEM без сыворотки в следующих концентрациях: MitoGreen – 200nM, Mito Red – 100nM, MitoOrange – 50nM. В указанные сроки среду заменяли на среду с красителями и инкубировали клетки в течение 30 мин при температуре 37°C. Через 30мин стекла промывали теплым PBS и снимали на конфокальном микроскопе Leica TSC5. Ядра окрашивали с помощью Hoechst33342 (Thermo Fischer, 62249).

3.2.13. Измерение количества активных форм кислорода (АФК)

Клетки высевали на 35мм чашки в плотности 5×10^4 . на чашку и культивировали с ингибиторами. В указанное время в среду добавляли краситель DCF-DA в концентрации 10 мг/мл и инкубировали клетки 30 мин при 37°C. Измерение проводили при длине волны $E_x/E_m=495/529$

3.2.14. Измерение уровня лактата в среде культивирования

Клетки культивировали с ингибиторами в течение 72ч. Затем отбирали 500 мкл среды и откручивали с использованием фильтров (Sigma-Aldrich, Z740170-8EA). Измерение лактата в пробах было произведено в соответствии с инструкциями производителя (BioVision, #K607-100).

3.2.15. Анализ активности лизосом с помощью Lysotracker Green

Клетки высевали на стекла в плотности 5×10^4 /35мм чашка и культивировали с ингибиторами. В указанные сроки стекла помещали в среду, содержащую 100нМ красителя Lysotracker Green (Thermo Fischer, L7526) и инкубировали 25 минут при 37С. Затем стекла промывали теплым PBS и проводили съемку на микроскопе Leica TSC. Ядра визуализировали с помощью Hoechst 33342 (Thermo Fischer, 62249).

3.2.16. Трансмиссионная электронная микроскопия

Клетки после культивирования с ингибиторами фиксировали в смеси 2,5% глутаральдегида в 0,1М какодилатном буфере, инкубировали с тетроксидом осмия, после дегадратации заключали в смесь Аралдит-Эпон. Изображения были получены с помощью микроскопа Zeiss Libra 120.

3.2.17. Анализ ассоциированной со старением бета-галактозидазы

Детекцию активности ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -Gal) проводили по описанному методу (Dimri et al, 1995) при pH=6.0.

3.2.18. Измерение содержания белка в клетках

Клетки высевали на 100мм чашки в плотности 7×10^6 и культивировали с ингибиторами. В указанное время клетки трипсинизировали, отбирали по 1млн клеток и лизировали в буфере RIPA. Измерение количества белка проводили по методу Брэдфорд.

3.2.19. Оценка размера клеток

Клетки высевали на 60мм чашки в плотности 15×10^4 т.к. и культивировали с ингибиторами. В указанное время клетки трипсинизировали и собирали в PBS. Оценку бокового светорассеяния проводили с помощью проточной цитометрии (Shapiro, 1988).

3.2.20. Анализ активности лизосомальной бета-галактозидазы

Обработка проб проводилась аналогично подготовке для детекции SA- β -Gal, однако при pH=4.0.

3.2.21. Статистическая обработка

Денситометрию бэндов Вестерн-блоттинга проводили с помощью программы GelPro3. Анализ флуоресцентных изображений осуществляли с помощью ImageJ. Данные предоставлены как среднее как минимум трех экспериментов \pm стандартная ошибка среднего. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

4. Результаты

4.1. Трансформанты *ERas* восстанавливают жизнеспособность при ингибировании MEK/ERK-пути за счет активации цитопротективной AMPK-зависимой аутофагии.

Эмбриональные фибробласты крысы *E1A+cHa-Ras* (*ERas*) были получены путем введения в нормальные фибробласты грызунов комплементирующих онкогенов *E1Aad5* аденовируса 5 типа человека и *cHa-ras* человека с мутациями в 12 и 61 положениях. Для подавления MEK/ERK-пути использовали ингибитор MEK-киназ PD0325901 (PD) в концентрации 1μM. Данная концентрация ингибитора приводит к полному подавлению фосфорилирования киназ ERK1,2 через 2 часа и ингибирование фосфорилирования сохраняется в течение всего времени эксперимента (120 часов, Рис 1).

Ингибирование MEK/ERK-пути снижает пролиферативную активность клеток по сравнению с контролем, но, тем не менее, к пятым суткам популяция удваивается, по сравнению с начальной плотностью посева (Рис.2А). Согласно данным по клоногенной выживаемости, 57% клеток после действия PD сохраняют способность к пролиферации через сутки, затем число их падает до 35% после пяти суток подавления активности ERK-киназ (Fig 2Б). Падение пролиферативной активности может быть связано с подавлением фосфорилирования киназ ERK1,2 (Рис 1), которые, по некоторым данным, вовлечены в многочисленные сигнальные пути, влияющие на прохождение клеток по циклу, пролиферацию и клеточную гибель (Weber et al, 1997, Villanueva et al, 2007). Обнаружено, что подавление MEK-ERK активности вызывает эффективное подавление репликации и накопление клеток на границе G1/S фаз клеточного цикла (Рис 2). Однако согласно данным кривых роста, через 120 часов культивирования, клетки вновь возобновляют прирост. Кроме того, после удаления ингибитора PD из среды культивирования клетки полностью восстанавливают пролиферативную активность (Рис 2). Ингибирование

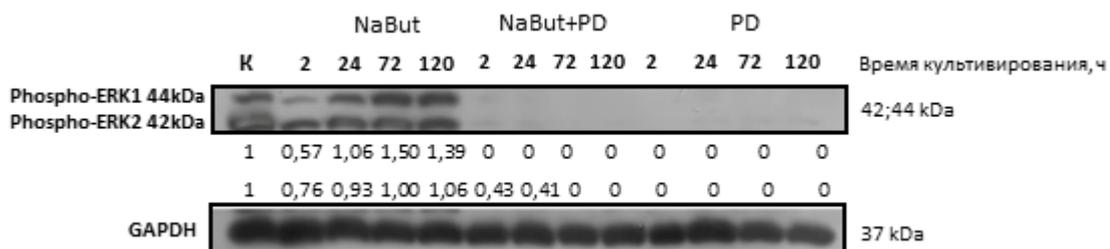


Рис 1. Ингибитор MEK/ERK-пути PD0325901 полностью подавляет фосфорилирование ERK1,2-киназ в течение 120 ч эксперимента как в контрольных, так и в стареющих (NaBut) клетках. Вестерн-блоттинг с антителами к phospho-ERK1,2 и GAPDH. Цифры обозначают денситометрию бендов.

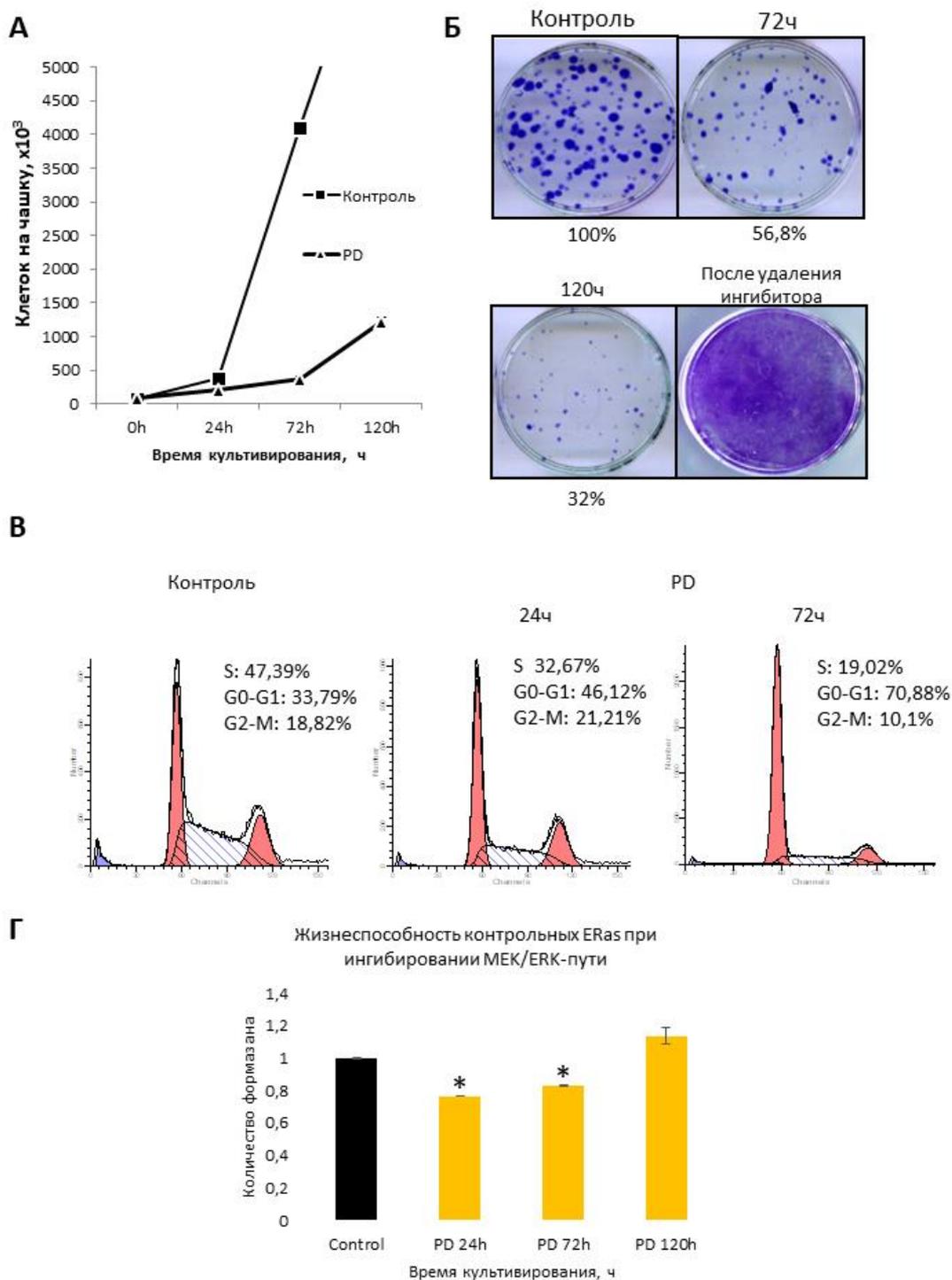


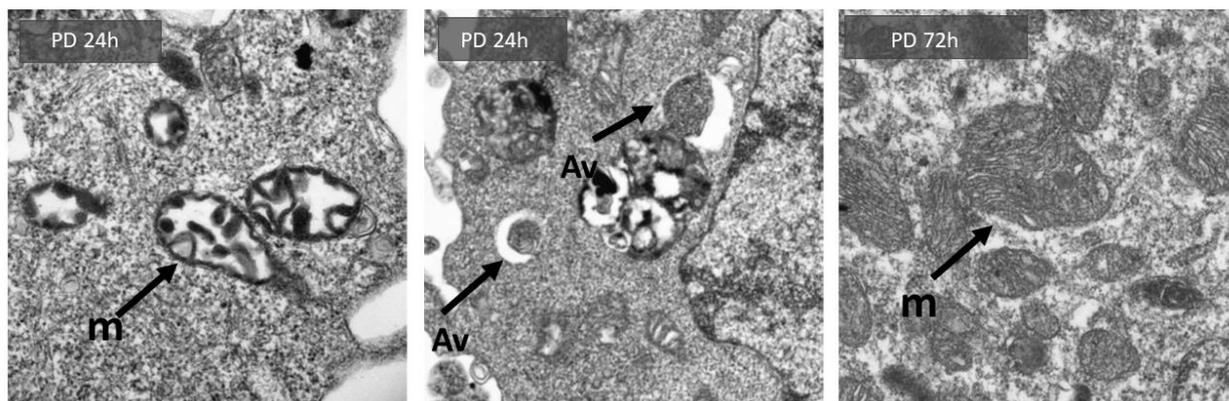
Рис 2. Ингибирование MEK/ERK-пути снижает жизнеспособность и пролиферативную активность клеток через 24ч, однако через 72ч жизнеспособность и пролиферативная активность клеток восстанавливаются. Изменение пролиферативной активности (А), клоногенной выживаемости (Б, regrowth: ингибитор удален после 120ч культивирования), распределения по фазам клеточного цикла (В) и жизнеспособности (Г, МТТ-тест) контрольных клеток ERas в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$

MEK/ERK вызывает не только снижение пролиферации, но и гибель части популяции через 24ч культивирования, о чем свидетельствуют данные МТТ-теста. Тем не менее, через 120ч жизнеспособность клеток полностью восстанавливается (Рис 2Д).

Падение жизнеспособности может быть связано с повреждением митохондрий, которые являются основой сохранения жизнеспособности Ras-экспрессирующих клеток (Guo et al, 2011; Bettoun et al, 2016). Для проверки этой версии был проведен анализ повреждений митохондрий при ингибировании MEK/ERK-пути методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и с помощью прижизненных красителей Mitotracker Red (потенциал-зависимый, связывается только с неповрежденными митохондриями) и Mitotracker Green (потенциал-независимый, окрашивает все митохондрии). ТЭМ показала, что подавление фосфорилирования ERK-киназы приводит к повреждению митохондрий. Через 24 часа подавления MEK/ERK в клетках поврежденные митохондрии выявляются в вакуолях, напоминающих аутофагосомы (Рис 3А). Тем не менее, через 72 часа культивирования поврежденные митохондрии уже не выявляются (Рис 3). Прижизненное окрашивание Митотрекерами демонстрирует сигнал не только потенциал-независимого Mitotracker Green, но и потенциал-зависимого Mitotracker Red, подтверждая данные, о том, что на третьи сутки митохондрии в клетках функционируют (Рис 3Б). Таким образом, через 72ч поврежденные митохондрии элиминируются, и жизнеспособность клеток восстанавливается.

Поскольку известно, что поврежденные митохондрии удаляет селективная форма аутофагии митофагия, был исследован аутофагический ответ в контрольных клетках при ингибировании MEK/ERK-пути. Вестерн-блоттинг показал, что через 2 – 24 часа в клетках происходит активация АМПК. Повышение уровня фосфорилирования АМПК по сайту Thr172 сопровождается фосфорилированием ключевой для инициации аутофагии киназы Ulk1 по сайту-мишени АМПК Ser555 и индуцируется АМПК-регулируемая аутофагия (Рис 4А). Аутофагический флюкс был исследован методами конфокальной микроскопии и

А



Б

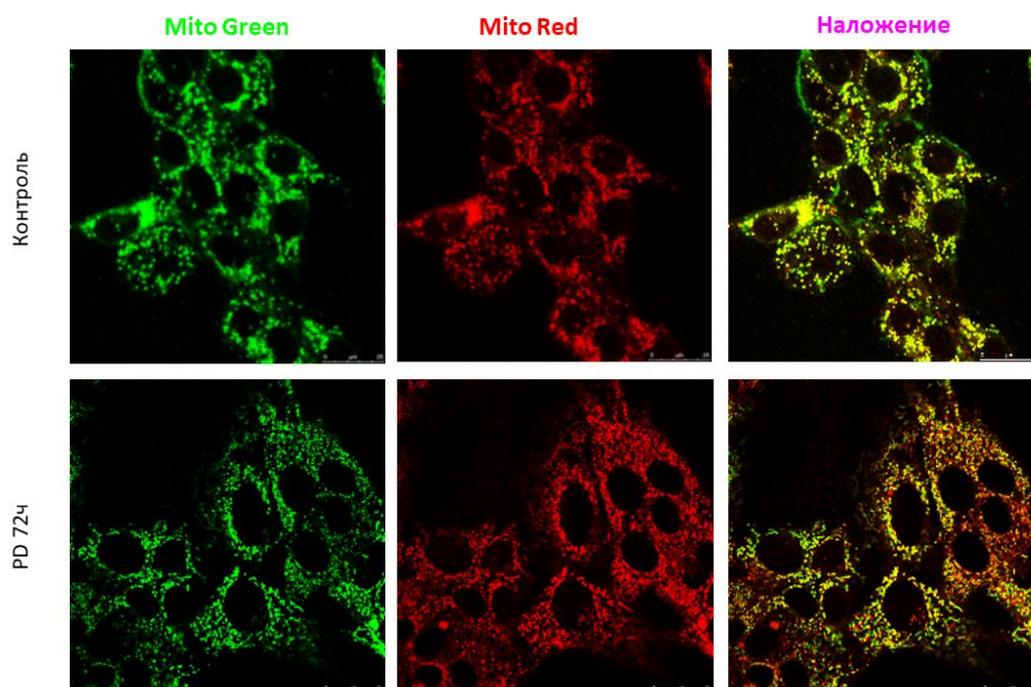


Рис 3. Ингибирование MEK/ERK-пути вызывает повреждение митохондрий. А. Трансмиссионная электронная микроскопия. Б. Детекция митохондрий с помощью Mitotracker Green и Mitotracker Red. Масштабная линейка 25 μm .

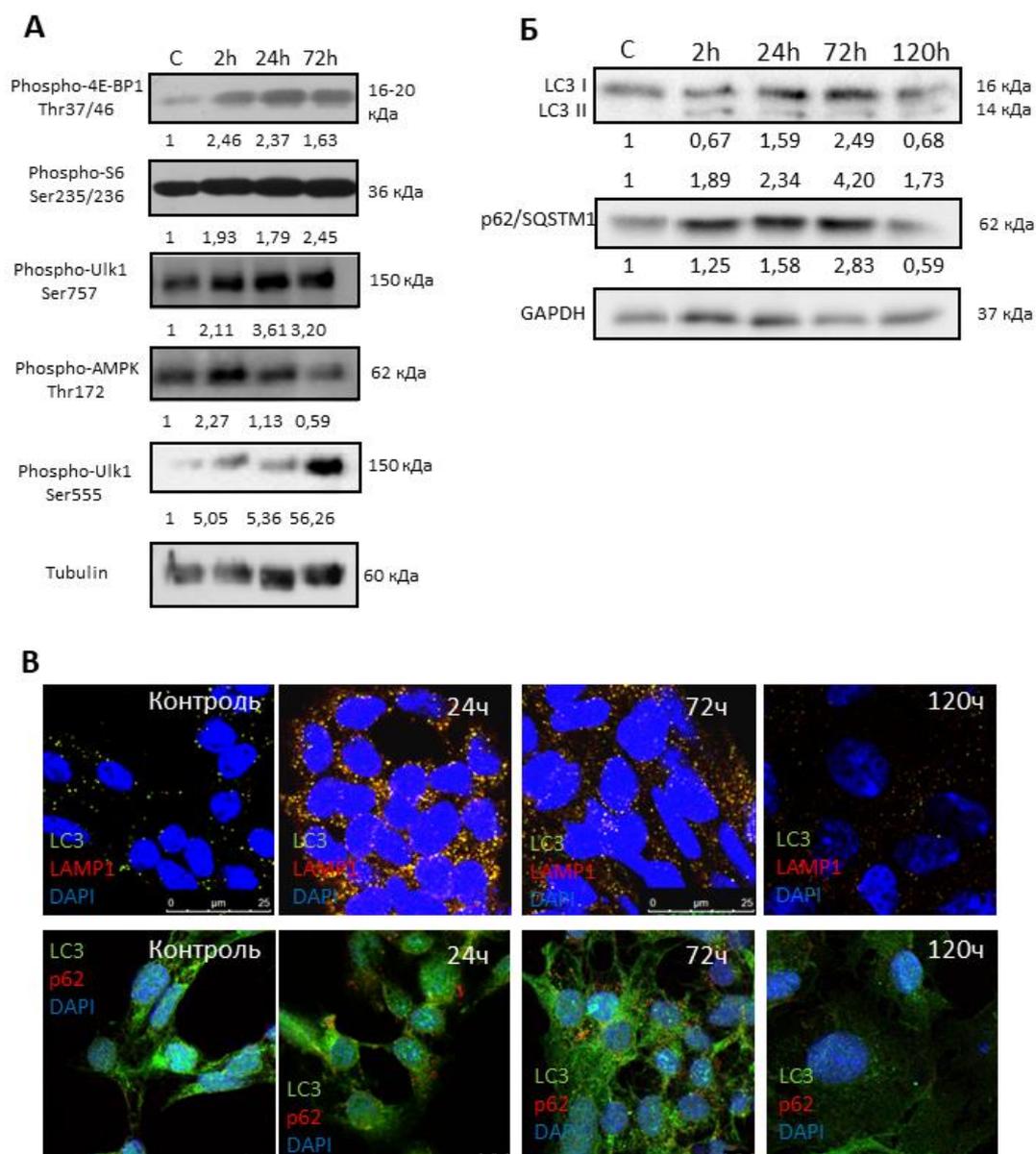


Рис 4. Ингибирование MEK/ERK-пути в контрольных клетках активирует AMPK-индуцированную аутофагию, которая длится в течение 72ч и завершается полным слиянием аутофагосом с лизосомами. А. Фосфорилирование регуляторов аутофагии AMPK, mTOR и их мишени Ulk1 при ингибировании MEK/ERK. Вестерн-блоттинг; цифры обозначают денситометрию бендов Вестерн-блоттинга. Б. Поведение маркеров аутофагии LC3 и p62/SQSTM1. Вестерн-блоттинг анализ с АТ к LC3 и p62/SQSTM1. В. ИФ с АТ к маркеру аутофагии LC3 и маркеру лизосом LAMP1, демонстрирующая активное слияние аутофагосом с лизосомами. Масштабная линейка 25 μ m.

вестерн-блоттинга. Были проанализированы следующие маркеры: накопление, внутриклеточная локализация и конверсия цитоплазматической формы LC3I в липид-связанную с аутофагосомами форму LC3II, поведение p62/SQSTM1, характер накопления и колокализация этих белков, а также поведение маркера лизосом белка LAMP1. Показано, что microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) претерпевает конверсию цитоплазматической формы LC3I в форму LC3II, путем конъюгации с фосфатидил-этанололамином (PE), которая ассоциирована, как с внутренней, так и с наружной мембраной аутофагосом. Белок p62 (также известный как SQSTM1/Sequestome 1), селективно включается в аутофагосомы путем прямого связывания с LC3 и одновременно с ним деградирует в аутофагосомах. Общее содержание p62/SQSTM1 в клетке обратно коррелирует с активностью аутофагии (Komatsu and Ichimura, 2010; Johansen and Lamark, 2011; Bitto et al, 2014). На основании совокупности данных иммунофлуоресценции и вестерн-блот анализа в динамике, можно предполагать, активируется процесс или блокируются отдельные его стадии (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2004, Mizushima et al., 2010). Индуцируемая PD аутофагия характеризуется активной конверсией LC3 I в LC3II через 2-24 часа культивирования (рис 4Б). Согласно данным иммунофлуоресценции с антителами к LC3 и к маркеру лизосом LAMP1, через 24 и 72 ч культивирования аутофагосомы активно сливаются с лизосомами (Рис 4В). Маркер p62/SQSTM1 выявляется на протяжении 2 – 72 ч культивирования и исчезает через 120 часов, что коррелирует с данными о конверсии LC3I в LC3II. Для подтверждения данных, полученных с помощью ИФ анализа клеточных белков, клетки были трансфицированы плазмидой, содержащей LC3, слитый с GFP и mRFP (Eras-ptfLC3; Addgene #21074). При слиянии аутофагосом с лизосомами сигнал GFP гаснет вследствие ацидификации, в то время как mRFP остается стабильным, что позволяет сделать вывод о том, завершился ли аутофагический процесс слиянием аутофагосом с лизосомами (Kimura et al, 2007). При ингибировании MEK/ERK пути диффузный сигнал LC3 плазмиды формирует фокусы, однако в них выявлен только mRFP сигнал (Рис 5), что подтверждает данные о слиянии аутофагосом с

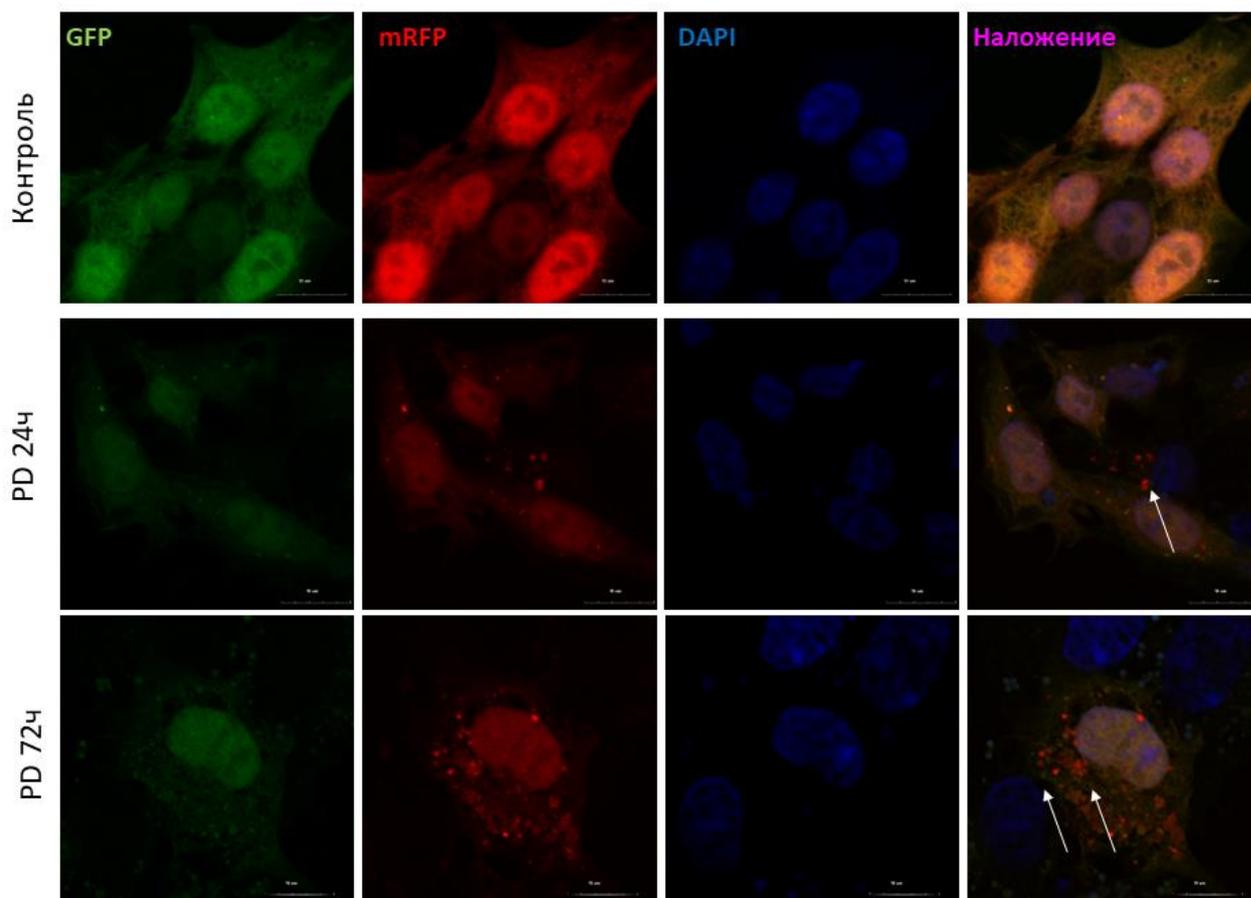


Рис 5. Ингибирование MEK/ERK-пути в контрольных клетках индуцирует аутофагию, которая завершается слиянием аутофагосом с лизосомами. Клетки были трансфицированы плазмидой GFP-mRFP-LC3; гашение сигнала GFP и выявление только mRFP происходит при слиянии аутофагосом с лизосомами (белые стрелки). Ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 10 μ m.

лизосомами, полученные с помощью ИФ с антителами к LAMP1 и LC3 (Рис 4). Таким образом, ингибирование MEK/ERK-пути приводит к активации, АМПК-регулируемой аутофагии, которая завершается после 72 часов культивирования клеток с ингибитором PD и способствует восстановлению жизнеспособности клеток (МТТ-тест). Согласно данным ТЕМ, уже через 24ч поврежденные митохондрии можно видеть в везикулах напоминающие аутофагических (Рис 3А), таким образом, аутофагия в контрольных клетках играет цитопротективную роль, направленную на элиминацию поврежденных митохондрий. Оценка жизнеспособности клеток с ингибированным MEK/ERK при подавлении аутофагии бафиломицином А1 приводит к выраженному снижению жизнеспособности через 72 ч культивирования, в отличие от одного MEK/ERK-ингибитора, где клетки начинают восстанавливать свою жизнеспособность (Рис б). В том случае, если ингибирование MEK/ERK-пути происходит одновременно с ингибированием активности АМПК-киназы с помощью ингибитора Compound С, то также наблюдается существенное снижение жизнеспособности клеток (Рис б). Эти данные говорят в пользу того, что при ингибировании MEK/ERK активация АМПК-регулируемой аутофагии позволяет клеткам восстановить жизнеспособность, так как подавление аутофагии приводит к клеточной гибели.

Ras/Raf/MEK/ERK-сигнальный каскад является позитивным регулятором mTORC1, поэтому можно было ожидать, что подавление фосфорилирования ERK-киназ приведет к снижению активности mTORC1. Однако данные Вестерн-блоттинга по фосфорилированию мишеней mTORC1 (ингибитора инициации элонгации трансляции 4E-BP1 и рибосомального белка S6) показали, что комплекс mTORC1 сохраняет свою активность, несмотря на подавление фосфорилирования ERK1,2 (Рис 4А). Кроме того, было обнаружено, что уровень фосфорилирования киназы Ulk1 по сайту-мишени mTORC1 Ser757 не уменьшается при ингибировании MEK/ERK-пути. Таким образом, индуцируемая

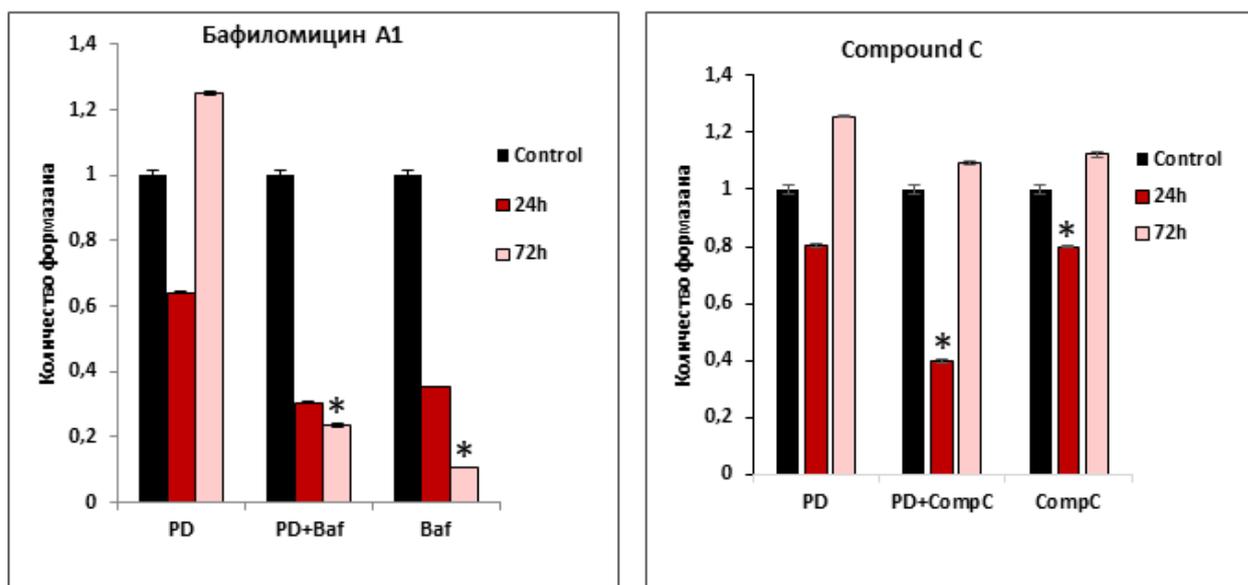


Рис 6. Активация AMPK и индукция аутофагии играют цитопротективную роль в контрольных клетках Eras при ингибировании MEK/ERK, т.к. подавление активности AMPK (Compound C) или аутофагии (Бафиломицин A1) снижают жизнеспособность клеток при ингибировании MEK/ERK. Клетки культивировали с ингибиторами в течение указанного срока и анализировали жизнеспособность методом МТТ-теста. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$

PD аутофагия является mTOR-независимой. По всей видимости, в клетках Erag при ингибировании MEK/ERK-пути некий альтернативный сигнальный путь обеспечивает поддержание активности mTORC1. Ras, кроме Raf/MEK/ERK-каскада, имеет много других мишеней, в число которых входят PI3K-каскад и каскады стресс-киназ p38 и JNK (McDermott and O'Neill, 2002; Rajalingam et al, 2007; Cellurale et al, 2011). Анализ фосфорилирования Akt (Ser473) и p38 киназы показал, что при ингибировании MEK/ERK-пути клетки сохраняют активность PI3K-каскада, в то время как фосфорилирование киназы p38 снижается (Рис 7).

Клетки сохраняют активность комплекса mTORC1, несмотря на ингибирование MEK/ERK-пути, являющегося позитивным регулятором mTORC1. Кроме того, согласно данным проточной цитометрии, снижается активность их пролиферации, то есть имеются два фактора, необходимых для развития программы старения. В связи с этим были проанализированы маркеры старения в клетках при ингибировании MEK/ERK-пути: ассоциированная со старением β -галактозидазная активность, размер клеток и содержание белка в них. Несмотря на высокую активность mTORC1 и блок клеточного цикла, в клетках не развивается активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (Рис 8). Размер клеток и количество белка через 72ч культивирования в присутствии ингибитора MEK/ERK-пути немного уменьшаются по сравнению с контролем. Таким образом, несмотря на блок клеточного цикла и высокую активность mTORC1, клетки не развивают программу старения. Причина, по всей видимости, связана с активацией процесса аутофагии, которая в течение этого промежутка времени может отменять ее развитие.

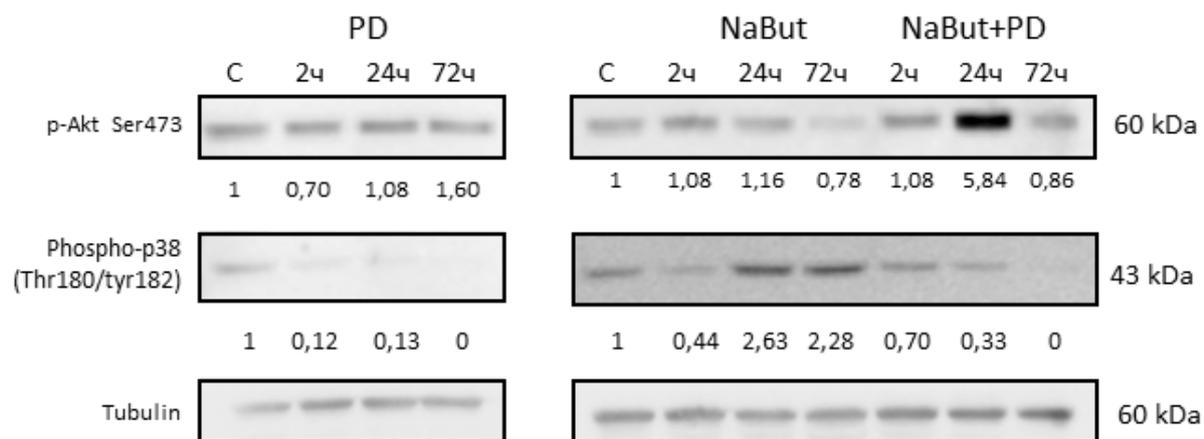
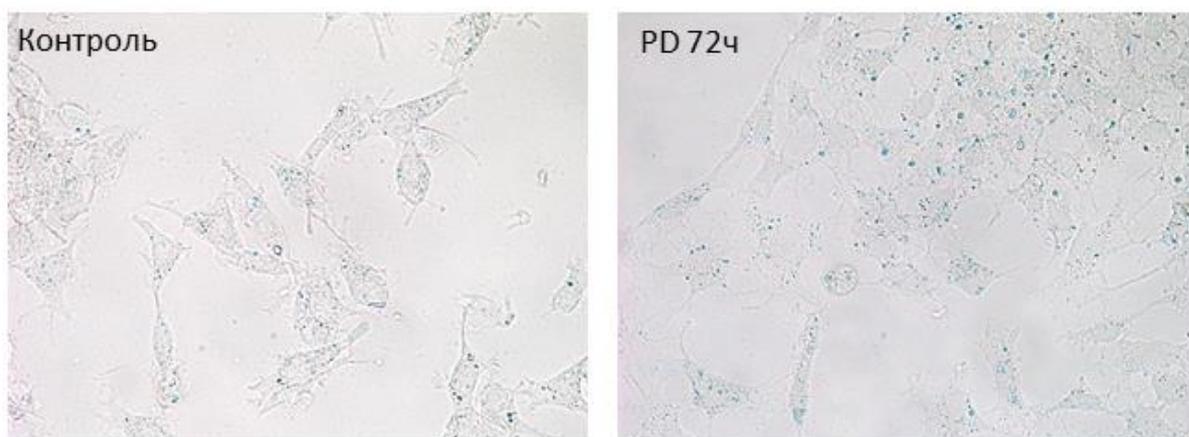


Рис 7. Ингибирование MEK/ERK-пути в клетках Erag приводит к снижению фосфорилирования киназы p38. Вестерн-блоттинг клеток Erag с АТ к фосфо-p38. Цифры обозначают денситометрию бендов.

А



Б

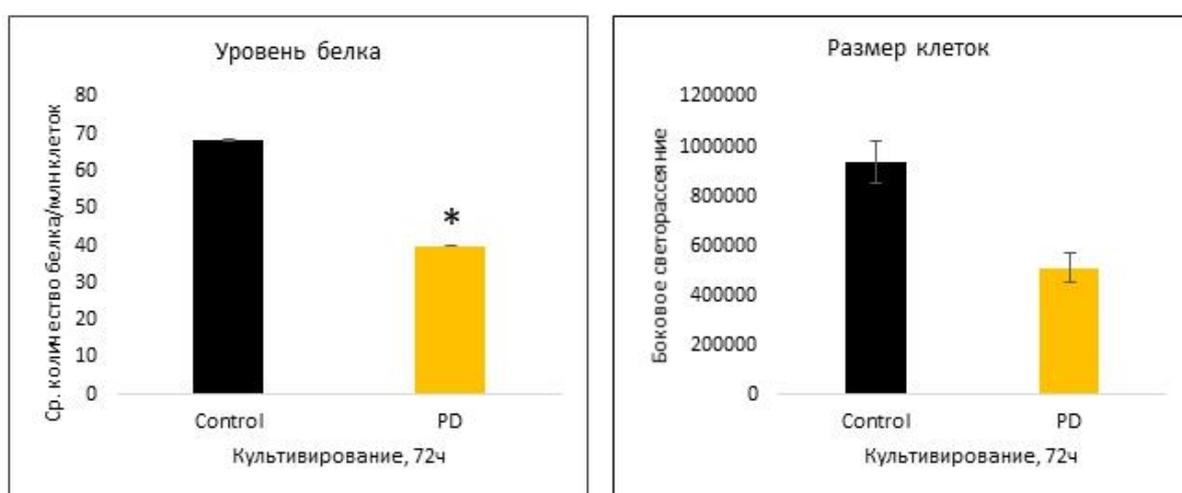


Рис 8. В контрольных клетках после 72ч ингибирования MEK/ERK-каскада не выявляются маркеры старения. А. Ассоциированная со старением β -галактозидазная активность. 40х ув. Б. Уровень белка и размер клеток после 72ч ингибирования MEK-киназ; указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$.

4.2. Стареющие клетки не способны завершать аутофагию в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути и гибнут апоптозом.

Согласно полученным нами данным, контрольные клетки способны преодолеть действие ингибитора MEK/ERK-пути благодаря активации, АМПК-регулируемой аутофагии. В связи с этим, был исследован аутофагический ответ, на ингибирование MEK/ERK клеток ERas, индуцированных к старению. Для индукции старения использовали ингибитор деацетилаз гистонов бутират натрия (NaBut), который способен вызывать старение клеток ERas в концентрации 4μM (Lorenz et al, 2011, Зубова и др, 2005).

Ингибирование MEK/ERK-пути приводит к выраженному падению пролиферативной активности и клоногенной выживаемости клеток (Рис 9). Клоны формируют 17,5% клеток через 72 часа культивирования и 8,8% клеток через 120 часов культивирования. Клетки, сохраняющие пролиферативный потенциал, формируют очень мелкие клоны. Несмотря на сходство результатов по антипролиферативному эффекту индукции старения в условиях активного и ингибированного MEK/ERK-пути, очевидно, что в основе антипролиферативного действия этих ингибиторов и их комбинированного действия, лежат разные молекулярные механизмы. Эффективность клонирования NaBut-обработанных клеток падает в связи с тем, что они претерпевают процесс старения, который связан с подавлением пролиферативной активности, но не с клеточной гибелью, поскольку клетки сохраняют высокую жизнеспособность, характерную для стареющих клеток, о чем свидетельствуют значения МТТ, сравнимые с контролем (Рис 9). В то же время уже через 72 часа ингибирования MEK/ERK-пути в стареющих клетках по данным МТТ теста их жизнеспособность падает более чем в пять раз. По данным проточной цитометрии видно, что часть клеточной популяции имеет содержание ДНК менее 2n, которое говорит о клеточной гибели. Это говорит в пользу того, что ингибирование MEK/ERK-пути в индуцированных к старению клетках подавляет пролиферацию преимущественно за счет

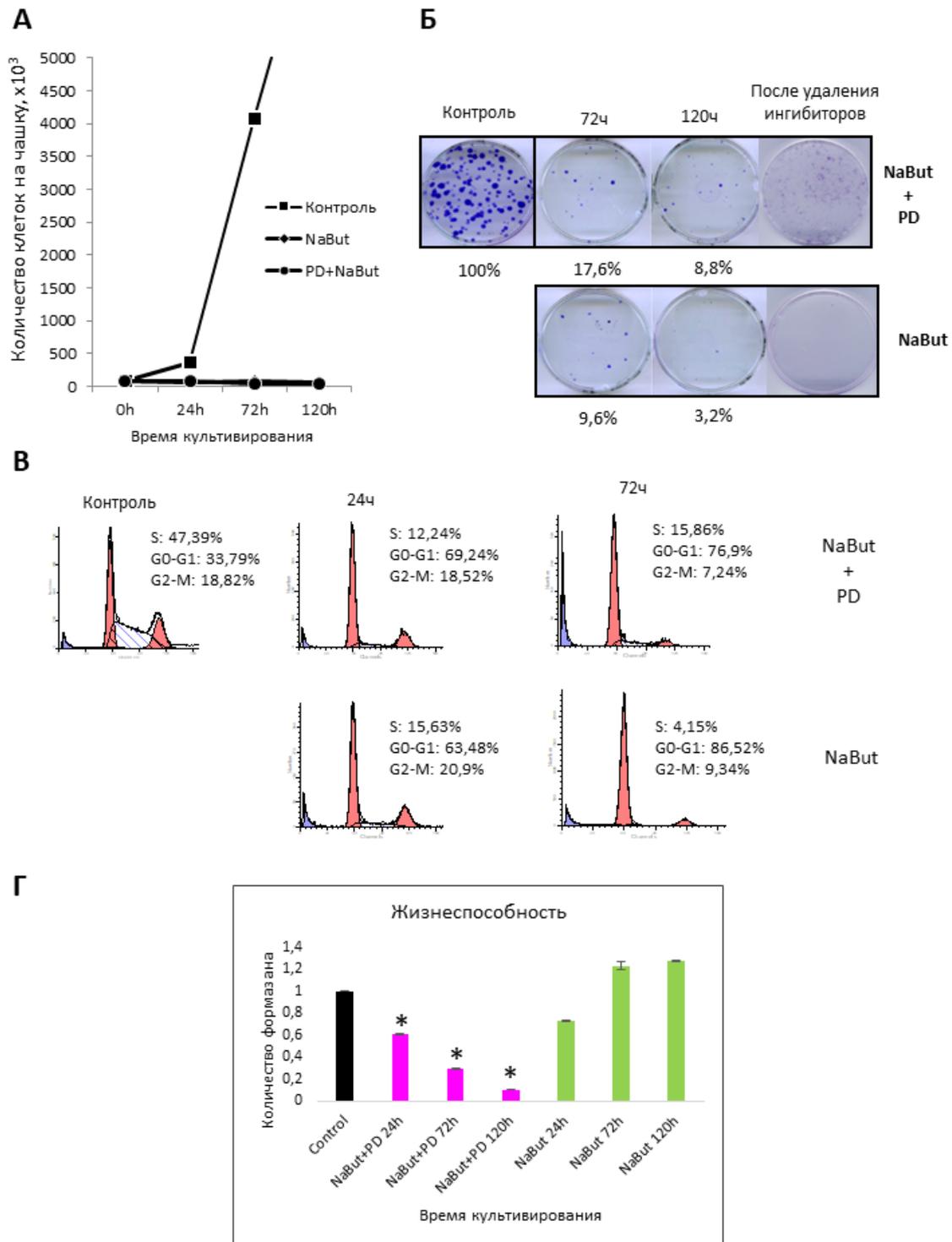


Рис 9. Подавление MEK/ERK-пути в стареющих клетках приводит к достоверному падению жизнеспособности клеток. А. Пролиферативная активность. Б. Клоногенная выживаемость, regrowth: ингибиторы удалены после 120ч культивирования. В. Распределение клеток по фазам клеточного цикла. Г. Жизнеспособность, МТТ-тест. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$.

эффективной гибели клеток. Согласно данным ТЭМ, в старых клетках при ингибировании MEK/ERK-пути происходит повреждение митохондрий. Стареющие клетки ERas с ингибированным MEK/ERK имеют митохондрии с неупорядоченными кристами и электронно-плотными или концентрическими мембранными структурами внутри, а также с частичной и полной потерей крист. Митохондрии, лишенные крист, присутствуют в виде округлых электронно-пустых структур с двойными мембранами (Рис. 10). Хотя митохондрии сильно повреждены, их изоляция в аутофагосомы не наблюдается, в отличие от контрольных клеток (Рис 3). Этот результат подтверждается данными прижизненного окрашивания Mitotracker Red и Green, демонстрирующими клетки, в которых отсутствует сигнал Mito Red, который окрашивает неповрежденные митохондрии (Рис 11). Повреждение митохондрий влечет за собой повышение уровня активных форм кислорода в 3,5 раза по сравнению с контролем, в то время как в контрольных клетках АФК, накапливающийся через 2-24ч эксперимента, через 72ч возвращается к контрольному уровню. Старые клетки с активным MEK/ERK тоже имеют повышенный уровень АФК через 72ч культивирования с NaBut, однако это, по всей видимости, не вызывает повреждающего действия за счет баланса с системами антиоксидантов при развитии фенотипа старения (Chen et al, 2015; Nagano et al, 2017).

Поскольку поврежденные митохондрии в стареющих клетках не были элиминированы, можно предполагать, что эти клетки не могут развить такой же полноценный аутофагический ответ, как и интактные. С этой целью были проанализированы активность AMPK, mTORC1 и аутофагический флюкс в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK. Согласно полученным данным, в старых клетках с ингибированным MEK/ERK-путем фосфорилированная AMPK накапливается через 2 и 24ч эксперимента, с последующим увеличением уровня фосфорилирования Ulk1 Ser555 (Рис 12А). Однако конверсия LC3 I в LC3 II протекает с низкой интенсивностью, а кроме того, снижается общее количество LC3, что позволяет предполагать нарушение процесса аутофагии (Рис 12Б). Согласно данным ИФ, в старых клетках не

происходит слияния аутофагосом с лизосомами (Рис 12В). Это подтверждают результаты, полученные на линии, с интегрированной плазмидой Eras-ptfLC3. Плазмидная LC3 выявляется в кластерах, однако присутствуют оба сигнала: и GFP, и mRFP, следовательно, индукция аутофагии произошла, но не произошло слияния аутофагосом с лизосомами (Рис 13). Анализ активности лизосомальной β -галактозидазы (pH=4.0) показал, что в старых клетках с не ингибированным MEK/ERK ее активность повышена, однако при подавлении MEK/ERK-пути интенсивность сигнала заметно снижается (Рис 14А, Б). Таким образом, стареющие клетки не могут завершить цитопротективную аутофагию. Анализ количества и локализации p62/SQSTM1 не показывает его накопления и колокализации с LC3 (Рис 12). Вместе эти данные являются доказательством того, что стареющие клетки с подавленным MEK/ERK-путем характеризуются дефектной аутофагией, которая не элиминирует поврежденные митохондрии и не поддерживает жизнеспособность стареющих клеток. Чтобы выяснить, является ли активация AMPK токсичной для этих клеток, мы использовали AICAR, соединение, которое превращается в монофосфорилированный нуклеотид (ZMP) внутри клетки, таким образом, имитируя снижение АТФ и, следовательно, активируя синтез АТФ через повышение активности AMPK. Обработка стареющих ERas с помощью AICAR приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток более чем в 2 раза по сравнению с контролем, тогда как в контрольных клетках AICAR повышает жизнеспособность через 72 ч культивирования (Рис 12, МТТ). Эти данные показывают, что в то время как в контрольных клетках активность AMPK благоприятствует сохранению жизнеспособности, в стареющих клетках даже ранние стадии активации AMPK являются цитотоксическими.

Опухолевые клетки характеризуются такими признаками, как высокая пролиферативная активность и гликолиз, как преобладающий источник продукции АТФ (Hanahan and Weinberg, 2011). Наши данные показывают, что подавление MEK/ERK-пути в стареющих клетках не отменяет активность mTORC1. Известно, что mTORC1 участвует в регуляции гликолиза (Kohn et al,

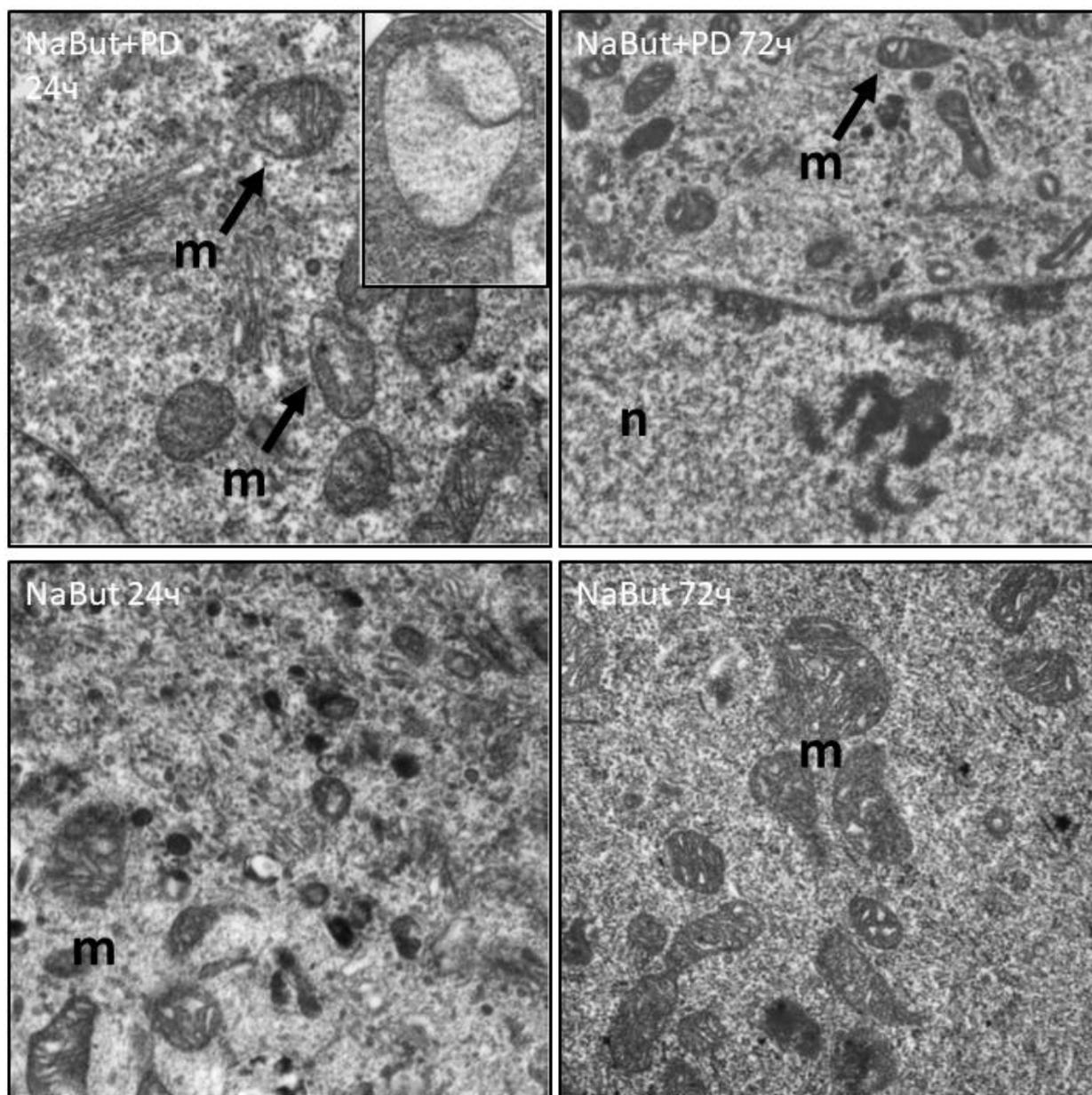


Рис 10. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих ERas приводит к повреждению митохондрий, однако через 72ч поврежденные митохондрии не деградированы. Трансмиссионная электронная микроскопия, обозначения: m, митохондрии; n, ядро.

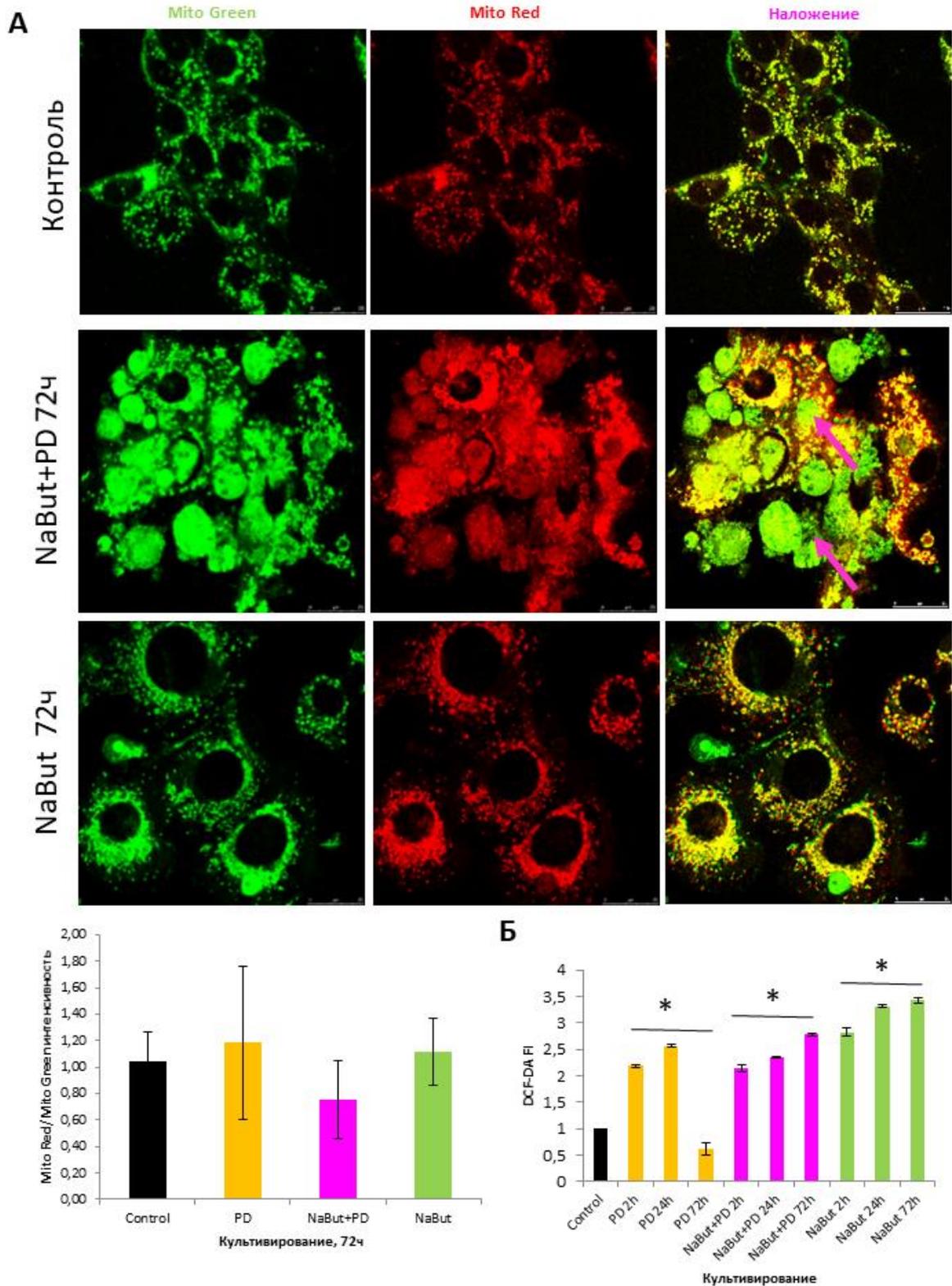


Рис 11. В стареющих клетках поврежденные митохондрии не удаляются, согласно данным окрашивания Mitotracker Red и Green, и в результате накапливаются активные формы кислорода. А. Визуализация митохондрий с помощью Mitotracker Green, Red (масштабная линейка 25 μm), розовые стрелки указывают на скопления поврежденных митохондрий, где выявляется только сигнал

потенциал-независимого Mito Green, гистограмма демонстрирует изменение отношения интенсивности Mito Red/Mito Green, измеренное с помощью программы ImageJ. Б. Изменение уровней активных форм кислорода в контрольных и стареющих клетках в ответ на ингибирование MEK/ERK-каскада. * $P \leq 0,05$.

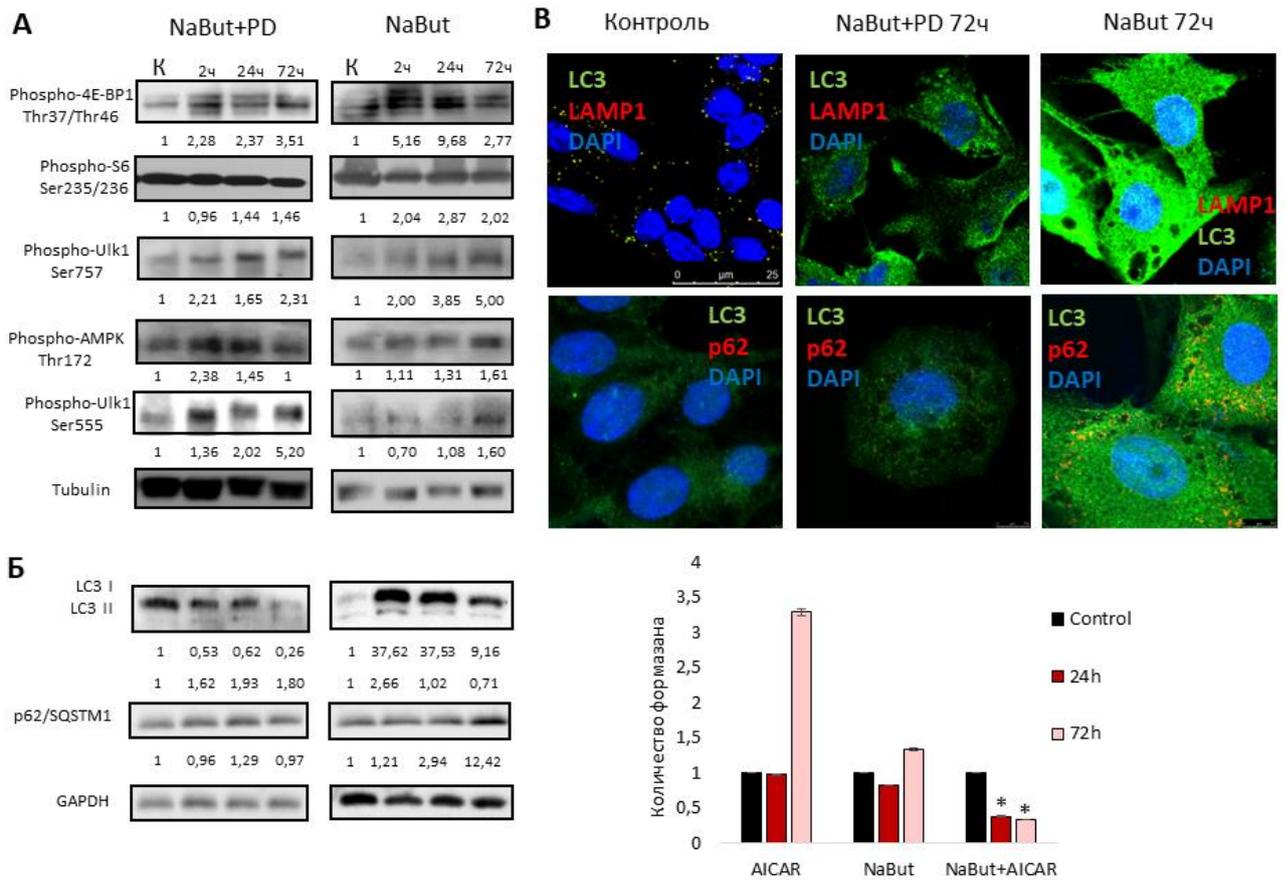


Рис 12. Аутофагия, индуцируемая при ингибировании MEK/ERK-пути в стареющих клетках, не завершается слиянием аутофагосом с лизосомами. А. Фосфорилирование регуляторов аутофагии AMPK, mTOR и их мишени Ulk1 при ингибировании MEK/ERK; Вестерн-блоттинг клеток Eras после 2, 24, 72ч культивирования с ингибиторами, цифры обозначают денситометрию бендов Вестерн-блоттинга. Б. Поведение маркеров аутофагии LC3 и p62/SQSTM1, Вестерн-блоттинг клеток Eras после 2, 24, 72ч культивирования с ингибиторами. В. ИФ с АТ к маркеру аутофагии LC3 и маркеру лизосом LAMP1, демонстрирующая активное слияние аутофагосом с лизосомами. Г. Жизнеспособность индуцированных к старению ERas при действии AMPK-миметика AICAR в течение 72ч культивирования. Жизнеспособность проанализировали с помощью МТТ-теста. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего

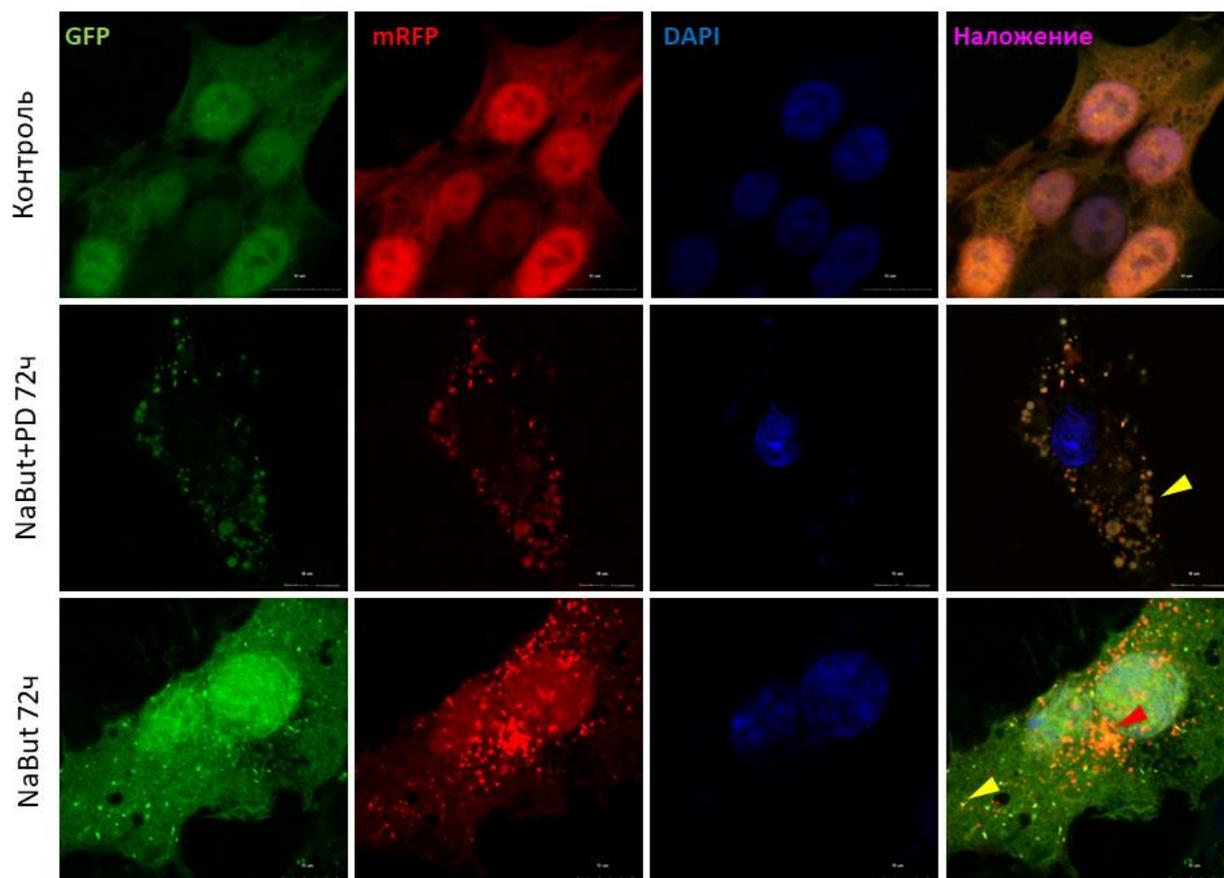


Рис 13. В стареющих ERas при ингибировании MEK/ERK-пути индуцируется аутофагия, которая, однако, не завершается слиянием аутофагосом с лизосомами. Клетки трансфицировали плазмидой GFP-mRFP-LC3. Клетки культивировали с ингибиторами, затем фиксировали и окрашивали ядра DAPI. Желтая стрелка: сформировавшиеся аутофагосомы (сигнал GFP-mRFP собирается в кламп), которые не слились с лизосомами. Красная стрелка: аутофагосомы, слившиеся с лизосомами. Масштабная линейка 10 μ m.

1996; Gottlob et al, 2001; Maiese et al, 2013). Когда митохондрии повреждены, клетки могут усилить активность гликолиза для поддержания жизнеспособности (Correia-Melo et al, 2016). Была проведена опосредованная оценка уровня гликолиза в клетках, обработанных PD0325901, путем измерения уровня лактата в культуральной среде. Согласно полученным данным, подавление MEK / ERK в стареющих клетках снижает выработку лактата, в то время как в старых клетках наблюдается гораздо более высокий уровень производства лактата (Рис 15). Аналогично, контрольные клетки, обработанные только PD0325901 в течение 72 ч, имеют более низкий уровень лактата по сравнению с исходными клетками. Предположительно, ингибирование MEK/ERK-пути снижает уровень лактата из-за участия MEK/ERK в регуляции нескольких гликолитических генов (Verschoor et al, 2010; Yang et al, 2012; Riwanto et al, 2016). Соответственно, стареющие клетки с подавленным MEK/ERK характеризуются самым низким уровнем лактата через 72 часа, что подтверждает, подавление гликолиза в этом случае. Таким образом, ингибирование гликолиза вместе с нарушением функции митохондрий способствует гибели стареющих клеток в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути. Стареющие клетки при ингибировании MEK/ERK гибнут путем апоптоза. Как показывает анализ ДНК-фрагментации в 2% -ном агарозном геле, подавление активности MEK/ERK в клетках, индуцированных к старению, приводит к появлению нуклеосомного повтора ДНК через 24 ч и 72 ч обработки (Рис 16). В пользу этого говорят и данные проточной цитометрии, демонстрирующие пред-G1 пик через 72ч ингибирования MEK-киназ в стареющих клетках (Рис 9Б). Надо отметить, что ингибирование MEK/ERK в интактных клетках также индуцирует апоптотическую гибель клеток через 72 часа, но около 50% клеток восстанавливают жизнеспособность, а позже восстанавливают пролиферацию. В старых клетках при ингибировании MEK/ERK-пути происходит активация каспазы-3 (Рис 16Б). Также была проанализирована активность каспазы 9 (через которую осуществляется запуск каскада расщепления каспаз в ходе митохондриального апоптоза) и каспазы 8

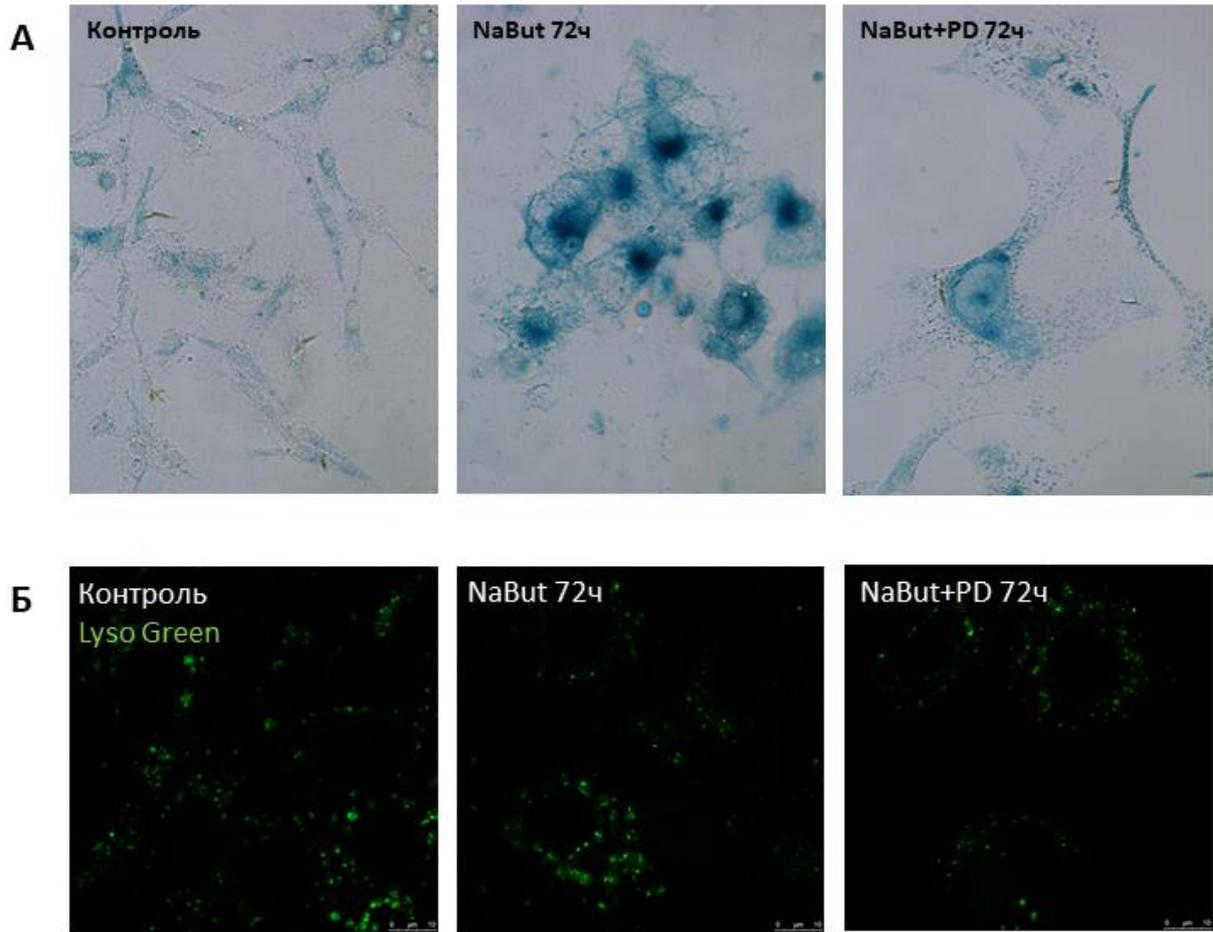


Рис 14. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках вызывает снижение активности лизосом по сравнению со стареющими клетками, сохраняющими активность MEK/ERK-пути. А. активность лизосомальной β -галактозидазы, pH 4.0. Б. Визуализация лизосом с помощью *in vivo* красителя Lyso Tracker Green.

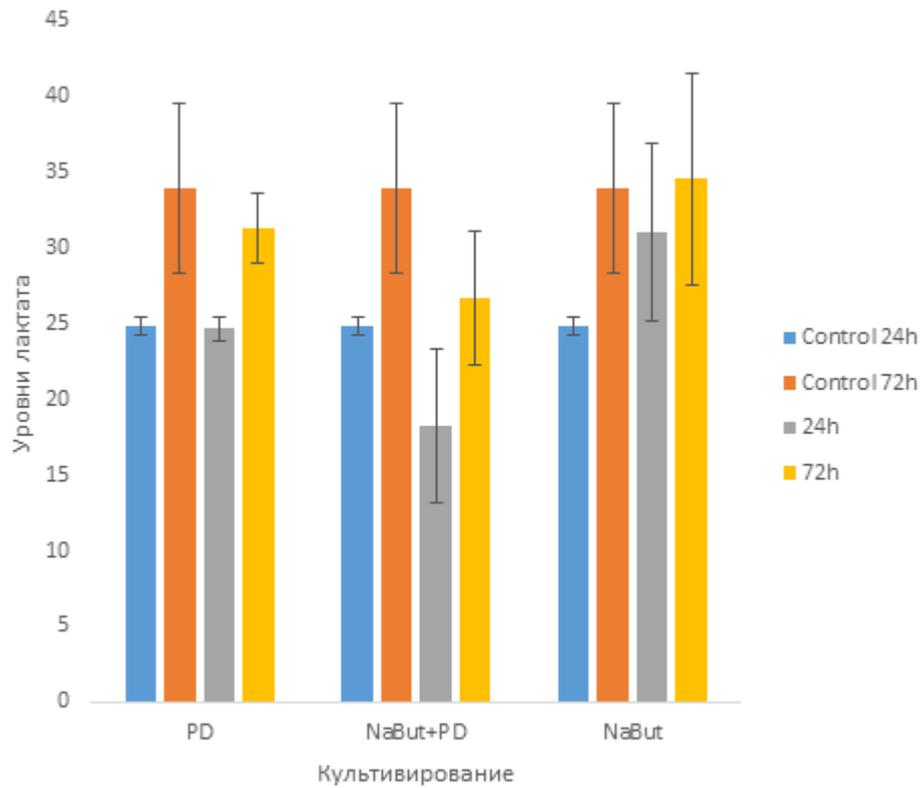


Рис 15. Изменение уровня лактата в культуральной среде после 72ч ингибирования MEK/ERK-пути в контрольных и стареющих клетках.

(отвечающей за развитие программы апоптоза от рецепторов смерти. Интересно отметить, что в старых клетках при ингибировании MEK/ERK наблюдается активация обеих каспаз, причем активность каспазы 8 увеличивается более достоверно, чем каспазы 9 (Рис 16Б).

Старые клетки, возникшие после действия ДНК-повреждающих и противоопухолевых агентов характеризуются устойчивостью к апоптозу (Marcott et al, 2004; Sanders et al, 2013; Childs et al, 2014). Для выяснения устойчивости старых клетках, полученных обработкой NaBut в течение 72 и 120 ч к действию MEK/ERK-пути, анализировали их жизнеспособность. Согласно данным МТТ, состаренные с помощью NaBut клетки, в которых был ингибирован MEK/ERK-путь, претерпевают падение жизнеспособности в два раза (Рис 17).

Поскольку активность mTORC1 в старых клетках при ингибировании MEK/ERK, сохраняется на высоком уровне, была проанализирована экспрессия маркеров старения. Анализ SA- β -Gal активности показал, что ингибирование MEK/ERK-пути снижает интенсивность окраски (согласно данным изображений, полученных на микроскопе Pascal) и количество SA- β -Gal, согласно данным колориметрического измерения (Рис 18 А). Также уменьшается размер таких клеток по сравнению со старыми клетками, в которых MEK/ERK активен, кроме того, наблюдается снижение количества белка (Рис 18Б). Но показатели всех исследованных маркеров превышают показатели контрольных необработанных клеток, то есть маркеры не элиминированы полностью, а ослаблены. Наряду с аутофагией, деградацию белков в клетке осуществляет убиквитин-протеасомная система (УПС), а работа каждой из систем направлена на определенные мишени и находится в балансе, поддерживая гомеостаз клетки (Lilienbaum, 2013). Важно отметить, что комплекс mTORC1 также вовлечен в контроль активности этой системы, играя роль негативного регулятора (Rosseau and Bertolotti, 2016; Chantranupong and Sabatini, 2016; Zhao and Goldberg, 2016). Была проанализирована активность компонентов убиквитин-протеасомной системы в контрольных и старых клетках при ингибировании MEK/ERK-пути. В старых клетках наблюдается небольшое снижение активности компонентов

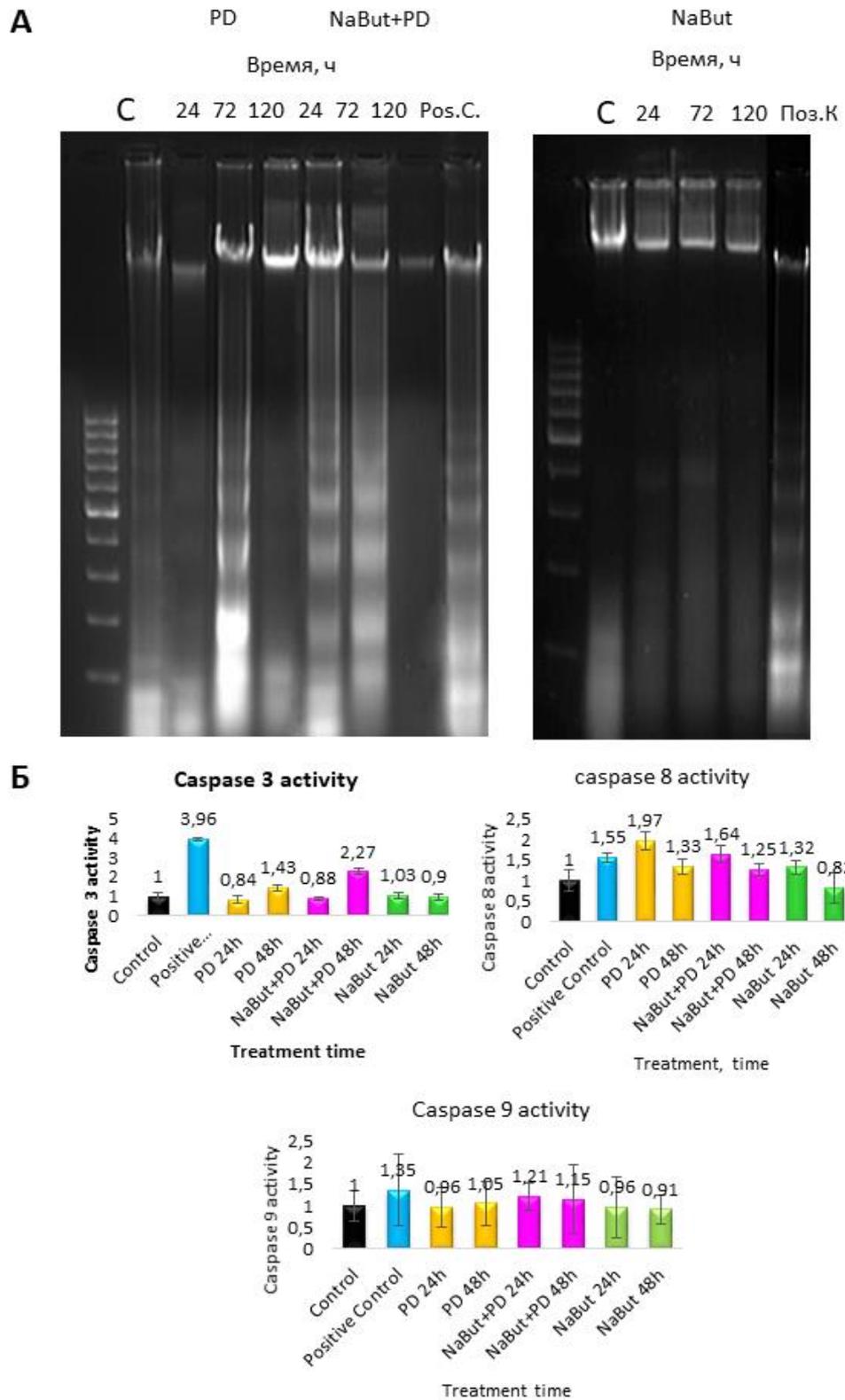


Рис 15. Стареющие клетки претерпевают апоптоз при ингибировании MEK/ERK-пути. А. Электрофорез ДНК в агарозном геле. Б. Активности каспаз 3, 8 и 9. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего.

протеасомной системы ввиду высокой активности mTOR (Рис 18). Однако при ингибировании MEK/ERK активность протеасомной системы падает более чем в 10 раз. Это позволяет заключить, что при ингибировании MEK/ERK-пути работа этой системы также нарушается и не может компенсировать дефектность аутофагии.

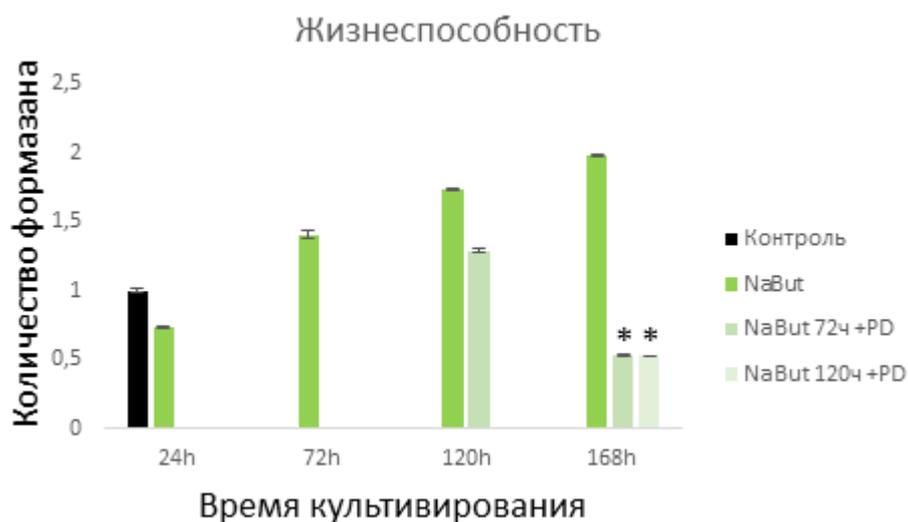


Рис 17. Клетки, которые развили старение в результате культивирования с NaBut в течение 72ч и 120ч, претерпевают гибель в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути. Клетки культивировали в присутствии бутирата натрия. Через 72ч и 120ч ингибировали MEK/ERK-путь с помощью PD0325901, и через 48ч анализировали жизнеспособность методом МТТ-теста. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего.

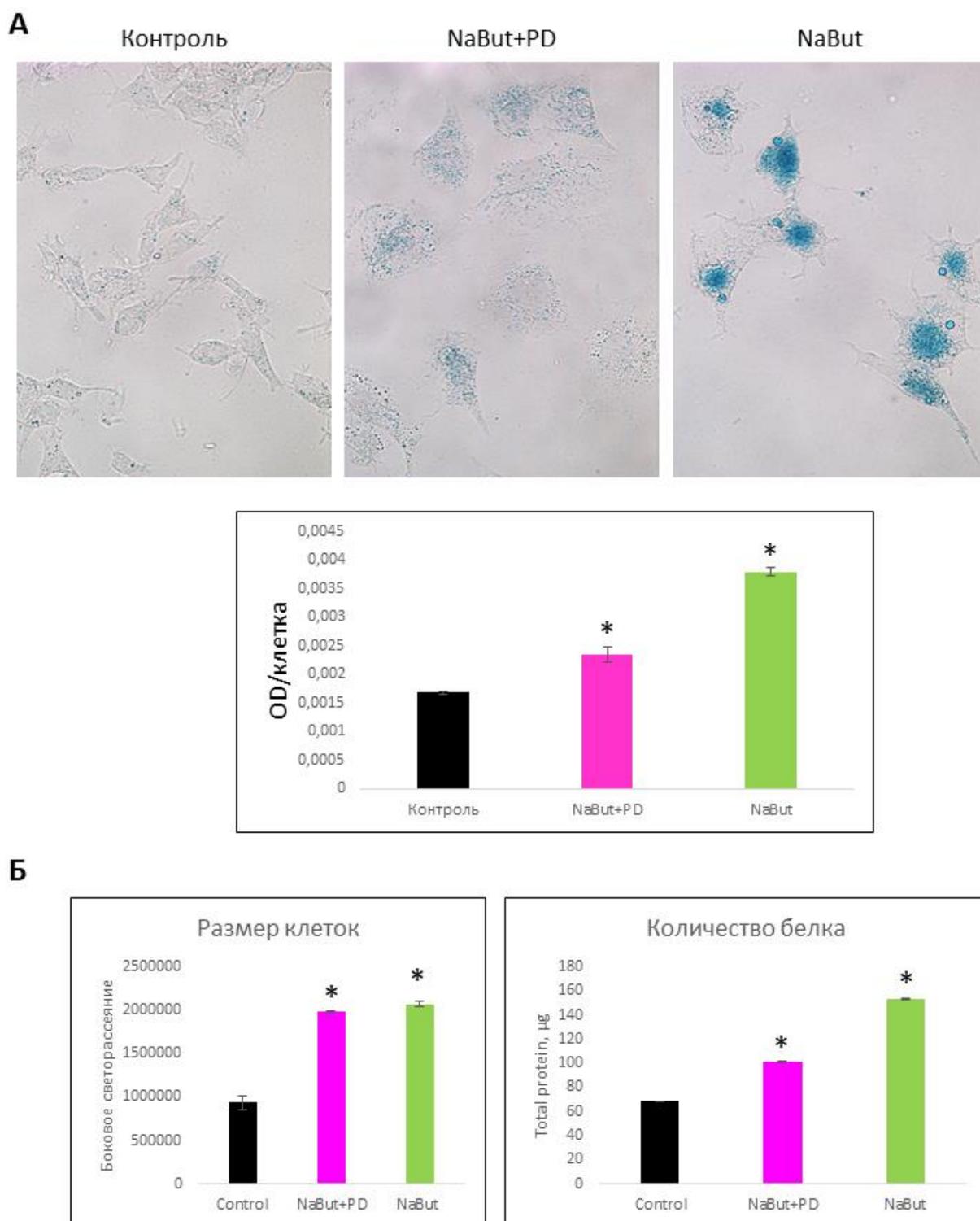


Рис 18. Индуцируемая при подавлении MEK/ERK-пути аутофагия не способна полностью элиминировать маркеры старения. А. Ассоциированная со старением β -галактозидазная активность, ув 40х. Гистограмма показывает интенсивность β -галактозидазной активности клеток, оцененную по поглощению при длине волны 572 нм. Б. Уровень белка и размер клеток после 72ч ингибирования MEK/ERK-пути. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$.

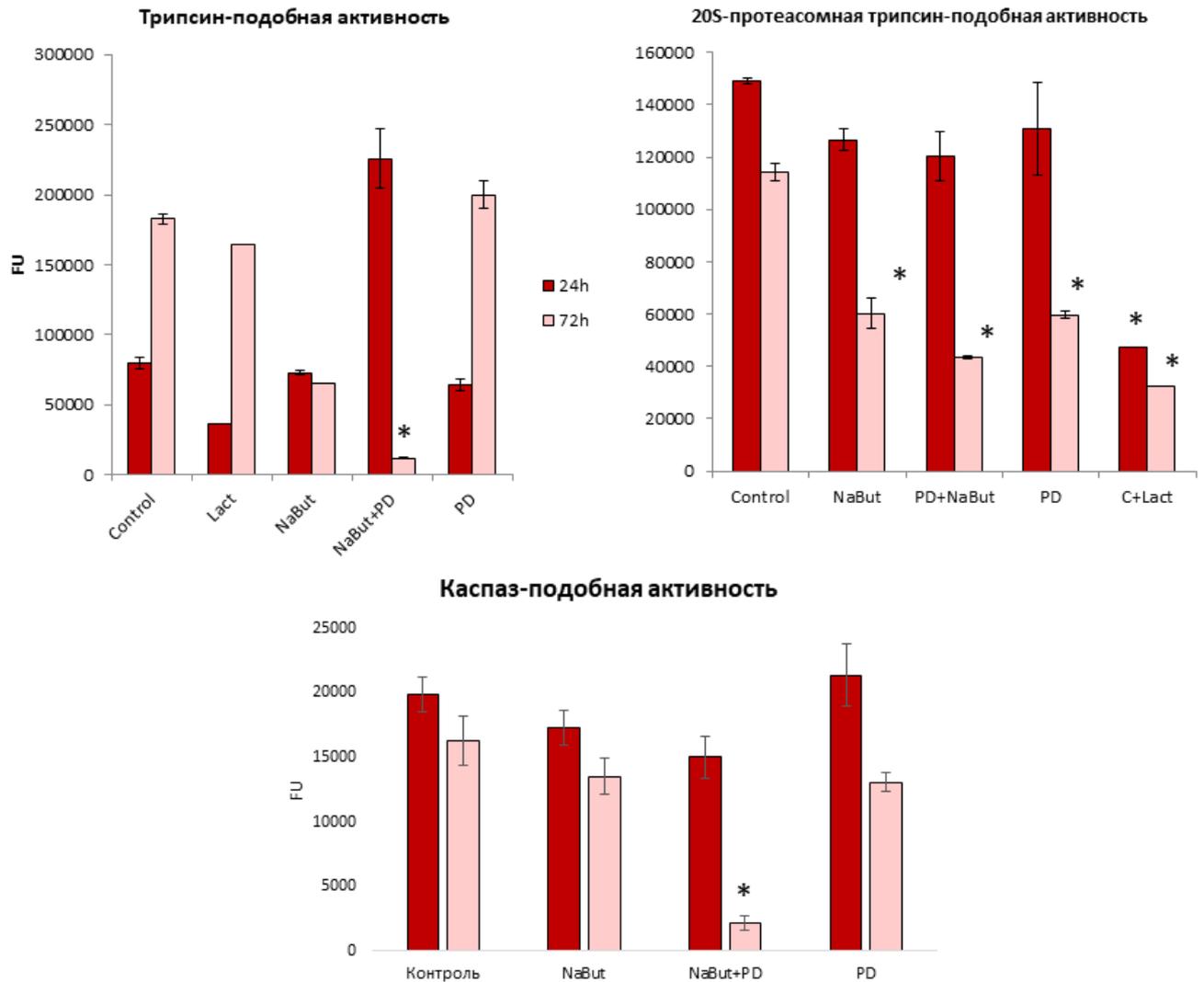


Рис 19. Ингибирование MEK/ERK-пути приводит к снижению активности протеасомной системы. Клетки Eras культивировали с ингибиторами указанное время, затем анализировали активность убиквитин-протеасомной системы с помощью флуорогенных субстратов. Лактацистин (Lact) использован в качестве позитивного контроля для 20S-протеасомной активности. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$

4.2. Нарушение терминации аутофагии в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK-пути связано с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом в цитоплазме

Нами было показано, что одним из проявлений дефектности аутофагии, активирующейся в старых клетках, является отсутствие слияния аутофагосом с лизосомами (Рис 11). Это связано с тем, что в старых клетках развивается определенный фенотип: лизосомы локализуются вместе с mTORC1 в перинуклеарной зоне в так называемых TASC-компартаментах (TOR-autophagy spatial coupling compartment), вовлеченных в создание гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа, в то время как аутофагосомы формируются по периферии цитоплазмы (Narita et al, Carroll et al). Это приводит к низкой частоте слияния аутофагосом с лизосомами.

Чтобы выяснить, претерпевают ли клетки, развившие старение при действии NaBut, описанную компарментализацию (Narita et al, 2011; Carroll et al, 2017) был проведен иммунофлуоресцентный анализ локализации лизосом и аутофагосом с антителами к LAMP1 и mTOR. В старых клетках лизосомы выявлены в перинуклеарном районе, частично колокализованные с mTOR (Рис 19), и при ингибировании MEK/ERK-пути их локализация не меняется. При ингибировании MEK/ERK в контрольных клетках кластеры сигнала LAMP1 выявляются по всей цитоплазме, где аутофагосомы активно сливаются с лизосомами в ходе цитопротективной аутофагии. Таким образом, в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK аутофагосомы не могут эффективно сливаться с лизосомами, аутофагический процесс не завершается и не происходит уничтожения поврежденных митохондрий, и как мы показали, этот процесс завершается апоптозом (Рис 16).

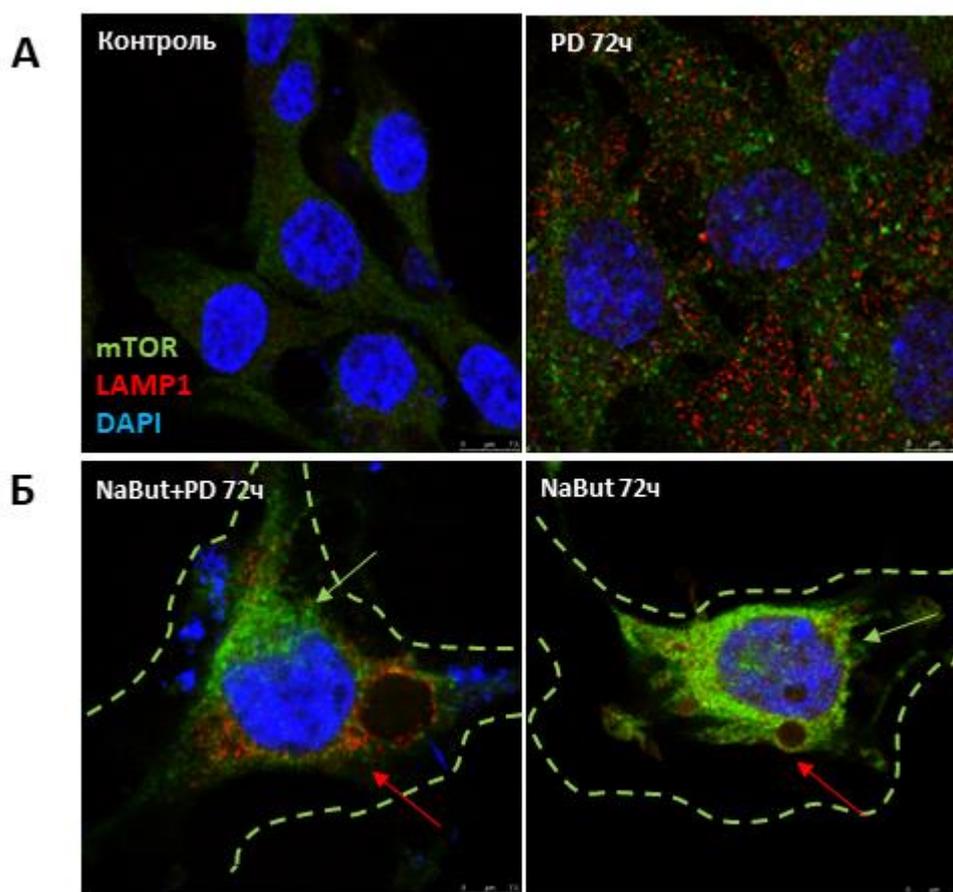


Рис 19. В стареющих клетках лизосомы располагаются вокруг ядра вместе с mTOR, и ингибирование MEK/ERK не приводит к изменению их локализации, в отличие от ингибирования MEK/ERK в контрольных клетках. ИФ с АТ к mTOR и маркеру лизосом LAMP1. Зеленая стрелка показывает mTOR, красная – лизосомы. Зеленый пунктир обозначает границы клеток. Масштабная линейка 25 μм.

4.3. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках приводит к релокализации онкогенного Ras с цитоплазматической мембраны в цитозоль, что может блокировать его анти-апоптотические функции

В Ras-экспрессирующих опухолевых клетках важным регулятором аутофагии является сам онкогенный Ras, который негативно контролирует апоптоз (Lin et al, 1995; Sun et al, 2015). Ras, кроме Raf/MEK/ERK-пути, имеет много других мишеней, в том числе сигнальные пути PI3K и JNK, участвующие в контроле аутофагии. Но в стареющих клетках аутофагический ответ на ингибитор MEK-киназ не развился, в связи с чем было высказано предположение, что в этих клетках был затронут и сам Ras. В связи с этим были проанализированы количество и локализация Ras белка. ИФ-анализ показал, что в старых клетках при ингибировании MEK/ERK Ras меняет локализацию – он уходит с подмембранного пространства в цитозоль и выявляется в аутофагосомах, согласно данным по колокализации с LC3 (Рис 20). Ras – это мембран-связанный белок, содержание и локализация которого могут менять апоптотический и аутофагический ответы клетки, а также расположение в мембране необходимо для его правильного функционирования и взаимодействия с мишенями (Prior and Hancock, 2012). Захват Ras аутофагосомами в цитозоли негативно сказывается на его регуляторных функциях, включая в первую очередь апоптоз, который он перестает супрессировать.

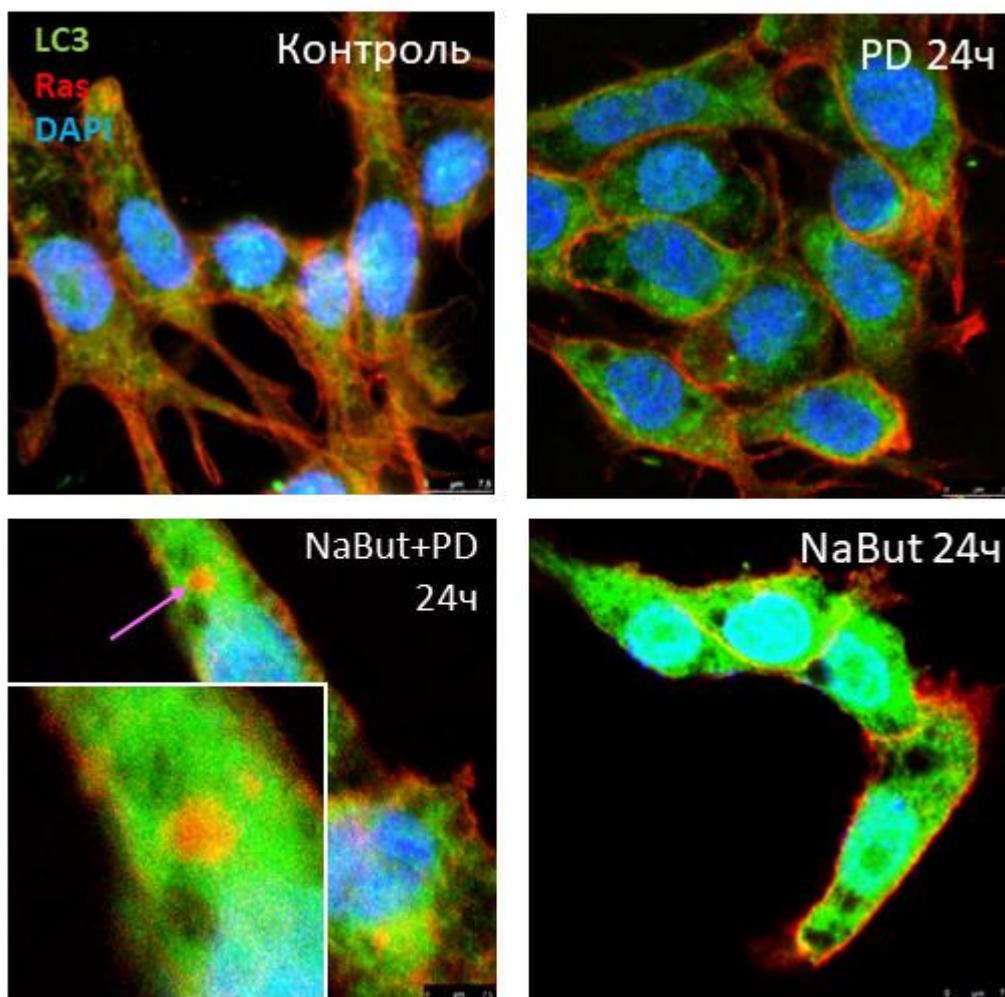


Рис 20. Ингибирование MEK/ERK-пути в стареющих клетках приводит к релокализации онкогенного Ras с мембраны в цитозоль, где он колокализуется с маркером аутофагосом LC3. Розовая стрелка показывает Ras, выявленный в цитозоле. Масштабная линейка 25 μm .

4.5 Комбинация индуктора старения и ингибитора MEK/ERK снижает жизнеспособность Bcl2-оверэкспрессирующих клеток

Полученные нами данные подтверждают имеющиеся в литературе о том, что жизнеспособность Ras-экспрессирующих клеток зависит от целостности митохондрий. Стареющие клетки претерпевают гибель, поскольку не могут элиминировать поврежденные митохондрии. В связи с этим была исследована возможность индукции гибели клеток ERas, оверэкспрессирующих ген Bcl2 человека, устойчивые к апоптозу.

Ингибирование MEK/ERK в контрольных клетках ведет к снижению жизнеспособности через 24ч эксперимента, однако через 72 и 120ч жизнеспособность восстанавливается. В том случае, когда MEK/ERK-путь ингибировали в бутират-индуцированных клетках, наблюдается снижение жизнеспособности и клоногенной выживаемости клеток (Рис 21). Несмотря на оверэкспрессию Bcl2, в клетках ERas-Bcl2 при ингибировании MEK/ERK-пути происходит повреждение митохондрий, согласно данным окрашивания митохондрий Митотрекерами Green и Orange (Рис 22). Через 72ч культивирования жизнеспособность ERas-Bcl2 падает в два раза, что составляет не такую сильную разницу с контролем, как у исходных ERas. Тем не менее, эта комбинация ингибиторов способна вызвать гибель в Bcl2-оверэкспрессирующих клеток.

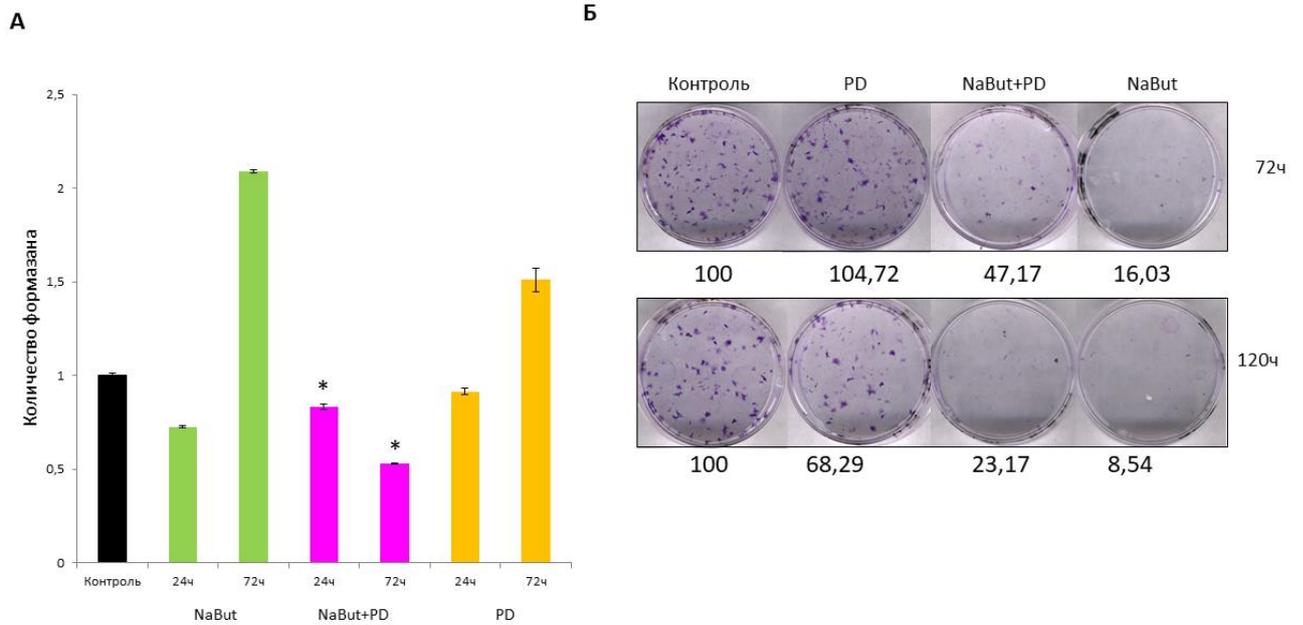


Рис 21. Совместное действие индуктора старения NaBut и ингибитора MEK/ERK снижает жизнеспособность (А, МТТ, указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего) и клоногенную выживаемость (Б) клеток Erag-Bcl2. * $P \leq 0,05$

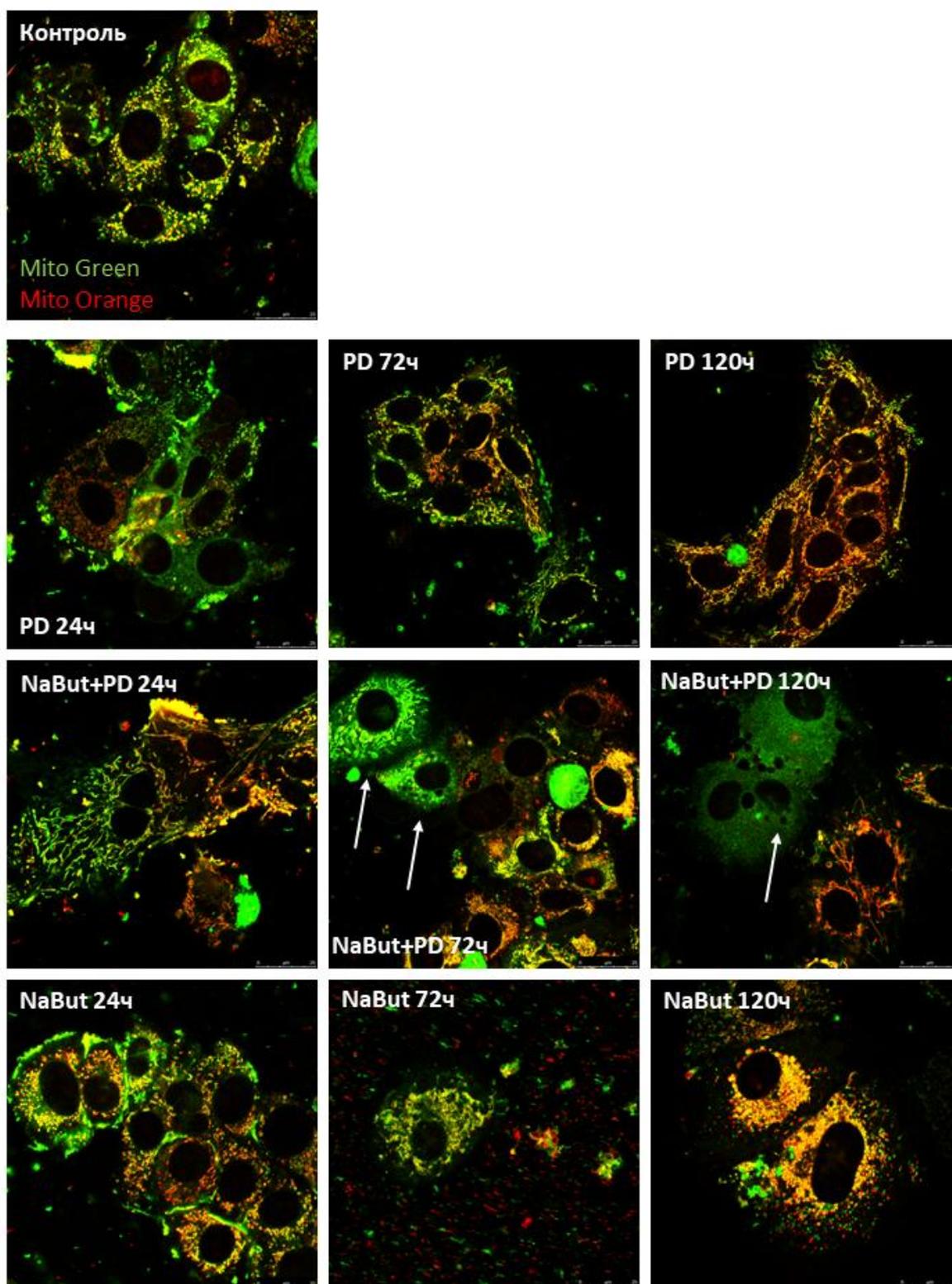


Рис 22. Ингибирование MEK-киназ приводит к повреждению митохондрий в клетках Eras-Bcl2. Митохондрии визуализированы с помощью Mitotracker Green и Orange. Белые стрелки показывают клетки, в которых наблюдается гашение сигнала потенциал-зависимого Mito Orange, что говорит о повреждении митохондрий. Масштабная линейка 25 μm .

4.6. Подавление активности mTORC1 не приводит к восстановлению AMPK-зависимой аутофагии и жизнеспособности стареющих клеток при ингибировании MEK/ERK-пути

Полученные нами данные говорят о том, что митохондрии играют важную роль в поддержании жизнеспособности Ras-экспрессирующих клеток, что совпадает с имеющимися в литературе данными. В ряде работ показано, что повреждение митохондрий влияет на биогенез и активность лизосом (Fernández-Mosquera et al, 2017; Demers-Lamarche et al, 2016). В частности, острое повреждение митохондрий приводит к выраженному усилению биогенеза лизосом через короткий промежуток времени (Fernández-Mosquera et al, 2017). Биогенез лизосом является одним из процессов, регуляция которого также связана с mTOR (Settembre et al, 2012), который в составе mTORC1 локализуется на мембране лизосом. Нами было показано, что и в контрольных, и в стареющих клетках при ингибировании MEK/ERK mTORC1 остается активным. Для выяснения его роли в регуляции аутофагии и жизнеспособности старых клеток в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути активность mTOR подавляли с помощью специфического киназного ингибитора pp242 в концентрации 200 нМ, который снижает уровень фосфорилирования 4E-BP1 и частично понижает жизнеспособность клеток через 24ч культивирования (Рис 23А,Б), однако данная концентрация не способна полностью подавить развитие фенотипа старения, согласно данным об интенсивности SA-β-галактозидазной активности, изменении размера клеток и восстановлении пролиферации (Рис 24).

Согласно данным МТТ и regrowth, ингибирование mTORC1 не приводит к восстановлению жизнеспособности и пролиферации клеток, и они претерпевают апоптоз (Рис 23В,Г,Д). Более того, ингибирование mTORC1 в старых клетках приводит к повреждению митохондрий, так как уже через 24ч можно видеть гашение сигнала Mitotracker Orange в части клеток, что свидетельствует о потере митохондриями их потенциала. (Рис 25). В это же время при ингибировании

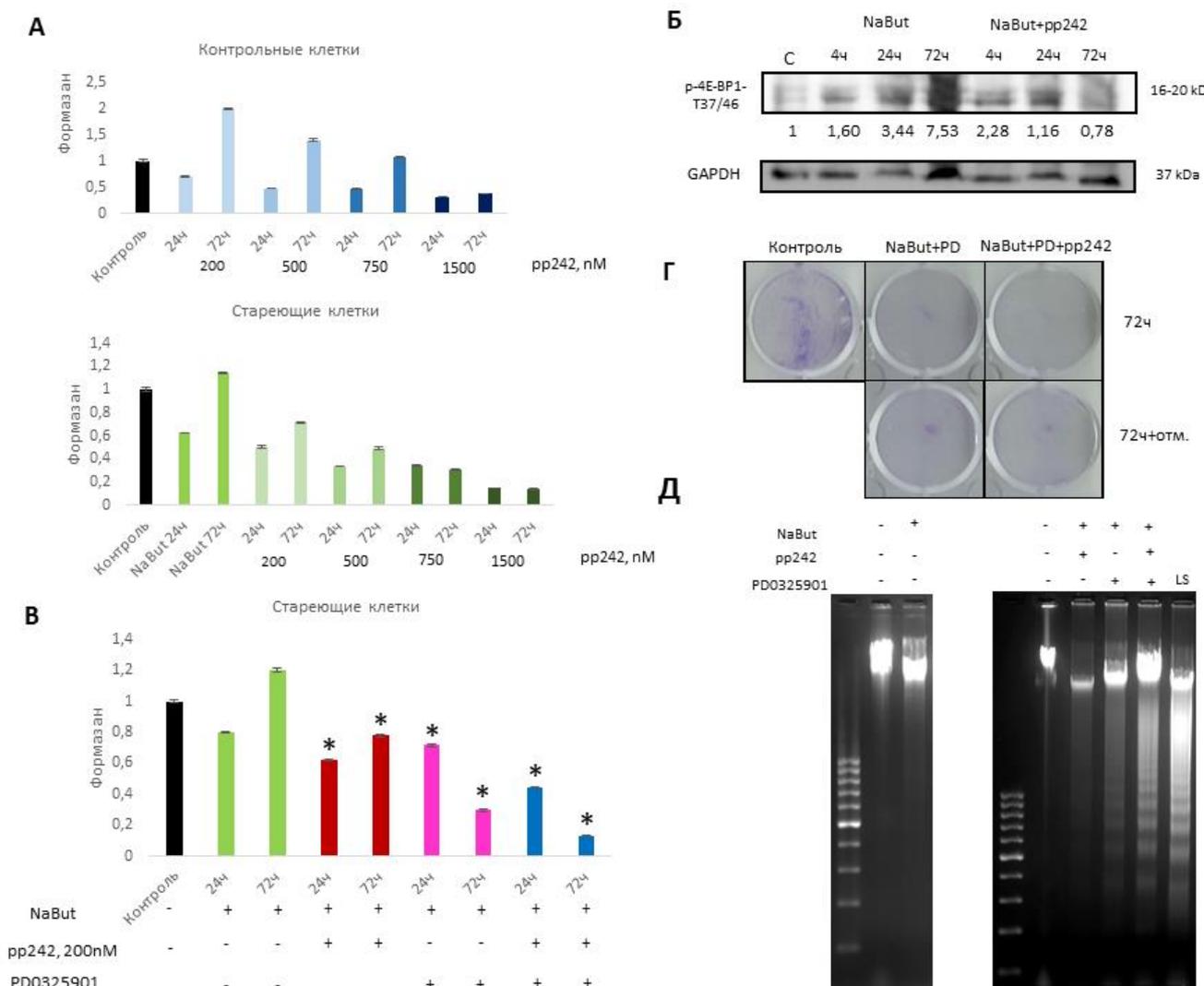


Рис 23. Ингибирование mTORC1 не спасает стареющие клетки Erag от апоптотической гибели при подавлении MEK/ERK-пути. А. Изменение жизнеспособности контрольных и стареющих Erag при действии разных концентраций pp242 (200, 500, 750, 1500 нМ), МТТ-тест. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. Б. Фосфорилирование 4E-BP1 в клетках, культивируемых с NaBut и NaBut+pp242. Цифры означают денситометрию бендов Вестерн-блоттинга. В. Жизнеспособность стареющих клеток, подвергнутых ингибированию mTOR и MEK/ERK. Г. Ингибирование mTORC1 не приводит к восстановлению пролиферации стареющих клеток, подвергнутых действию MEK/ERK-ингибитора. Клетки культивировали в течение 72ч и затем заменили среду на не содержащую ингибиторы. Окрашивание Кристалл-Виолетом. Д. нуклеосомная фрагментация ДНК в стареющих клетках при ингибировании mTORC1 и MEK/ERK. ДНК-форез в 1,5% агарозном геле.

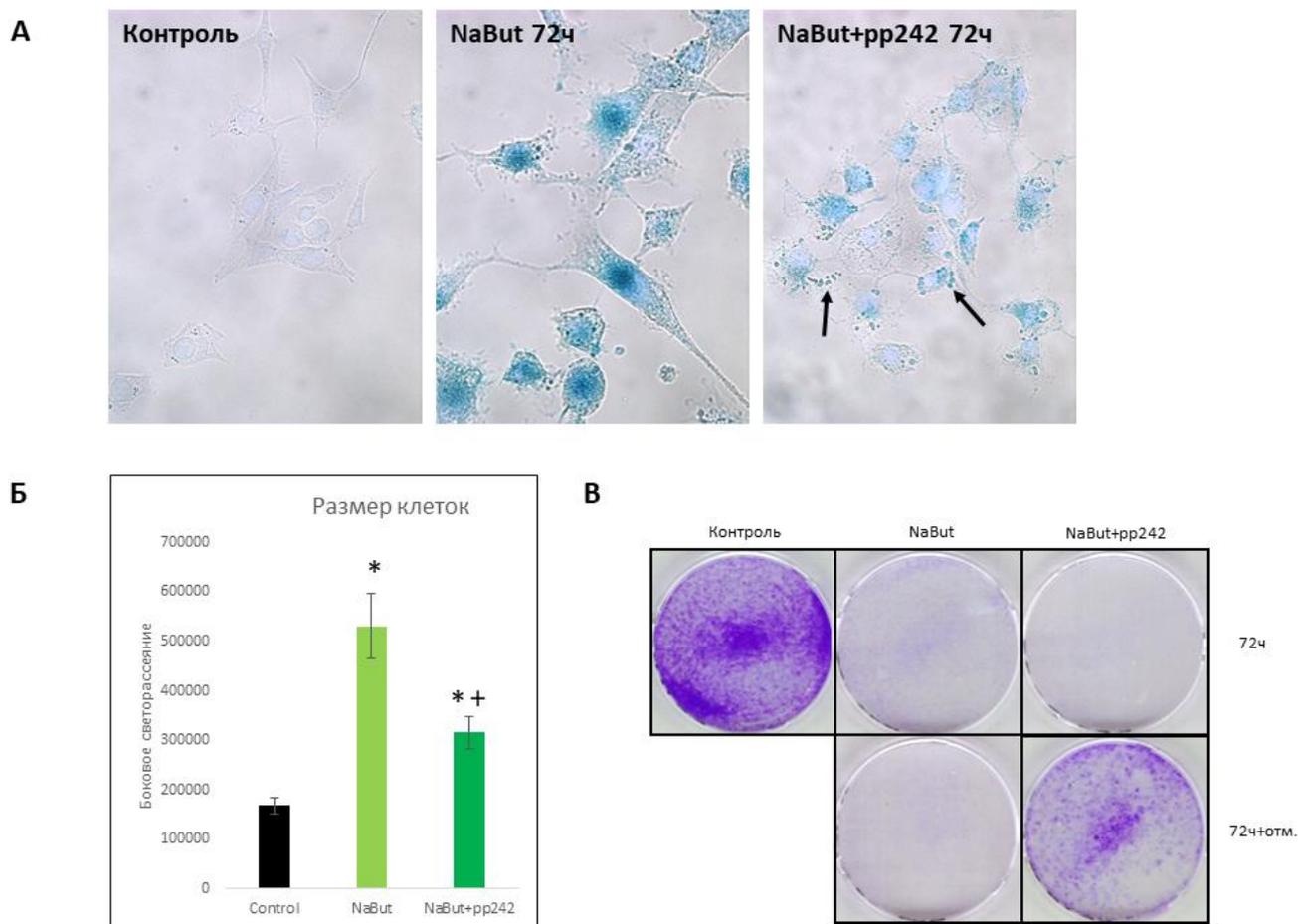


Рис 24. 200нМ pp242 частично, но не полностью, подавляют программу NaBut-индуцированного старения клеток. А. SA-β-галактозидазная активность. 40х увеличение. Б. Боковое светорассеяние, показывающее изменение размера клеток после 72ч культивирования с NaBut и pp242; Указаны средние значения по трем повторам ± ошибка среднего. * $P \leq 0,05$; + достоверность различия между средним значением светорассеяния в клетках после действия одного NaBut и NaBut+pp242, $P \leq 0,05$. В. Восстановление пролиферации клеток после 72ч ингибирования mTOR с помощью 200 нМ pp242. Окрашивание Кристал-Виолетом.

mTORC1 в старых клетках происходит увеличение числа лизосом, как следует из данных, полученных с помощью *in vivo* красителя LysoTracker Green, продемонстрировавшего усиление интенсивности сигнала через 24 и 72ч эксперимента (Рис 25).

Уже через 4ч ингибирования mTORC1 в клетках индуцируется аутофагия, как следует из данных по конверсии LC3 из цитоплазматической формы I в мембран-ассоциированную, связанную с аутофагосомами форму LC3II. Однако через 24ч форма LC3II уже не выявляется, что говорит либо о подавлении либо о нарушении процесса аутофагии (Рис 26А). Однако в это же время в клетках начинают выявляться крупные вакуоли, напоминающие пищеварительные вакуоли дрожжей (Baba et al, 1994), в которых к 72ч скапливаются LAMP1-позитивный материал (Рис 27). Этот результат подтверждается данными морфологического окрашивания по Май-Грюнвальду, демонстрирующими крупные кластеры кислого содержимого в цитоплазме клеток. Кроме того, сигнал LAMP1 в виде шаровидных скоплений через 72ч можно видеть за пределами клетки, что говорит о выведении лизосомального материала из клеток. Тем не менее, согласно данным ИФ-анализа, LC3 в вакуолях не выявляется. Это подтверждается данными, полученными на клетках ERas-ptfLC3. При подавлении mTOR в старых ERas-ptfLC3 ни GFP, ни mRFP не агрегирует (Рис 26Б). О том, что аутофагический процесс в клетках нарушен, говорят и данные ИФ с АТ к p62/SQSTM1 – сигнал которого также выявляется в вакуолях (Рис 27). Также через 72ч можно видеть скопление сигнала LysoGreen в кластеры, что подтверждает данные ИФ анализа с антителами к LAMP1.

Вместе с лизосомами в полостях изолируются и поврежденные митохондрии, как следует из результатов окрашивания MitoGreen и MitoOrange, а также ИФ-анализа с антителами к LAMP1 и маркеру митохондрий TOM20 (белок наружной мембраны митохондрий). При ингибировании mTORC1 наблюдается накопление крупных кластеров TOM20, колокализующихся с LAMP1, что свидетельствует о накоплении лизосом в крупных полостях вместе с митохондриями (Рис 28А). При этом сигнал TOM20 наблюдается и вне полостей в

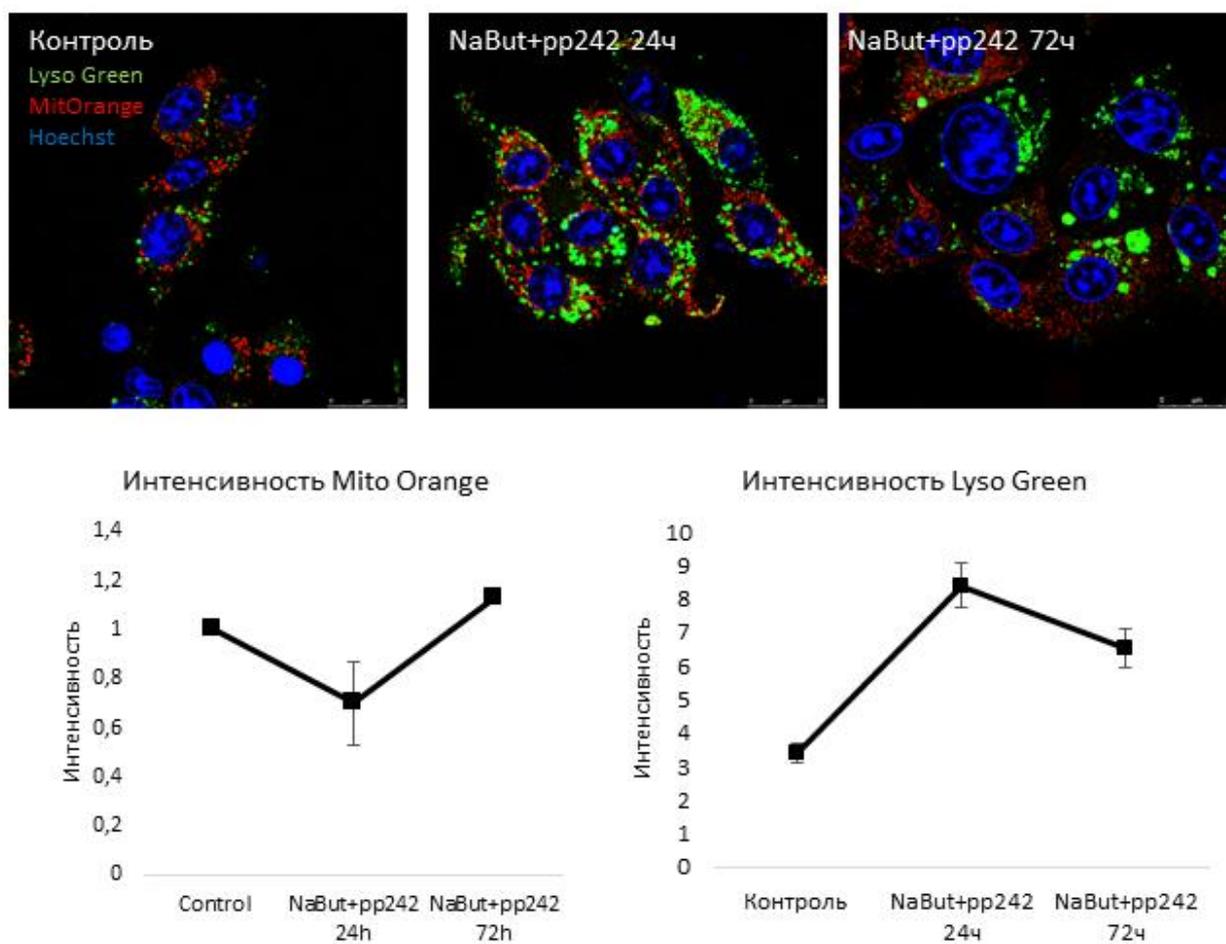


Рис 25. Ингибирование mTORC1 в стареющих клетках приводит к повреждению митохондрий и увеличению числа лизосом. Митохондрии окрашены с помощью Mitotracker Orange, лизосомы окрашены с помощью LysoTracker Green; графики показывают изменение интенсивностей красителей, измеренное в программе ImageJ, указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. Масштабная линейка 25 μ m.

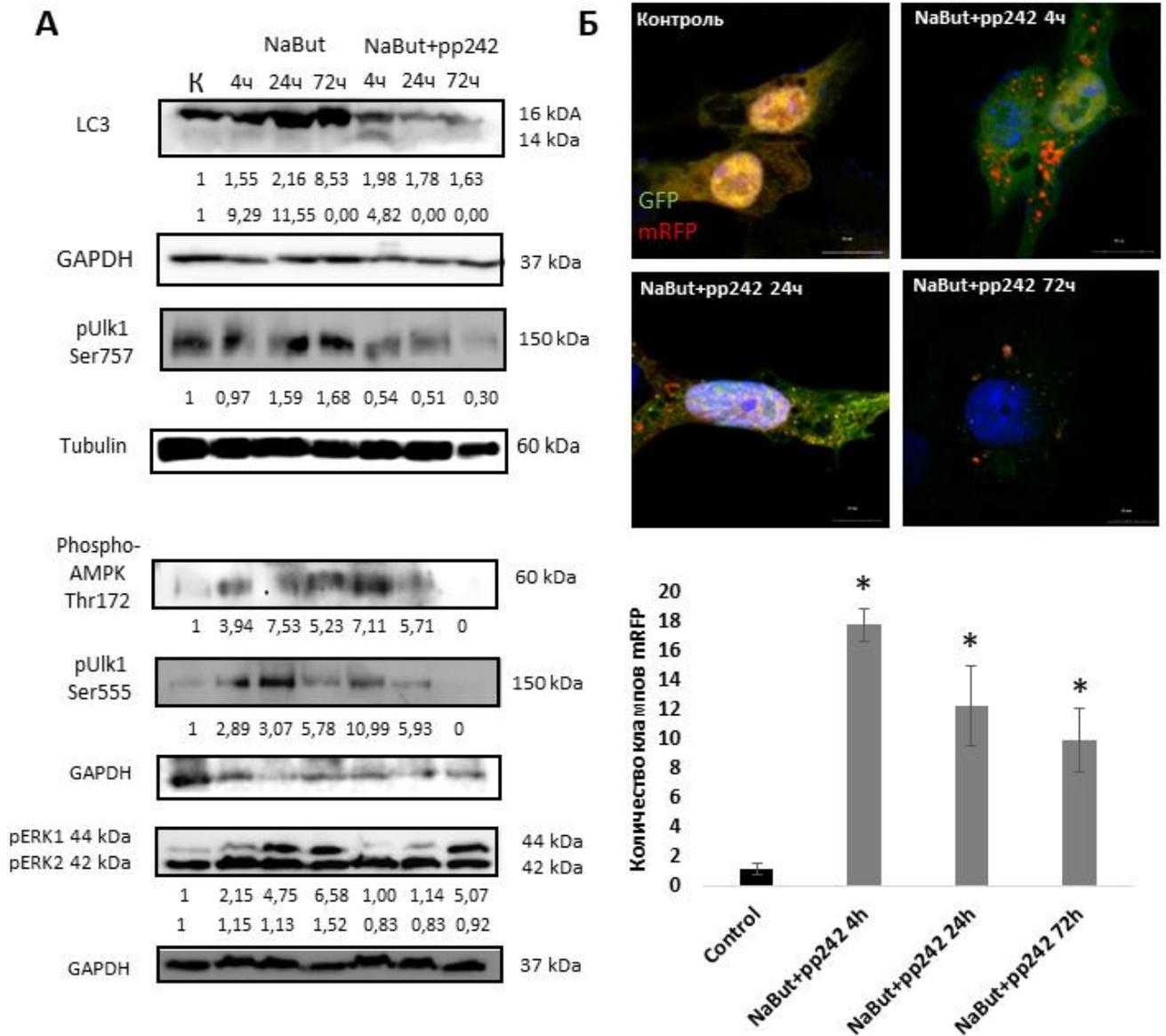


Рис 26. Ингибирование mTORC1 в старых клетках индуцирует аутофагию через 4ч, однако через 24ч она прерывается. А. Изменение фосфорилирования 4E-BP1 и конверсия LC3 I в II. Вестерн-блоттинг. Б. Клетки, трансфицированные плазмидой GFP-mRFP-LC3, подвергали индукции старения и ингибированию MEK/ERK-пути. Ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 10 μ m. Гистограмма отображает среднее число фокусов mRFP на клетку через 4, 24, 72ч ингибирования mTORC1. Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$.

цитозоли, а Mitotracker Green и Orange показывают, что митохондрии в цитозоли не повреждены, поскольку они связывают оба красителя (Рис 28А). Эти данные подтверждаются данными ТЭМ, демонстрирующими поврежденные митохондрии в стареющих клетках, которые были подвергнуты ингибированию mTOR в течение 72ч (Рис 28В-Ж). на ТЭМ-изображениях можно видеть вакуоли, наполненные мембранными структурами – разрушенными митохондриями, а также лизосомами (Рис 28Г,Д). Также на ТЭМ-изображениях можно видеть, как скопление разрушенных митохондрий выводится за пределы клеток (Рис 28Е,Ж). Повреждение митохондрий в клетках сопровождается повышением уровня АФК, однако через 72ч культивирования уровень АФК в клетках снижается (рис 28З).

Чтобы выяснить, изолируется ли в вакуолях вместе с лизосомами локализованный на их мембранах mTOR, была проведена ИФ с антителами к mTOR и LAMP1. На ИФ-картинах, полученных с помощью конфокальной микроскопии в вакуолях можно видеть сигнал mTOR, колокализированный с LAMP1 (желтый цвет), который формирует шаровидные скопления. Одновременно в них попадает ключевой ингибитор mTORC1 белок TSC2 (Рис. 29А). В старых клетках, кроме лизосом, перинуклеарно выявляется фосфорилированный TSC2, однако картин колокализации TSC2 с лизосомами нет (Рис. 29Б). Это может быть одной из причин конститутивной активности перинуклеарно расположенного на лизосомах mTOR. Поскольку mTOR, перемещенный вместе с лизосомами в вакуоли, вскоре обнаруживается за пределами клеток, и его общее количество, как следует из данных Вестерн-блоттинга, к 72 ч уменьшается (Рис. 29В), это может приводить к снижению активности mTORC1.

Для реализации пути спасения, связанного с изоляцией поврежденных митохондрий в вакуоли, клеткам необходим активный MEK/ERK-путь. При ингибировании MEK/ERK в клетках не наблюдается каверн с лизосомами, которые можно наблюдать при действии pp242 в старых клетках с активным MEK/ERK-путем. ИФ анализ с антителами к TOM20 показал, что в данном случае митохондрии в каверны не изолируются (Рис 30). Это подтверждается данными

ТЭМ, демонстрирующими поврежденные митохондрии, распределенные по цитоплазме клеток. В результате клетки не могут элиминировать поврежденные митохондрии и восстановить жизнеспособность, как следует из данных МТТ и regrowth (Рис 30). Таким образом, можно заключить, что MEK/ERK-путь необходим стареющим клеткам для реализации пути спасения, связанного с изоляцией поврежденных органелл и избыточных белков в специальных полостях для компенсации, дефектной аутофагии. Следовательно, старым клеткам необходим активный MEK/ERK-путь для поддержания жизнеспособности, возможно, и аутофагии. В ERas-трансформантах конститутивная активность ERK1,2 киназ обеспечивает постоянную работу транскрипционных факторов, контролирующих гены раннего ответа. Согласно полученным нами ИФ данным, в клетках ERas через 72ч культивирования с индуктором старения часть фосфорилированных ERK1,2 выявляются в цитоплазме (Рис 31). Кроме того, в клетках через 72ч обработки NaBut фосфо-ERK1,2 колокализуются с LC3 вблизи ядра. Это позволяет предполагать, что в клетках ERas, претерпевающих NaBut-индуцированное старение, определенную роль играет цитоплазматическая часть ERK1,2-киназ, в частности, взаимодействующая с митохондриями.

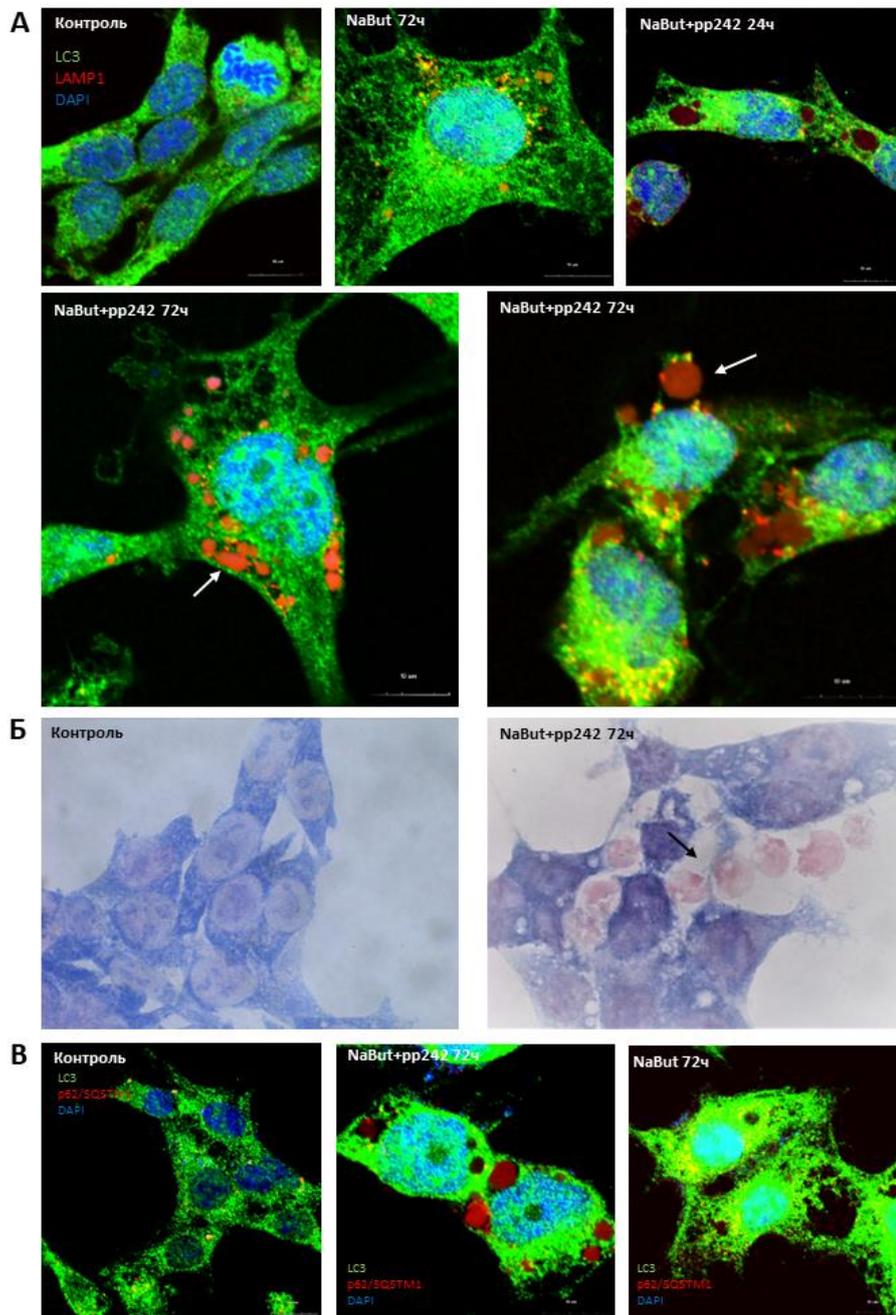


Рис 27. При ингибировании mTORC1 в стареющих клетках формируются вакуоли, в которых скапливается LAMP1-позитивный, кислый материал, а также p62/SQSTM1. А. ИФ с АТ к LAMP1 и LC3. Б. Окрашивание по методу Романовского-Гимза, стрелки указывают шаровидные скопления кислого материала в вакуолях и за пределами клеток. 40х ув. В. В стареющих клетках с при ингибировании mTORC1 p62/SQSTM1 скапливается в вакуолях, что свидетельствует о нарушении аутофагии. ИФ с АТ к p62/SQSTM1 и LC3. Масштабная линейка 10 μ m.

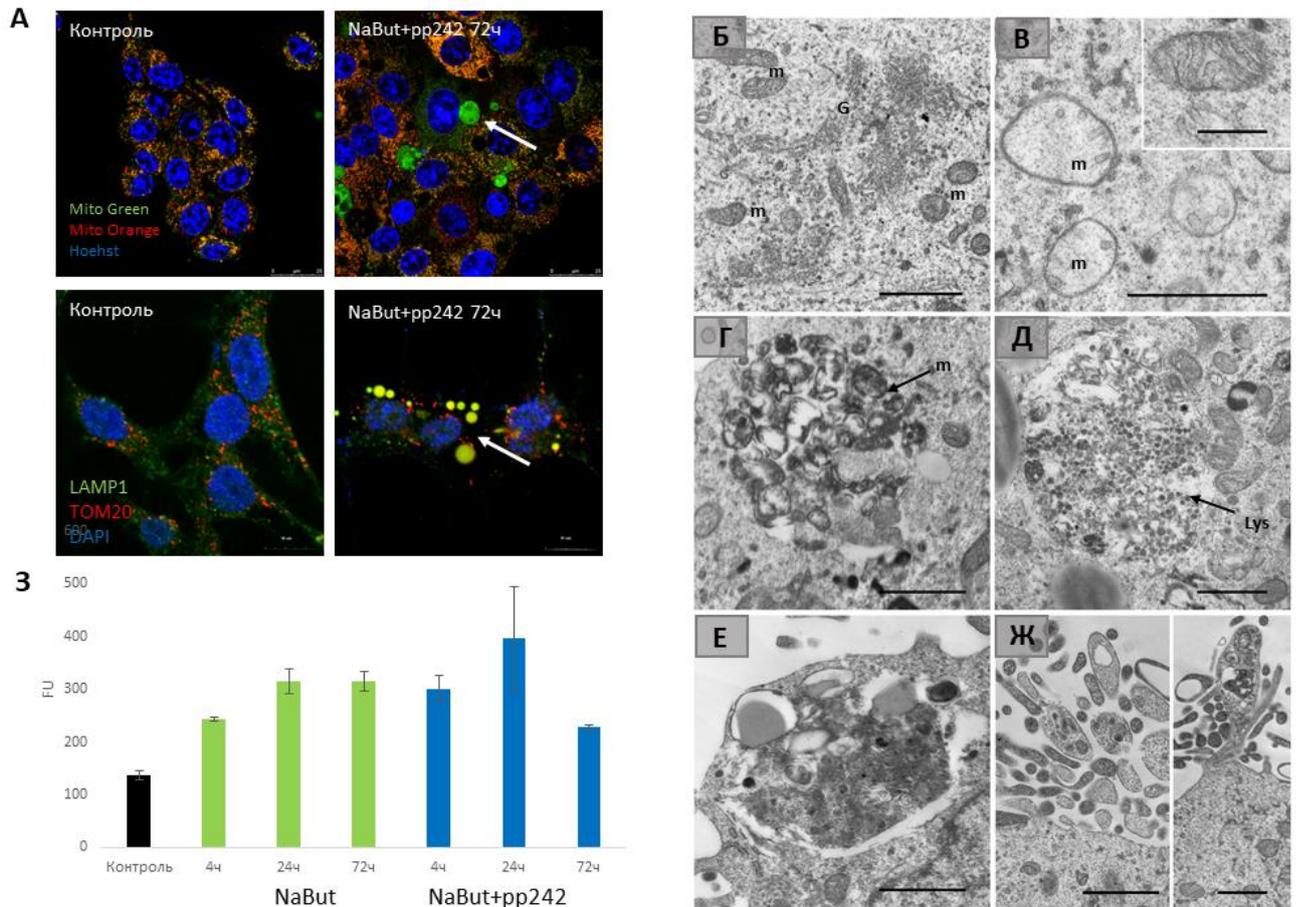


Рис 28. Поврежденные в результате ингибирования mTORC1 митохондрии изолируются в вакуоли. А. ИФ; верхняя панель: митохондрии окрашены Mitotracker Green, Orange. Нижняя панель: митохондрии визуализированы с помощью АТ к белку наружной мембраны митохондрий TOM20. Масштабная линейка 10 μ m. Б. ТЭМ, демонстрирующая цитоплазму старой клетки ERas (72ч культивирования с NaBut), неповрежденные митохондрии (m) и комплекс Гольджи (G). В. ТЭМ-изображение стареющей ERas при ингибировании mTORC1. m – митохондрия. Врезка демонстрирует неповрежденную митохондрию в контрольной клетке. Г. Вакуоль со скоплением остатков поврежденных митохондрий (m). Д. Вакуоль, в которой скапливаются лизосомы (Lys). Е. Вакуоль с остатками митохондрий и лизосом, содержимое которой будет вот-вот экскретировано за пределы клетки. Ж. Остатки мембран митохондрий и лизосомы, экскретированные за пределы клетки. З. Изменение уровней активных форм кислорода в стареющих клетках в течение 72ч ингибирования mTORC1.

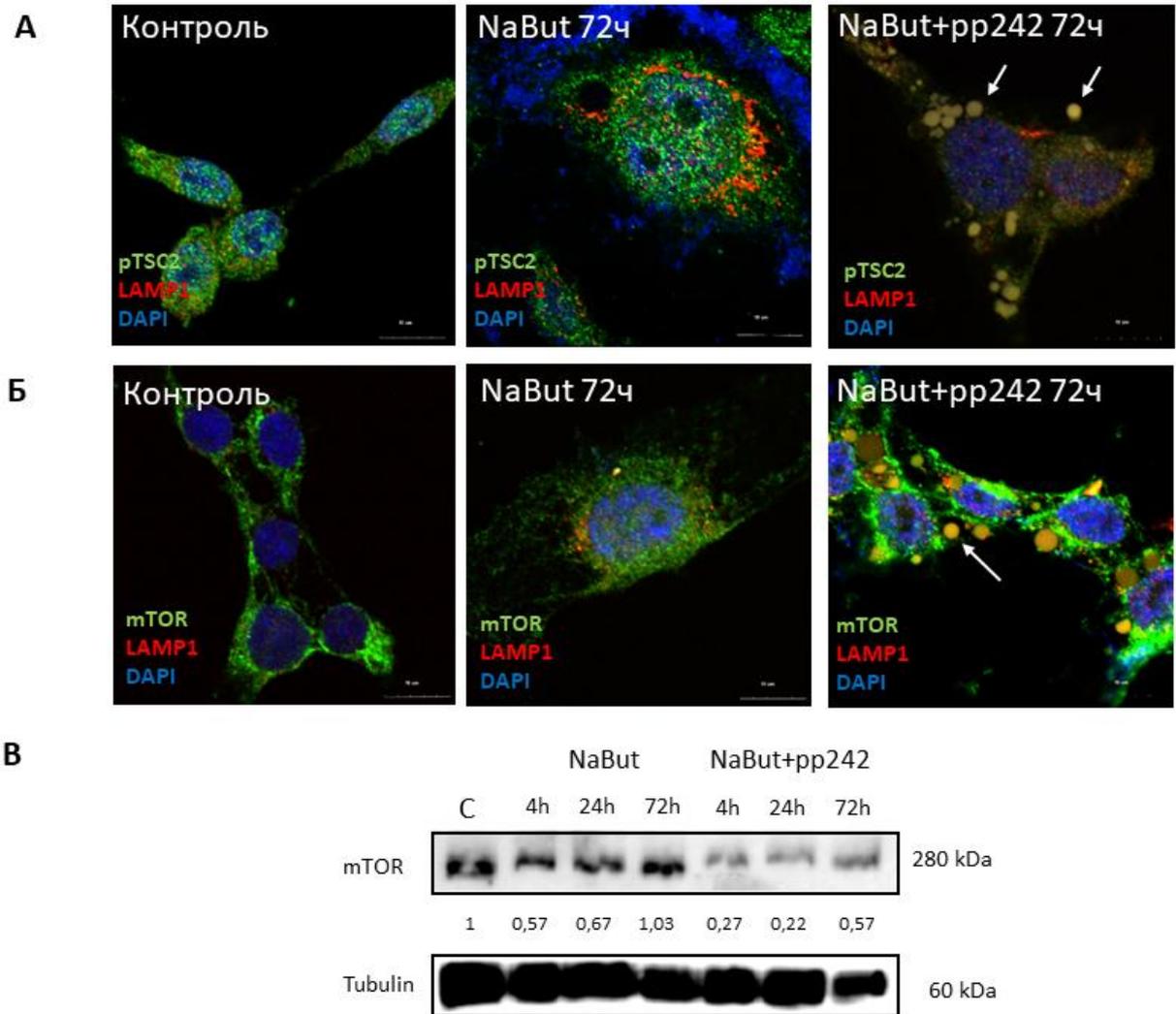


Рис 29. Ингибирование mTORC1 нарушает перинуклеарную локализацию pTSC2 и самого mTOR, приводя к их изоляции в вакуолях. А. ИФ с АТ к pTSC2 и LAMP1. Б. ИФ с АТ к mTOR и LAMP1. Ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 10 μ m. В. Вестерн-блоттинг с АТ к mTOR и тубулину. Цифры обозначают денситометрию полос Вестерн-блоттинга.

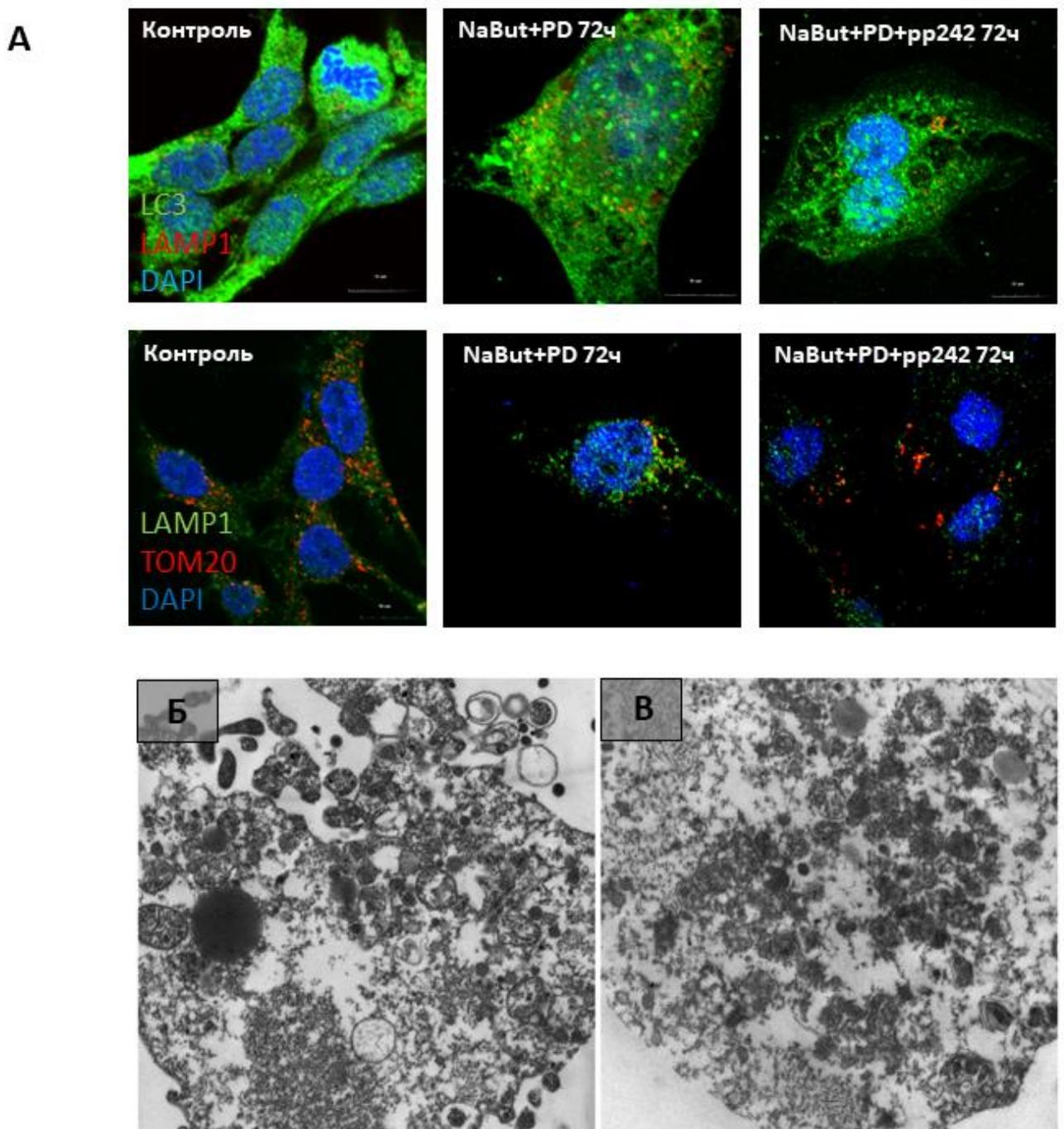


Рис 30. При ингибировании MEK/ERK-пути клетки не могут реализовать путь спасения, связанный с изоляцией поврежденных митохондрий в вакуоли, и претерпевают гибель. А. ИФ с АТ к LAMP1, LC3 (верхняя панель), TOM20 (Нижняя панель). Масштабная линейка 10 μ м. Б. ТЭМ, демонстрирующая стареющую клетку, подвергнутую ингибированию MEK/ERK в течение 72ч. В. ТЭМ, демонстрирующая цитоплазму стареющей клетки, обработанной ингибиторами MEK/ERK и mTOR в течение 72ч.

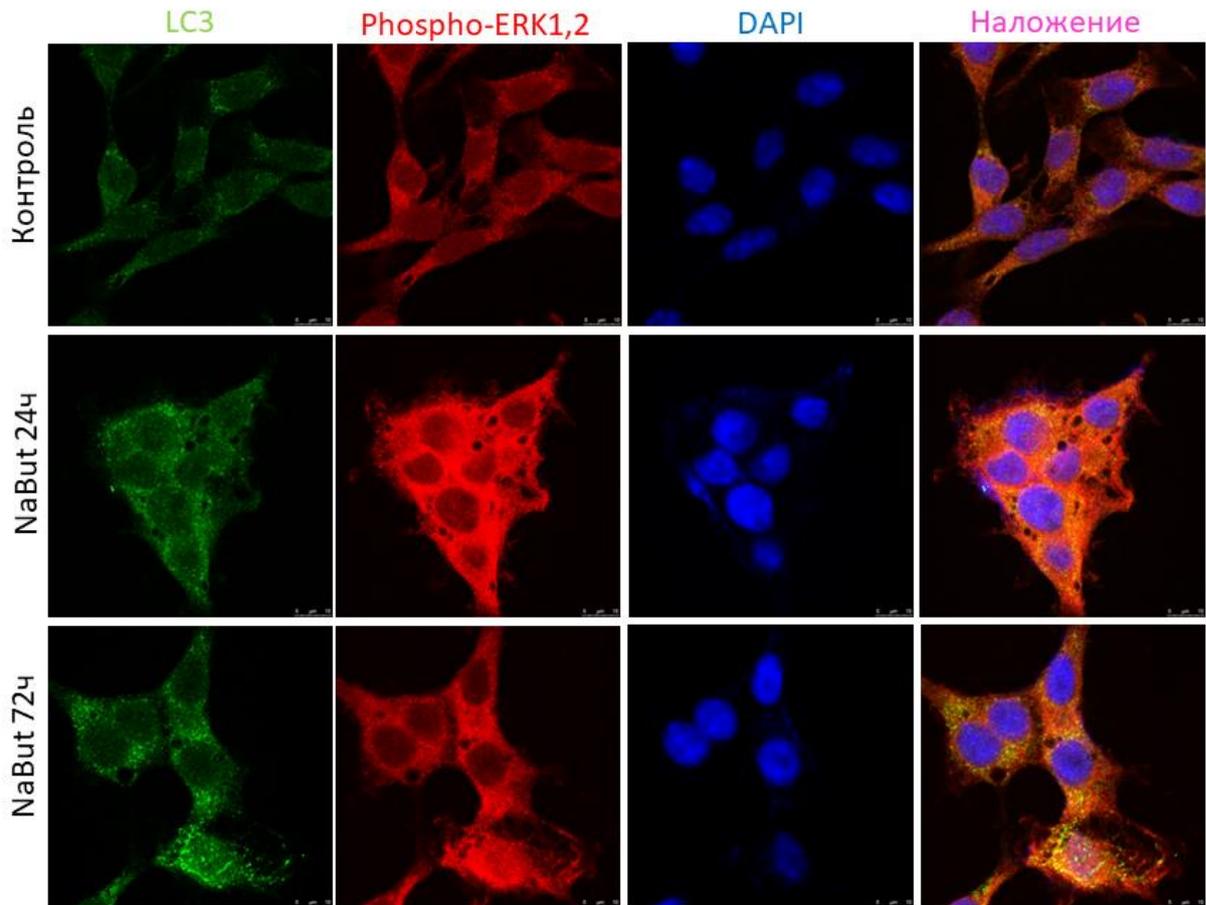


Рис 31. В Erag фосфорилированные ERK1,2 имеют частично цитоплазматическую локализацию. ИФ с АТ к pERK и LC3, ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка 25 μm.

4.7. *MEK/ERK-путь необходим для активации аутофагии в ответ на ДНК-повреждение, вызванное облучением*

Согласно полученным данным, аутофагия является ключевым механизмом спасения клеток Erag при действии противоопухолевого агента PD0325901. Однако, как аутофагия поддерживает жизнеспособность опухолевых клеток после ДНК-повреждающего действия ионизирующего облучения, пока не ясно. Ионизирующее облучение является источником повреждений ДНК, а аутофагия, как показано, может восстанавливать целостности генома (Vessoni et al, 2013). Вовлечение MEK/ERK-пути в поддержание жизнеспособности путем активации аутофагии было изучено после действия рентгеновского облучения в дозе 3Гр.

Ингибирование MEK/ERK-пути снижает пролиферативную активность и жизнеспособность клеток, как следует из данных МТТ, кривой роста и клоногенной выживаемости, и клетки претерпевают апоптоз (Рис 32А,Б,В,Г). Ионизирующее облучение вызывает повреждения ДНК, что приводит к запуску репарационных процессов (Maier et al, 2016). В облученных клетках выявляются микроядра, в которых изолируется поврежденная ДНК, не подлежащая репарации. При ингибировании MEK/ERK-пути больший процент клеток формирует микроядра, и среднее число микроядер на клетку через 24ч возрастает (Рис 33). Это говорит о том, что ингибирование MEK/ERK-пути усиливает чувствительность клеток к облучению. Кроме того, поскольку аутофагия может способствовать удалению ДНК в микроядрах, увеличение среднего числа микроядер в облученных клетках с ингибированным MEK/ERK позволяет предположить, что в них аутофагический процесс нарушен. Это предположение подтверждается данными ИФ анализа с антителами к p62/SQSTM1, согласно которым ни через 24, ни через 72ч в облученных клетках с ингибированным MEK/ERK не происходит его колокализации с LC3, и p62/SQSTM1 выявляется в виде скоплений в крупных вакуолях (Рис 34). p62/SQSTM1 при нормальном

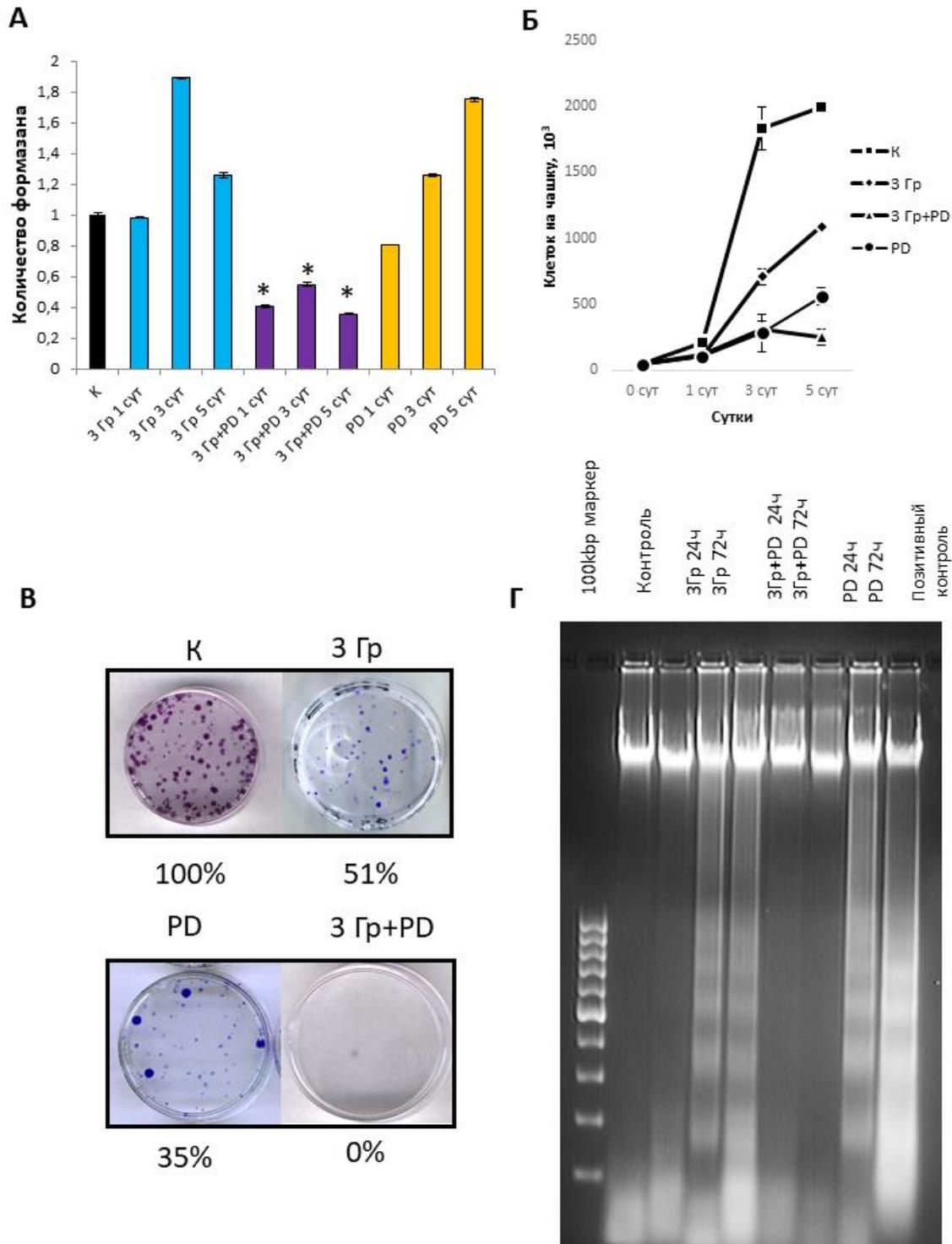


Рис 32. Ингибирование MEK/ERK-пути в облученных клетках снижает их жизнеспособность (А, МТТ-тест), пролиферативную активность (Б) и клоногенную выживаемость (В) и ведет к апоптозу (Г; в качестве позитивного контроля использованы Eras, подвергнутые сывороточному голоданию в течение 24 ч). Указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$.

течении аутофагического процесса перемещает убиквитинилированный поврежденный материал в аутофагосомы и деградирует вместе с грузом после слияния аутофагосом с лизосомами, и накопление p62/SQSTM1 свидетельствует о нарушении аутофагии. Таким образом, ингибирование MEK/ERK-пути в облученных клетках нарушает течение аутофагического процесса, приводящее к снижению жизнеспособности клеток.

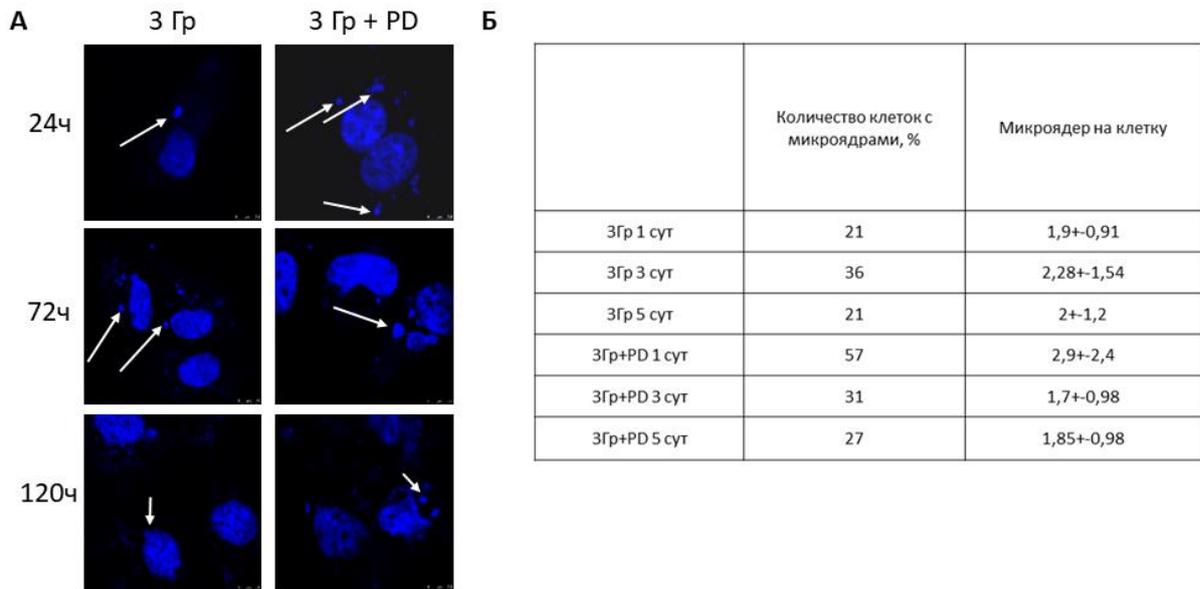


Рис 33. При ингибировании MEK/ERK-пути в облученных клетках увеличивается число микроядер. ДНК визуализирована с помощью DAPI. Масштабная линейка 25 μm .

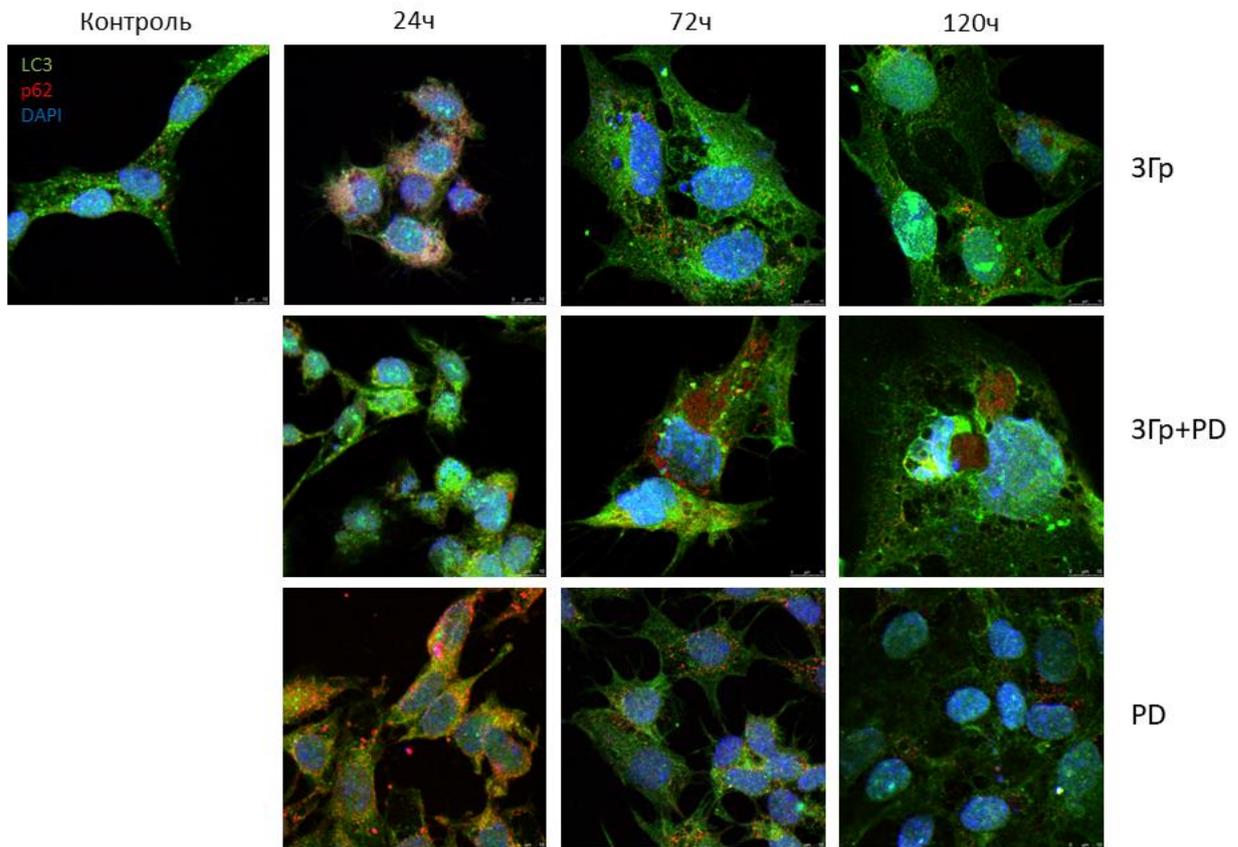


Рис 34. В облученных клетках с ингибированным MEK/ERK нарушен процесс аутофагии, что выражается в накоплении p62/SQSTM1. ИФ с АТ к LC3 и p62/SQSTM1. Масштабная линейка 25 μ м.

4.8. *Индукция старения делает KRas-экспрессирующие клетки человека A549 чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути.*

Чтобы выяснить, специфичен ли полученный результат для клеток *E1A+cHa-Ras*, несущий анти-апоптотический онкогенный HRas, были использованы клетки аденокарциномы легкого человека A549, несущие мутантный онкоген KRas. Как и в случае клеток E_{ras}, A549 приобретают толерантность к действию одного MEK/ERK-ингибитора после 120 суток культивирования (Рис 35А). Однако индукция старения совместно с ингибированием MEK/ERK приводит к гибели клеток, согласно данным МТТ. ИФ анализ показал, что ингибирование MEK/ERK-пути в индуцированных к старению клетках также приводит к релокализации Ras с мембраны в цитоплазму. Это позволяет предполагать сходный механизм инактивации онкогенного Ras при нарушении активности Ras-пути (Рис 35Б).

Чтобы определить будет ли комбинация индуктора старения NaBut и ингибитора MEK/ERK-пути оказывать проапоптотическое действие на первичные клетки, были использованы эмбриональные фибробласты мыши на раннем пассаже (2 пассаж). Как следует из МТТ, комбинация NaBut+PD не снижает жизнеспособность этих клеток, однако проточная цитометрия демонстрирует выраженное снижение доли клеток в S-фазе, что свидетельствует о подавлении пролиферации (Рис 36). И ингибитор HDAC, и ингибитор MEK/ERK оказывают цитостатическое действие на клетки, вопрос о том, претерпевают ли клетки старение и становятся ли источниками SASP, требует дальнейшего исследования.

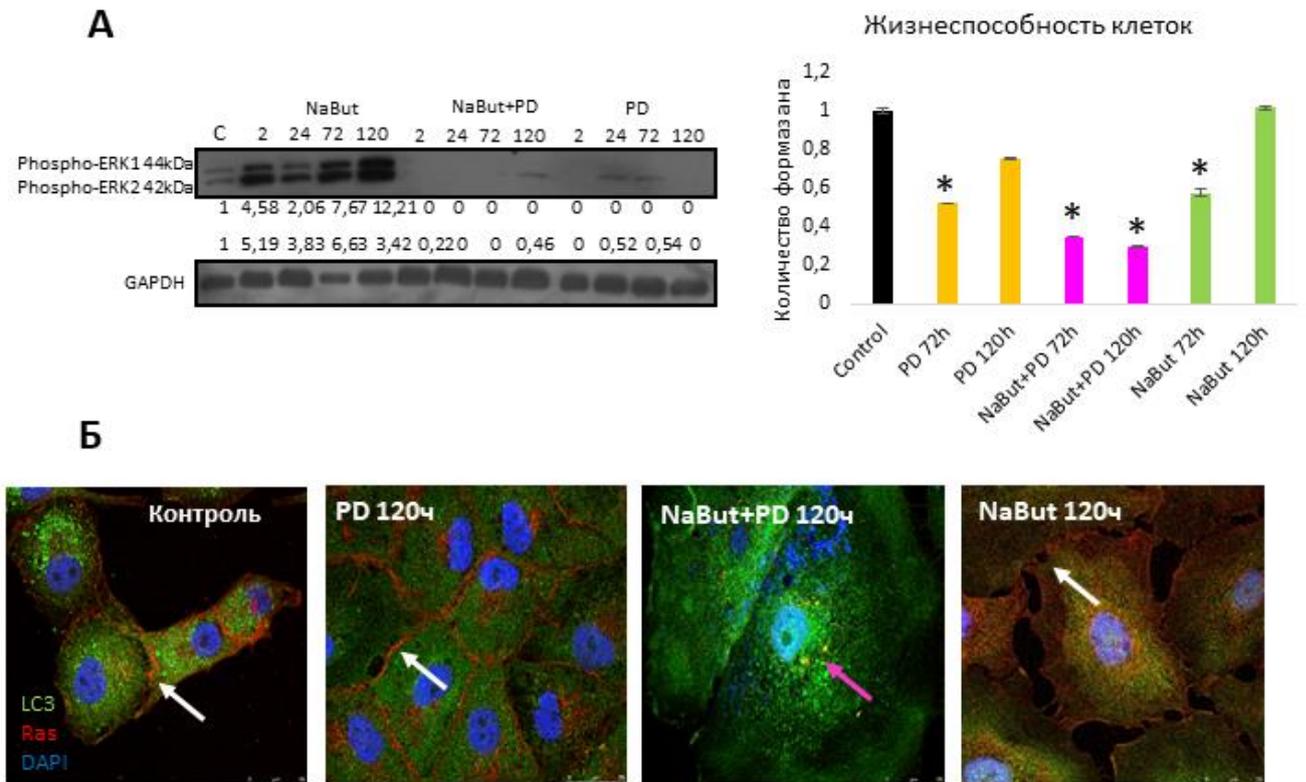


Рис 35. Индукция старения повышает чувствительность клеток аденокарциномы легкого человека A549 к MEK/ERK-ингибитору. А. Фосфорилирование ERK1,2 в клетках (Вестерн-блоттинг) и изменение жизнеспособности клеток в течение 120ч действия ингибиторов (МТТ-тест), указаны средние значения по трем повторам \pm ошибка среднего. * $P \leq 0,05$. Б. Локализация Ras в клетках при MEK/ERK-ингибировании, ИФ с АТ к Ras и LC3. Стрелками показан Ras, связанный с мембранами клеток (белая) и в цитозоли (розовая). Масштабная линейка 25 μ m.

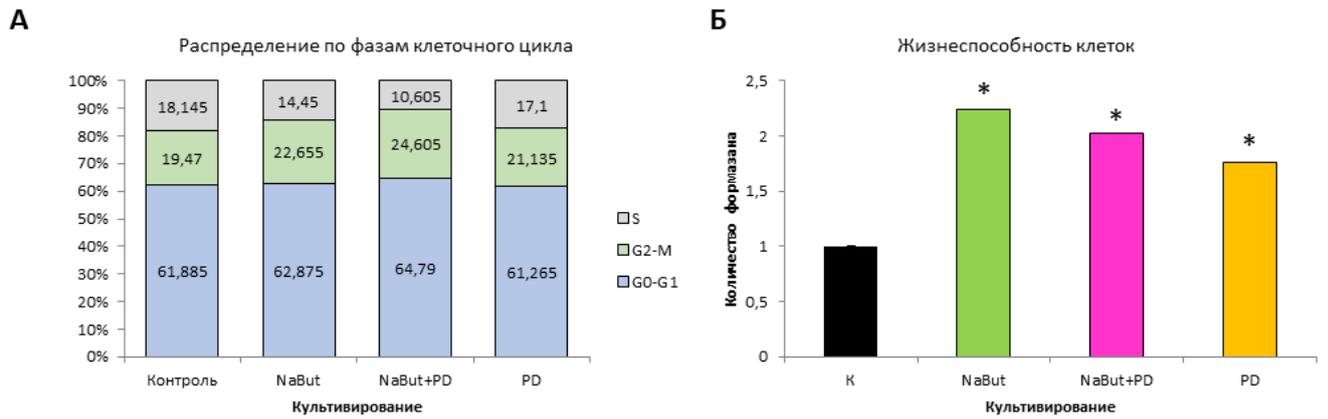


Рис 36. Комбинация индуктора старения NaBut и ингибитора MEK/ERK PD0325901 не приводит к снижению жизнеспособности эмбриональных фибробластов мыши. Изменение распределения по фазам клеточного цикла (А) и жизнеспособности (Б) эмбриональных фибробластов мыши в ответ на действие NaBut и ингибитора MEK/ERK-пути в течение 72ч.

5. Обсуждение

Способность Ras-экспрессирующих опухолевых клеток индуцировать цитопротективную аутофагию в ответ на действие противоопухолевых агентов является фактором, затрудняющим терапию подобного рода опухолей. Мы получили данные о том, что *E1A+cHa-Ras*-трансформанты отвечают на ингибирование MEK/ERK-пути специфическим киназным ингибитором PD0325901 активацией AMPK-регулируемой аутофагии, которая элиминирует поврежденные митохондрии и восстанавливает жизнеспособность клеток. Эти данные совпадают с имеющимися в литературе (Sanduja et al, 2016; Morgan et al, 2014; Temraz et al, 2015). Поскольку ответ клеток на повреждающее действие MEK/ERK-ингибитора связан с усилением интенсивности аутофагии, требуется найти способ снижения уровня интенсивности аутофагии. Известно, что негативным регулятором, подавляющим интенсивность аутофагии, является mTOR-киназа, которая также является регулятором старения. Следовательно, можно предполагать, что развитие программы старения и повышение активности mTOR будут препятствовать интенсивной аутофагии при ингибировании MEK/ERK.

Стареющие клетки не способны завершить процесс цитопротективной аутофагии в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути (Рис 12, 13) и удалить поврежденные митохондрии (Рис 10, 11), вследствие чего клетки претерпевают апоптоз (Рис 15). Несмотря на предположение, что неспособность стареющих клеток завершать аутофагию обусловлена конститутивно активным mTORC1 – негативным регулятором аутофагии, экспериментальные данные показали, что подавление активности mTORC1 не восстанавливает аутофагию и целостность митохондриального пула, а также жизнеспособность старых клеток при ингибировании MEK/ERK-пути. Следовательно, чувствительность стареющих клеток к ингибитору MEK/ERK-пути PD0325901 связана не только с активностью mTORC1, но и с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом, а также релокализацией Ras с цитоплазматической мембраны. Таким образом, понимание

механизмов, регулирующих локализацию аутофагосом и лизосом в старых клетках, может дать важную информацию для разработки стратегий элиминации стареющих опухолевых клеток.

Недавние исследования показали, что лизосома может функционировать в качестве важного пункта интеграции сигналов в ответ на нехватку питательных веществ и падение уровня энергии. Лизосомальный комплекс v-ATPase-Ragulator, контролирующий одновременно и AMPK, и mTORC1, осуществляет переключение катаболических и анаболических процессов (Carroll and Dunlop, 2017). Расположение лизосом в клетке влияет на активность mTORC1, связанного с их мембраной. Показано, что в условиях голодания mTOR активируется, перемещаясь вместе с лизосомами к периферии клетки, в то время как находясь у ядра он неактивен (Korolchuk et al, 2011). Однако стареющие клетки оказываются в этом плане уникальными, так как активность mTORC1 в них не зависит от ростовых факторов и аминокислотной депривации (Lopez-Otin et al, 2013; Carroll et al, 2017), и в них перинуклеарно колокализованный вместе с лизосомами mTORC1 сохраняет высокую активность (Korolchuk et al, 2011). Возникает вопрос, каким образом достигается конститутивная активность mTORC1 в старых клетках. Известно, что на лизосомы транслоцируются и TSC1/2, и AMPK – негативные регуляторы mTOR. Тем не менее, они также не подавляют активность mTOR в старых клетках.

Регуляция связи mTORC1 с лизосомами осуществляется комплексом V-ATPase-Ragulator (Carroll and Dunlop, 2017). Также комплекс V-ATPase-Ragulator, как оказалось, участвует в активации AMPK через AXIN-LKB1 и в условиях глюкозной депривации он функционирует как переключатель между AMPK и mTORC1, и, соответственно, катаболизмом и анаболизмом (Zhang et al, 2014). С мембранами лизосом связаны v-(H⁺)-АТФаза и аминокислотные транспортеры (SLC7A5/A2, PAT1), которые реагируют на изменения уровня АТФ и питательных веществ, изменяя свою конформацию и, как следствие, взаимодействие с Ragulator (Rabanal-Ruiz and Korolchuk, 2018). Хорошо изученным транспортером аминокислот, взаимодействующим с mTORC1,

является Slc38A9, который реагирует на поступление аргинина и вместе с Ragulator активирует Rag-ГТФазы (Shen and Sabatini, 2018). Показано, что оверэкспрессия Slc38A9 делает mTORC1 нечувствительным к уровню аминокислот в клетке (Wang et al, 2015). Следовательно, для понимания регуляции процессов в стареющих клетках, которые характеризуются конститутивной, независимой от аминокислот и ростовых факторов активностью, важным является исследование активности Slc38A9. В старых клетках локализация mTORC1 вокруг ядра не подавляет его активность, и понимание механизмов, контролирующих пространственное положение ключевых компонентов аутофагии при старении и органелл, вовлеченных в эти процессы, может дать принципиально новую информацию при разработке новых подходов уничтожения опухолевых клеток

Последние исследования свидетельствуют в пользу того, что лизосомы в клетке имеют большее значение, чем просто участие в переваривании. Лизосомы могут экскретировать свое содержимое за пределы клетки (Settembre et al, 2013) и даже выходить за пределы клетки. Расщепляя макромолекулы в межклеточной среде, лизосомы могут использовать в качестве строительных материалов в условиях нехватки питательных веществ и энергии. При ингибировании активности mTOR с помощью pp242 в стареющих ERas через 72ч часть лизосом выявляется за пределами клеток. Возможно, эти лизосомы поставляют клеткам, у которых подавлен mTOR и снижен уровень энергии из-за повреждения митохондрий, питательные вещества, поддерживая их жизнеспособность. Аутофагия в ERas-клетках представляет собой механизм защиты от действия киназного ингибитора. Однако этот механизм защиты при нарушении регуляции может стать способом гибели. Наблюдаемые при ингибировании mTOR вакуоли, содержащие поврежденные митохондрии и лизосомы, и последующее выведение содержимого вакуолей из клеток, по всей видимости, представляет собой более древний механизм защиты клетки, который не может выйти из-под контроля. Согласно полученным данным, наблюдаемый механизм является LC3-независимым. LC3-независимая аутофагия была показана на гепатоцитах, где при

индукции аутофагии голоданием или подавлением mTORC1 изоляция содержимого контролировалась через GABARAP и сохранялась при подавлении экспрессии LC3 с помощью siRNA (Szalai et al, 2015). Эти данные свидетельствуют о том, что аутофагию контролирует не только LC3, но и GABARAP, а также, возможно, и другие системы. LC3-независимые механизмы деградации белков в старых клетках пока не исследованы. Но можно заключить, что стареющие клетки могут поддерживать свою жизнеспособность за счет процесса, который является не только mTOR-независимым, но и, возможно, LC3-независимым. Аутофагия в старых клетках может отличаться от канонической аутофагии не только регуляцией, но и динамикой. Старым клеткам необходимо поддерживать интенсивность слияния аутофагосом с лизосомами на низком уровне, чтобы сохранять гипертрофию. Следовательно, условия, в которых клеткам необходима высокая интенсивность аутофагии (повреждение митохондрий, вызванное действием химиотерапевтическими агентами), могут стать губительными для стареющих клеток.

В клетках ERas активны киназы ERK1,2, и согласно полученным нами данным Вестерн-блоттинга, в стареющих ERas уровень фосфорилирования ERK1,2 не падает (Рис 1). Во-первых, конститутивно активные ERK1,2 будут обеспечивать постоянную активность транскрипционных факторов, регулирующих гены раннего ответа, что позволит поддерживать жизнеспособность клеток, в том числе в случае депривации аминокислот и питательных веществ. Во-вторых, ERK2, согласно данным Settembre et al, также вовлечены в регуляцию биогенеза лизосом через ТФ TFEB, и ингибирование ERK1,2 приводило к перемещению TFEB в ядро (Settembre et al, 2011). Также мы обнаружили, что в ERas, стареющих под действием NaBut, выявляется цитоплазматическая фракция фосфорилированных ERK-киназ вокруг ядра (Рис 31). Это позволяет говорить о том, что в этих клетках определенную роль могут играть цитоплазматически локализованные ERK-киназы, осуществляя поддержание стабильности митохондрии, а также активность mTORC1. Наши ИФ-данные показали, что эта фракция ERK-киназ колокализуется с LC3, что позволяет предполагать их участие в регуляции

аутофагии. Участие MEK/ERK-пути в аутофагии было показано в исследованиях Shinojima et al, 2007 и Gu et al, 2016. В первом аутофагия индуцировалась при активации ERK1,2 киназ при действии циркумина на клетки глиомы человека. Во втором исследовании активация MEK/ERK-пути промотировала экспрессию аутофагического белка Beclin1 в клетках H9c2, полученных из сердец эмбрионов крысы. Скорее всего, эта связь двусторонняя, так как аутофагосомы, в свою очередь, могут служить скэффолдами для MEK и ERK-киназ (Martinez-Lopez et al, 2014), и это взаимодействие, по-видимому, может представлять собой важность для Ras-экспрессирующих клеток. Мы не анализировали колокализацию цитоплазматических фосфорилированных ERK1,2 с маркером лизосом LAMP1, однако можно предположить, что ERK-киназы могут также транслоцироваться и на лизосомы, как и на аутофагосомы. Поскольку Ras/Raf/MEK/ERK-каскад способствует активации mTORC1, то можно предполагать, что он играет некую роль в поддержании конститутивной активности mTORC1 в старых клетках, несмотря на присутствие AMPK и TSC1,2. В целом, вовлечение MEK/ERK-пути в регуляцию активности лизосом, а также возможное взаимодействие ERK1,2-киназ с лизосомами представляют собой интересную тему для изучения в рамках исследования закономерностей старения и ответа на киназные ингибиторы Ras-экспрессирующих клеток.

«Цитоплазматические» ERK1,2-киназы могут быть связаны с митохондриями. Митохондрии вовлечены в развитие программы старения. В клетках, в которых была осуществлено полное удаление митохондрий с помощью оверэкспрессии Parkin, фенотип старения таких клеток, был редуцирован по сравнению с клетками дикого типа после действия облучения (Correia-Melo et al, 2016). Изменение фенотипа старения было выражено не только в подавлении маркеров (SA- β -Gal, размер клеток, SASP), но и в снижении активности mTOR-киназы. Кроме того, снижение активности mTOR было обнаружено не только в индуцированных к старению, но и в контрольных клетках с лишенными митохондриями. Ряд исследований показывает, что mTOR вовлечен в регуляцию динамики и активности митохондрий (Morita et al, 2017; Betz et al, 2013;

Ramanathan et al, 2009), однако исследование Correia-Melo et al (Correia-Melo et al, 2016) показывает, что митохондрии, в свою очередь, также могут оказывать влияние на активность mTOR-киназы. Интересным результатом данного исследования является то, что полученные «безмитохондриальные» клетки сохраняли свою жизнеспособность вплоть до 16 суток, увеличив интенсивность гликолиза (Correia-Melo et al, 2016).

Полученные нами результаты вместе с имеющимися в литературе данными свидетельствуют о том, что жизнеспособность Ras-экспрессирующих клеток прямо зависит от митохондрий. На альвеолярных макрофагах было показано, что ингибирование фосфорилирования киназ ERK1,2 приводит к повреждению митохондрий и снижению уровня АТФ (Monick et al, 2008). Также эти авторы показали, что в изолированных митохондриях выявляется фракция ERK1,2 киназ, что подтверждает участие этих киназ в работе митохондрий. На клеточных линиях рака простаты RWPE2 и DU145, а также клетках остеосаркомы SaOS2 было показано, что митохондриальная фракция ERK1,2 участвует в поддержании устойчивости этих клеток к апоптозу (Rasola et al, 2010). Таким образом, ингибирование MEK/ERK-пути могло привести к снижению уровней производства АТФ и снижению устойчивости митохондрий, вследствие чего в контрольных клетках активировалась митофагия.

Через 72ч ингибирования MEK/ERK-пути в контрольных клетках их пролиферативная активность, согласно данным кривых роста, снижена по сравнению с необработанными клетками, однако не подавлена полностью (Рис 2). Исходя из этого, можно заключить, что после культивирования с ингибитором MEK/ERK появляется популяция не только жизнеспособных, но и пролиферирующих клеток, и, по всей видимости, восстановление пролиферативного потенциала также поддерживается цитопротективной аутофагией. На данный момент нельзя достоверно сказать о прямой связи аутофагии с регуляцией клеточного цикла, но аутофагия и mTOR регулируют общий объем белков, в число которых входят белки-регуляторы цикла. Возникает вопрос, можно ли индуцировать к старению популяцию пролиферирующих

клеток, образовавшуюся после ингибирования MEK/ERK, изменением активности аутофагии.

Вторая причина, по которой стареющие клетки не смогли развить аутофагический ответ – это перемещение Ras с мембраны в цитозоль (Рис 20). Поскольку Ras является мембран-ассоциированным белком, его релокализация с мембраны негативно повлияла на его функции как регулятора аутофагии и устойчивости к апоптозу. Однако механизм, который обеспечил перемещение Ras с мембраны в цитозоль, пока не ясен. Интересно отметить, что у клеток A549, культивируемых с NaBut в течение 120ч, наряду с мембран-ассоциированным Ras выявлено некоторое количество Ras в районе ядра (Рис 35). Скорее всего, это Ras, локализованный на мембранах комплекса Гольджи либо ЭПР. Было показано, от того, на каких мембранах локализован Ras, зависит, какие из его нижележащих мишеней будут активированы (Casar et al, 2009). В частности, Ras, ассоциированный с мембранами комплекса Гольджи, стимулирует активность стресс-киназ Jnk1,2 (Mattalanas et al, 2006), которые могут играть важную роль в поддержании жизнеспособности индуцированной к старению клетки. Ras, связанный с мембранами ЭПР, как оказалось, участвует в ответе на накопление неправильно сложенных белков (Wu et al, 2010). Его активация, обусловленная оксидазой Nox4, привела к запуску цитопротективной аутофагии и спасению клеток эндотелия человека при действии туникамицина и Hiv-1-Tat (Wu et al, 2010). Несмотря на то, что активность онкогенного Ras связывают с его локализацией прежде всего под цитоплазматической мембраной, роль Гольджи- и ЭПР-связанного Ras в ответе Ras-трансформированных опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов и индукторов старения также является интересным предметом для изучения.

Старение изначально рассматривалось как противоопухолевая программа, поскольку оно препятствует неконтролируемой пролиферации клеток и может быть индуцировано в опухолевых клетках рядом агентов. Но с другой стороны, старые клетки сохраняют жизнеспособность и характеризуются устойчивостью к апоптозу, а также секретируют ряд цитокинов и факторов роста, способных

привести к злокачественной трансформации микроокружения. В норме старые клетки необходимы организму, поскольку являются не только источниками цитокинов и факторов роста, но и локализуются в местах, где идет процесс IPS перехода и формирование источниками стволовых клеток. Таким образом, старые клетки играют важную роль в регенерации тканей и органов, участвуя в репрограммировании с помощью секретируемых старыми клетками факторов (Serrano, 2014). Однако в опухоли старые клетки могут стать источником не только цитокинов, но и раковых стволовых клеток, что сильно затруднит терапию опухоли. Старение клеток ассоциируется с устойчивостью к апоптозу и риском туморогенности. Однако полученные нами данные позволяют говорить о старении как уязвимости перед киназными ингибиторами, предотвращающей реализацию цитопротективной аутофагии. Интересно исследовать, как ингибирование MEK/ERK-пути влияет на SASP стареющих при действии NaBut клеток. Показано, что повреждения митохондрий оказывают влияние на SASP клеток, в частности, приводят к отсутствию интерлейкина-1, CXCL1, CXCL2, IL-6, IL-8 и VEGF (Wiley et al, 2016). Если повреждение митохондрий оказывает влияние на активность mTOR, как было получено в исследовании Correia-Melo et al, то это может быть одним из объяснений изменений SASP стареющих после повреждения митохондрий клеток, так как ингибирование mTOR также приводит к изменению профиля SASP (Herranz et al, 2015; Laberge et al, 2015). Интересно отметить, что отсутствующие (Wiley et al, 2016) компоненты SASP являются провоспалительными. Поскольку согласно полученным нами данным, MEK/ERK-ингибирование приводит к повреждению митохондрий, можно заключить, что SASP стареющих клеток с ингибированным MEK/ERK будет отличаться от SASP стареющих клеток с активным MEK/ERK и будет оказывать иное влияние на микроокружение.

Нами было показано, Ras-трансформированные клетки восстанавливают свою жизнеспособность и пул функциональных митохондрий при действии киназного ингибитора MEK/ERK-пути PD0325901 за счет активации AMPK-регулируемой цитопротективной аутофагии. Однако индукция старения делает эти клетки

уникально чувствительными к действию киназного ингибитора MEK/ERK-пути. Неспособность старых клеток завершить цитопроеткивную аутофагию в ответ на ингибитор связана с разобщением участников аутофагии – аутофагосом и лизосом, а также перемещением онкогенного Ras с мембраны клетки в цитозоль. Полученные данные позволяют предложить существенно новую стратегию элиминации Ras-трансформированных опухолевых клеток.

6. Заключение и выводы

6.1. Заключение

Аутофагия – это эволюционно консервативный процесс ответа клетки на стресс, нехватку питательных веществ, ростовых факторов и энергии. Аутофагия играет ключевую роль в ответе Ras-экспрессирующих клеток на действие киназного ингибитора MEK/ERK-пути. Толерантность этих клеток связана с активацией AMPK-регулируемой аутофагии, которая элиминирует митохондрии, поврежденные в результате подавления ERK-киназ, и восстанавливает жизнеспособность и пролиферативную активность. Применение ингибитора HDAC, индуцирующего процесс старения, отменяет толерантность к MEK/ERK ингибитору и вызывает клеточную гибель. Как было показано одновременно с нами, эта комбинация ингибиторов эффективно уничтожает опухолевые клетки человека разного гистогенеза (Yamada et al, 2017). Индуцированные к старению Ras-экспрессирующие клетки не способны элиминировать поврежденные митохондрии в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути, так как они не развивают полноценный аутофагический ответ. Преодоление толерантности связано с формированием TASC-компартов, разобщающих слияние аутофагосом и лизосом в стареющих клетках, а также с перемещением онкогенного Ras с мембраны в цитозоль, отменяющим его антиапоптотические функции. Недавние исследования показали, что лизосома может функционировать в качестве важного пункта интеграции сигналов в ответ на нехватку питательных веществ и падение уровня энергии. Показано, что лизосомальный комплекс v-ATPase-Ragulator, контролирующей одновременно и AMPK, и mTORC1, осуществляет переключение катаболических и анаболических процессов. Локализация комплексов mTORC1-лизосома по периферии цитоплазмы активирует mTORC1, тогда как перинуклеарная кластеризация ингибирует его. Однако в старых клетках перинуклеарная локализация mTORC1 не ведет к его инактивации. Понимание механизмов, контролирующих пространственное положение ключевых компонентов аутофагии при старении и органелл, вовлеченных в эти процессы, может дать принципиально новую информацию для разработки

подходов уничтожения опухолевых клеток. Используя такой подход, мы обнаружили, что стареющие клетки становятся крайне уязвимыми к действию киназных ингибиторов Ras-пути за счет пространственного разобщения участников аутофагического процесса. Следовательно, применение MEK/ERK-ингибиторов одновременно с индукторами старения представляет перспективную стратегию элиминации Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

6.2. Выводы

1. В основе толерантности Ras-экспрессирующих опухолевых клеток к действию киназных ингибиторов MEK/ERK-пути лежит активация цитопротективной аутофагии, приводящая к восстановлению митохондриального метаболизма и жизнеспособности клеток в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути;
2. Апоптотическая гибель стареющих клеток в ответ на подавление MEK/ERK связана с формированием гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа и TASC-компартов, препятствующих слиянию аутофагосом с лизосомами и уничтожению поврежденных митохондрий, а также с релокализацией онкогенного Ras с мембраны в цитозоль и инактивацией его антиапоптотических функций.
3. MEK/ERK-путь может отвечать в стареющих Ras-экспрессирующих опухолевых клетках за реализацию альтернативного пути удаления поврежденных митохондрий в случае нарушения канонического аутофагического процесса;
4. Толерантность клеток ERas к рентгеновскому облучению связана с активацией цитопротективной аутофагии, а ингибирование активности MEK/ERK-пути киназным ингибитором приводит к подавлению цитопротективной аутофагии и повышению клеточной гибели при действии рентгеновского облучения.

7. Список литературы

1. Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. *Цитология*, 2005; 47(12): 1055 - 1062
2. Allan L.A., Morrice N., Brady S., Magee G., Pathak S., Clarke P.R. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biol* 2003; 7:647–654
3. Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chandra P., Roderick H.L., Habermann A., Griffiths G., Ktistakis N.T. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2008; 182:685–701.
4. Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y.. Ultrastructural Analysis of the Autophagic Process in Yeast: Detection of Autophagosomes and Their Characterization. *The Journal of Cell Biology* 1994; 124 (6): 903-913.
5. Baines A.T., Xu D., Der C.J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med. Chem.* 2011; 3(14): 1787–1808.
6. Bar-Peled L., Sabatini D.M. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology*, 2014; 24(7): 400-406.
7. Bessard A., Fremin C., Ezan F., Fautrel A., Gailhouste L., Baffet G. RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2008; 27, 5315–5325.
8. Bettoun A., Joffre C., Zago G., Surdez D., Vallerand D., Gundogdu R., Sharif A.A., Gomez M., Cascone I., Meunier B., White M.A., Codogno P., Parrini M.C., Camonis J.H., Hergovich A. Mitochondrial clearance by the STK38 kinase supports oncogenic Ras-induced cell transformation. *Oncotarget*, 2016; 7(28): 44142 – 44160.

9. Betz C., Stracka D., Prescianotto-Baschong C., Frieden M., Demareux N., Hall M.N. mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *PNAS* 2013; 110 (31): 12526–12534.
10. Bitto A., Lerner C.A., Nacarelli T., Crowe E., Torres C., Sell C. 2014. P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy and disease. *Age (Dordr)*, 36(3): 9626.
11. Blagosklonny M.V. 2008. Aging. ROS or TOR. *Cell Cycle* 7(21): 3344 – 3354.
12. Blagosklonny M.V., Hall M.N. 2009. Growth and aging. A common molecular mechanism. *Aging* 1(4): 357 – 362.
13. Blagosklonny M.V. 2011. Molecular damage in cancer: an argument for mTOR-driven aging. *Aging* 3(12): 1130 – 1141.
14. Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)*, 2011; 3(2): 94 – 101.
15. Blagosklonny M.V. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4: 159-165.
16. Bos J.L. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *CANCER RESEARCH*, 1989; 49: 4682-4689.
17. Brachmann S., Fritsch C., Maira S., Garcí'a-Echeverri'a C. PI3K and mTOR inhibitors—a new generation of targeted anticancer agents. *Current Opinion in Cell Biology* 2009, 21:1–5.
18. Buchheit C.L, Angarola B.L., Steiner A., Weigel K.J., Schafer Z.T. Anoikis evasion in inflammatory breast cancer cells is mediated by Bim-EL sequestration. *Cell Death Differ.* 2015; 22:1275 – 1286.
19. Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev.*, 2011; 21(1): 107–112.
20. Carriere A., Romeo Y., Acosta-Jaques H.A., Moreau J., Bonneil E., Thibault P., Fingar D.C., Roux P.P. ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-

- dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* 2011, 286:567-577.
21. Carroll B., Nelson G., Rabanal-Ruiz Y., Kucheryavenko O., Dunhill-Turner N.A., Chesterman C.C., Zahari Q., Zhang T., Conduit S.E., Mitchell C.A., Maddoks O.D.K., Lovat P., von Zglinicki T., Korolchuk V.I. Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *The Journal of Cell Biology.* 2017; 216(7): 1949 – 1957.
 22. Carroll B., Dunlop E.A. The lysosome: a crucial hub for AMPK and mTORC1 signalling. *Biochemical Journal*, 2017; 474: 1453–1466
 23. Casar B., Arozarena I., Sanz-Moreno V., Pinto A., Agudo-Ibanez L., Marais R., Lewis R.E., Berciano M.T., Crespo P. Ras Subcellular Localization Defines Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Substrate Specificity through Distinct Utilization of Scaffold Proteins. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 2009; 29(5): 1338–1353.
 24. Cellurale C., Sabio G., Kennedy N.J., Das M., Barlow M., Sandy P., Jacks T., Davis R.J. Requirement of c-Jun NH₂-Terminal Kinase for Ras-Initiated Tumor Formation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 2011; 31(7): 1565 – 1576.
 25. Chan N. C., Salazar A. M., Pham A. H., Sweredoski M. J., Kolawa N. J., Graham R. L., Hess S. Chan D.C. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20: 1726-1737.
 26. Chantranupong L, Sabatini DM. The TORC1 pathway to protein destruction. *Nature*, 2016; 536(7615):155-156.
 27. Chen P.M., Lin C.H., Li N.T., Wu Y.M., Lin M.T., Hung S.C., Yen M.L. c-Maf regulates pluripotency genes, proliferation/self-renewal, and lineage commitment in ROS-mediated senescence of human mesenchymal stem cells. *Oncotarget.* 2015; 6 (34): 35404 – 35418.

28. Childs B.G., Baker D.J., Kirkland J.L., Campisi J., van Deursen J.M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 2014; 15(11): 1139 – 1153.
29. Clemens M.J., Elia A., Morley S.J. Requirement for the eIF4E Binding Proteins for the Synergistic Down-Regulation of Protein Synthesis by Hypertonic Conditions and mTOR Inhibition. *PLoS One*, 2013; 8(8): 1 – 9.
30. Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, 2008; 6(12): 2853-68.
31. Coppe J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5: 99–118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
32. Correia-Melo C., Marques F.D.M, Anderson R., Hewitt G., Hewitt R., Cole J., Carroll B.M., Miwa S., Birch J., Merz A., Rushton M.D., Charles M., Jurk D., Tait S.W.G., Czapiewski R., Greaves L., Nelson G., Bohlooly-Y M., Rodriguez-Cuenca S., Vidal-Puig A., Mann D., Saretzki G., Quarato G., Green D.R., Adams P.D., von Zglinicki T., Korolchuk V.I., Passos J.F. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal.* 2016; 35: 724 – 742.
33. Demers-Lamarche J., Guillebaud G., Tlili M., Todkar K., Bélanger N., Grondin M., Nguyen A.P., Michel J., Germain M. Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2016; 291(19): 10263 – 10276.
34. Demidenko Z.N., Shtutman M., Blagosklonny M.V. Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. *Cell Cycle*, 2009; 8(12): 1896-1900.
35. Deng X., Ruvolo P., Carr B., May W.S.Jr. Survival function of ERK1/2 as an IL-3 activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Nat Acad USA* 2000; 97:1578–1583.

36. Deng X., Kornblau S.M., Ruvulo P.P., May W.S.Jr. Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *JNCI Monographs* 2001; 28:30–37.
37. Dimri J.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 10541—10546.
38. Egan D.F., Shackelford D.B., Mihaylova M.M., Gelino S., Kohnz R.A., Mair W., Vasquez D.S., Joshi A., Gwinn D.M., Taylor R., Asara J.M., Fitzpatrick J., Dillin A., Violett B., Kundu M., Hansen M., Shaw R.J. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011; 331(6016); 456 – 461.
39. Fernando-Medarde A., Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes and Cancer*, 2011; 2(3): 344 – 358.
40. Fernández-Mosquera L., Diogo C.V., Yambire K.F., Santos G.L., Sanchez M.L., Benit P., Rustin P., Lopez L.C., Milosevic I., Raimundo N. Acute and chronic mitochondrial respiratory chain deficiency differentially regulate lysosomal biogenesis. *Scientific Reports* Furuno N, den Elzen N, Pines J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147: 295–306.2017; 7:45076.
41. Feser J., Truong D., Das C., Carson J. J., Kieft J., Harkness T., tyler J.K. (2010). Elevated histone expression promotes life span extension. *Mol. Cell* 39, 724–735.
42. Galluzzi L., Bravo San-Pedro J.M., Kroemer G. Autophagy mediates tumor suppression via cellular senescence. *Trends Cell Biol.* 2016; 26(1): 1-3.
43. Galluzzi L., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19: 107–120.
44. Galluzzi L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015; 22(1):58-73.

45. Galluzzi L et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 2018; 25(3):486-541.
46. Ganley I.G., Lam du H., Wang J., Ding X., Chen S., Jiang X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284: 12297–12305.
47. Garcia-Prat L., Martinez-Vicente M., Perdiguero E., Ortet L., Rodriguez-Ubreva J., Rebollo E., Ruiz-Bonilla V., Gutarra S., Ballestar E., Serrano A.L., Sandri M., Muñoz-Canoves P. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016; 529: 37-42.
48. Geisler S., Holmstrom K. M., Skujat D., Fiesel F. C., Rothfuss O. C., Kahle P. J., Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.*, 2010; 12: 119-131.
49. Gewirtz D.A. Autophagy and senescence. A partnership in search of definition. *Autophagy*, 2013; 9(5): 1–5.
50. Goehle R.W., Di X., Sharma K., Bristol M.L., Henderson S.C., Valerie K., Rodier F., Davalos A.R., Gewirtz D.A. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 343(3): 763-778.
51. Gottlob K., Majewski N., Kennedy S., Kandel E., Robey R.B., Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* 2001; 15: 1406 – 1418.
52. Gu J., Hu W., Song Z.P., Chen Y.G., Zhang D.D., Wang C.Q. Rapamycin Inhibits Cardiac Hypertrophy by Promoting Autophagy via the MEK/ERK/Beclin-1 Pathway. *Front Physiol.*, 2016;
53. Guertin D.A., Sabatini D.M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12: 9 – 20.
54. Guo J.Y., Chen H., Mathew R., Fan J., Strohecker A.M., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst J.J., Chen G., Lemons J.M.S, Karantza V., Coller H.A., Dipaola

- R.S., Gelinas C. Rabinowitz J.D., White E.. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes&Development*, 2011, 25:460-470.
55. Guo J.Y., White E. Autophagy is required for mitochondrial function, lipid metabolism, growth, and fate of KRAS(G12D)-driven lung tumors. *Autophagy*. 2013; 9:1636–38.
56. Guo J.Y., Teng X., Laddha S.V., Ma S., Van Nostrand S.C., Yang Y., Khor S., Chan C.S., Rabinowitz J.D., White E. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev*. 2016; 30(15): 1704 – 1717.
57. Guo B., Tam A., Santi S.A., Parissenti A.M. Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. *BMC Cancer*, 2016; 16:762.
58. Hailey D.W., Rambold A.S., Satpute-Krishnan P., Mitra K., Sougrat R., Kim P.K., Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010; 141:656–667.
59. Hanada T., Noda N.N., Satomi Y., Ichimura Y., Fujioka Y., Takao T., Inagaki F., Ohsumi, Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem*. 282: 37298–37302.
60. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
61. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646 – 674.
62. Hayflick L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res*. 37: 614 – 636.
63. Hemann M.T., Lowe S.W. The p53–Bcl-2 connection. *Cell Death Differ*. 2006; 13(8): 1256–1259.
64. Herranz N., Gallage S., Mellone M., Wuesterfeld T., Klotz S., Hanley C.J., Raguz S., Acosta J.C., Innes A.J., Banito A., Georgilis A., Montoya A., Wolter K., Dharmalingam G., Faull P., Carroll T., Martínez-Barbera J.P., Cutillas P., Reisinger F., Heikenwalder M., Miller R.A., Withers D., Zender

- L., Thomas G.J., Gil J. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature Cell Biology*. 2015; 17(9):1205 – 1217.
65. Hewitt G., Carroll B., Sarallah L., Correia-Melo C., Ogrodnik M., Nelson G., Otten E.G., Manni D., Antrobus R., Morgan B.A., von Zglinicki T., Jurk D., Seluanov A., Gorbunova V., Johansen T., Passos J.F., Korolchuk V.I. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 2016; 12(10):1917-1930.
66. Hosokawa N., Hara T., Kaizuka T., Kishi C., Takamura A., Miura Y., Iemura S., Natsume T., Takehana K., Yamada N., Guan J.L., Oshiro N., Mizushima N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20: 1981–1991.
67. Itakura E., Kishi C., Inoue K., Mizushima N. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19: 5360–5372.
68. Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M.A., Hall A., Hall M.N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 2004; 6(11): 1122 – 1128.
69. Janes M.R., Fruman D.A. Targeting TOR dependence in cancer. *Oncotarget* 2010; 1(1): 69 – 76.
70. Janku F., McConkey D.J., Hong D.S., Kurzrock R. 2011. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* doi:10.1038.
71. Jin S.M., Youle R.J. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 2012; 125, 795–799.
72. Johansen T., Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 2011; 7(3): 279 – 296.
73. Jones R.G., Thompson C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009; 23 (5): 537 - 548.

74. Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20: 1992–2003.
75. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19: 5720–5728.
76. Kang H.T., Lee K.B., Kim S.Y., Choi H.R., Park S.C. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One.* 2011; 6:e23367.
77. Katsuragi Y., Ichimura Y., Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal*, 2015; 282: 4672–4678.
78. Kiessling M.K., Rogler G. Targeting the Ras pathway by mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Swiss Med Wkly*, 2015; Dec 21;145:w14207. doi: 10.4414/smw.2015.14207. eCollection 2015.
79. Kim M., Woo S., Yoon C., Lee J., An S., Choi Y., Hwang S., Yoon G., Lee S. Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-induced Malignant Cell Transformation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2011; 286 (15): 12924–12932.
80. Kimmelman A.C. Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(8): 1828–1834.
81. Kimmelman A.C., White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*, 2017; 25: 1037 – 1043.
82. Kohn A.D., Summers S.A., Birnbaum M.J., Roth R.A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 1996; 271: 31372 – 31378
83. Komatsu M., Waguri S., Koike M., Sou Y.S., Ueno T., Hara T., Mizushima N., Iwata J., Ezaki J., Murata S., Hamazaki J., Nishito Y., Iemura S., Natsume

- T., Yanagawa T., Uwayama J., Warabi E., Yoshida H., Ishii T., Kobayashi A., Yamamoto M., Yue Z., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131: 1149–1163.
84. Komatsu M., Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS letters*, 2010; 584: 1374 – 1378.
85. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000; 19(21): 5720 – 5728.
86. Karantza-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O., Chen G., Mathew R., Jin S., White E. 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21: 1621–1635.
87. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239 – 257.
88. Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 2011, 13, 132–141.
89. Kim M.J., Woo S.J., Yoon C.H., Lee J.S., An S., Choi Y.H., Hwang S.G., Yoon G., Lee S.J. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J Biol Chem.* 2011; 286: 12924 – 12932.
90. Kimura S., Noda T., Yoshimori T. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *Autophagy*, 2007; 3(5): 452-460.
91. Kolesnichenko M., Hong L., Liao R., Vogt P.K., Sun P. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell Cycle*, 2012; 11(12): 2391-2401
92. Korolchuk V.I., Saiki S., Lichtenberg M., Siddiqi F.H., Roberts E.A., Imarisio S., Jahreiss L., Sarkar S., Futter M., Menzies F.M., O’Kane C.J.,

- Deretic V., Rubinsztein D.C. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(4):453-60.
93. Kroemer G., Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9 (12): 1004–1010.
94. Laberge R.M., Sun Y., Orjalo A., Patil C.K., Freund A., Zhou L., Curran S.C., Davalos A.R., Wilson-Edell K.A., Liu S., Limbad C., Demaria M., Li P., Hubbard G.B., Ikeno Y., Javors M., Desprez P.Y., Benz C.C., Kapahi P., Nelson P.S., Campisi J. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(8): 1049 – 1061.
95. Lawrence M.S., Stojanov P., Mermel C.H., Garraway L.A., Golub T.R., Meyerson M., Gabriel S.B., Lander E.S., Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types. *Nature*, 2014; 505 (7484): 495 – 501.
96. Lee J.W., Park S., Takahashi Y., Wang H.G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One.* 2010; 5 (11): e15394.
97. Levine A.J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 1997; 88(3): 323 – 331.
98. Levine B., Klionsky D.J. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell*, 2004; 6: 463–477.
99. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 2008; 132: 27 – 42.
100. Levine B., Mizushima N., Virgin H.V. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011; 469(7330): 323–335.
101. Li L., Zhao G.D., Shi Z., Qi L.L., Zhou L.Y., Fu Z.X. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett.* 2016; 12(5): 3045–3050.
102. Li Y.J., Lei Y.H., Yao N., Wang C., Hu N., Ye W., Zhang D., Chen Z. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*, 2017; 36:52.

103. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol* 2013;4(1):1-26.
104. Lin H.J., Eviner V., Prendergast G.C., White E. Activated H-Ras rescues E1A-induced apoptosis and cooperates with E1A to overcome p53-dependent growth arrest. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(8): 4536 – 4544.
105. Liu Y., Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 2015; 22: 367–376.
106. Lock R., Kenific C.M., Leidal A.M., Salas E., Debnath J. Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov*. 2014;4(4):466–479.
107. López-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013; 153: 1194 – 1217.
108. Lorenz V., Hessenkemper W., Rödiger J., Kyrlylenko S., Kraft F., Baniahmad A. Sodium butyrate induces cellular senescence in neuroblastoma and prostate cancer cells. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2011; 7(1): 265 – 272.
109. Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pandolfi P.P. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by ERK: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 2005; 121: 179 – 193.
110. Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C. 2016. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int J Mol Sci* 17(1): pii: E102.
111. Maiese K., Chong Z.Z., Shang Y.C., Wang S. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 51–60.
112. Marcotte R., Lacelle C., Wang E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125: 777 – 783.
113. Mariño G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014; 15(2):81-94.

114. Martinez-Lopez N., Singh R. ATGs. Scaffolds for MAPK/ERK signaling. *Autophagy*, 2014; 10(3): 535 – 537.
115. Matallanas D., V. Sanz-Moreno I. Arozarena F. Calvo L. Agudo-Ibanez E. Santos M. T. Berciano P. Crespo. Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26:100–116.
116. Mathew R., Kongara S., Beaudoin B., Karp C.M., Bray K., Degenhardt K., Chen G., Jin S., White E. 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 21: 1367–1381.
117. Mathew R., Karp C.M., Beaudoin B., Vuong N., Chen G., Chen H.Y., Bray K., Reddy A., Bhanot G., Gelinas C., Dipaola R.S., Karantza-Wadsworth V., White E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137: 1062–1075.
118. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chapell W.H., Abrams L.S., Wong E.W.T., Chang F., Lehmann B., Terrian D.M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A.M., Franklin R.A. Roles of Ras/Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(8): 1263–1284.
119. McDermott E.P., O’Neill L.A.J. Ras Participates in the Activation of p38 MAPK by Interleukin-1 by Associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2002; 277(10): 7808 – 7815.
120. Mizushima N., Yamamoto A., Hatano M., Kobayashi Y., Kabeya Y., Suzuki K., Tokuhiisa T., Ohsumi Y., Yoshimori, T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 2001; 152: 657–668.
121. Mizushima N., Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice

- expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of Cell*, 2004; 15: 1101 – 1111
122. Monick M.M., Powers L.S., Barrett C.W., Hinde S., Ashare A., Groskreutz D.J., Nyunoya T., Coleman M., Spitz D.R., Hunninghake G.W. Constitutive ERK MAP Kinase Activity Regulates Macrophage ATP Production and Mitochondrial Integrity. *J Immunol*. 2008; 180(11): 7485–7496.
123. Morgan M.J., Gamez G., Menke C., Hernandez A., Thorburn J., Gidan F., Staskiewicz L., Morgan S., Cummings C., Maycotte P., Thorburn A. Regulation of autophagy and chloroquine sensitivity by oncogenic RAS in vitro is context-dependent. *Autophagy*. 2014; 10(10): 1814 – 1826.
124. Morita M., Prudent J., Basu K., Goyon V., Katsumura S., Hulea L., Pearl D., Siddiqui N., Strack S., McGuirk S., St-Pierre J., Larsson O., Topisirovic I., Vali H., McBride HM., Bergeron J.J., Sonenberg N. mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Molecular Cell* 2017, 67: 1–14.
125. Nagano T., Nakashima A., Onishi K., Kawai K., Awai Y., Kinugasa M., Iwasaki T., Kikkawa U., Kamada S. Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*. (2017); 130: 1413-1420. <https://doi.org/10.1242/jcs.196469>
126. Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 2007; 130: 165–178.
127. Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., Lowe S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703–716.
128. Narita M., Young A.R., Arakawa S., Samarajiwa S.A., Nakashima T., Yoshida S., Hong S., Berry L.S., Reichelt S., Ferreira M., Tavaré S., Inoki K., Shimizu S., Narita M. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science*. 2011; 332(6032):966 – 970.

129. Neff F., Flores-Dominguez z., Ryan D.P., Horsch M., Schröder S., Adler T., Afonso L.C., Aguilar-Pimentel J.A., Becker L., Garrett L., Hans W., Hettich M.M., Holtmeier R., Hölter S.M., Moreth K., Prehn C., Puk O., Racz I., Rathkolb B., Rozman J., Naton B., Ordemann R., Adamski J., Beckers J., Bekeredjian R., Busch D.H., Ehninger J., Graw J., Höfler H., Klingenspor M., Klopstock T., Ollert M., Stypmann J., Wolf E., Wurst W., Zimmer A., Fuchs H., Gailus-Durner V., de Angelis M.H., Ehninger D. 2013. Rapamycin extends lifespan but has limited effects on aging. *The Journal of Clinical Investigation* 123(8): 3272 – 3291.
130. Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, et al. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle*. 2007; (17): 2171 - 2177.
131. Pagès G., Guerin S., Grall D., Bonino F., Smith A., Anjuere F., Auberger P., Pouyssegur J. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999, 286:1374-1377.
132. Pages G., Pouyssegur J. Study of MAPK signaling using knockout mice. *Methods Mol Biol* 2004, 250:155-166.
133. Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 2001; 22(2): 153–183.
134. Pérez-Mancera P.A., Young A.R., Narita M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(8): 547 - 558.
135. Perez-Neut M., Haar L., Rao V., Santha S., Lansu K., Rana B., Jones W.K., Gentile S. Autophagy mediates tumor suppression via cellular senescence. *Oncotarget*. 2016; 7(16): 21991 – 21004.
136. Populo H., Lopes J.M., Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2012, 13, 1886-1918.

137. Pospelova T.V., Demidenko Z.N., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Gudkov A.V., Blagosklonny M.V. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*, 2009; 8(24): 1-7.
138. Pospelova T.V., Leontieva O.V., Bykova T.V., Zubova S.G., Pospelov V.A., Blagosklonny M.V. Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle*, 2012; 11(12): 1-6.
139. Prior R.A., Hancock J.F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signaling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012; 23: 145 – 153.
140. Qu X., Yu J., Bhagat G., Furuya N., Hibshoosh H., Troxel A., Rosen J., Eskelinen E.L., Mizushima N., Ohsumi Y., Cattoretti G., Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 2003; 112, 1809–1820.
141. Rabanal-Ruiz Y., Korolchuk V.I. mTORC1 and Nutrient Homeostasis: The Central Role of the Lysosome. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19, 818.
142. Rajalingam K., Schreck R., Rapp U.R., Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007; 1773: 1177–1195.
143. Ramanathan A., Schreiber S.L. Direct control of mitochondrial function by mTOR. *PNAS*, 2009; 106 (52): 22229–22232.
144. Rasola A., Sciacovelli M., Chiara F., Pantic B., Brusilow W.S., Bernardi P. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *PNAS*, 2010; 107 (2): 726 – 731.
145. Ravikumar B., Moreau K., Jahreiss L., Puri C., Rubinsztein D.C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol.* 2010; 12:747–757.
146. Riwanto R., Kapoor S., Rodriguez D., Edenhofer I., Segerer S., Wüthrich R.P. Inhibition of aerobic glycolysis attenuates disease progression in polycystic kidney disease. *PLoS One.* 2016; e0146654.
147. Rodier F., Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.*, 2011; 192 (4): 547–556.

148. Rosseau A., Bertolotti A. An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature*, 2016; 536(7615): 184–189. doi:10.1038/nature18943.
149. Sanders Y.Y, Liu H., Zhang X., Hecker L., Bernard K., Desai L., Liu G., Thannickal V.J. Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol.* 2013; 1: 8 – 16.
150. Sanduja S., Feng Y., Mathis R.A, Sokol E.S., Reinhardt F., Halaban R., Gupta P.B. AMPK promotes tolerance to Ras pathway inhibition by activating autophagy. *Oncogene*, 2016; doi: 10.1038/onc.2016.70. [Epub ahead of print].
151. Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 596 – 603.
152. Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712): 1098 – 1101.
153. Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. 2010. Regulation of mTOR Complex 1 by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell* 40: 310 – 322.
154. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. 1997. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4A}. *Cell*. 88: 593 – 602.
155. Serrano M. Senescence Helps Regeneration. *Developmental Cell*, 2014; 31:
156. Settembre C., Zoncu R., Medina D.L., Vetrini F., Erdin S., Erdin S.U., Hyunh T., Ferron M., Karsenty G., Vellard M.C., Facchinetti V., Sabatini D.M., Ballabio A. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 2012; 31(5): 1095 – 1108.
157. Settembre C., Fraidai A., Medina D.L., Ballabio A. Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(5): 283–296.

158. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 2015; 22: 526–539. doi:10.1038/cdd.2014.216
159. Shapiro H.M. 1988. *Practical flow cytometry*. New York: Alan R. Liss, Inc. 353 p.
160. Shen K., Sabatini D.M. Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(38): 9545-9550.
161. Shinojima N., Yokoyama T., Kondo Y., Kondo S. Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy*, 2007; 3(6): 635 – 637.
162. Sun J., Shen Q., Lu H., Jiang Z., Xu W., Feng L., Li L., Wang X., Cai X., Jin H. Oncogenic Ras suppresses ING4-TDG-Fas axis to promote apoptosis resistance. *Oncotarget* 2015, 6(39): 41997 – 42007.
163. Szalai P., Hagen L.K., Sætre F., Luhr M., Sponheim M., Øverbye A., Mills I.G., Seglen P.O., Engedal N. Autophagic bulk sequestration of cytosolic cargo is independent of LC3, but requires GABARAPs. *Exp cell Res.*, 2015; 333(1):21-38.
164. Tamura Y., Simizu S., Osada H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Letters*, 2004; 569: 249–255.
165. Tao L., Zhang L., Xiu D., Yuan C., Ma Z., Jiang B. Prognostic significance of K-Ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*, 2016; 14: 146.
166. Temraz S., Mukherji D., Shamseddine A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16 (9): 22976-22988;
167. Valente E.M., Abou-Sleiman P.M., Caputo V., Muqit M.M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A. R., Healy D. G. Albanese A., Nussbaum R., González-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks

- W.P., Latchman D.S., Harvey R.J., Dallapiccola B., Auburger G., Wood N.W. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304, 1158-1160.
168. Vantaggiato C., Formentini I., Bondanza A., Bonini C., Naldini L., Brambilla R. 2006. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differently. *Journal of Biology* 5(14): 1 – 15.
169. Vessoni A.T., Filippi-Chiela E.C., Menck C.F.M., Lenz G. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death and Differentiation*, 2013; 20, 1444–1454
170. Verschoor M.L., Wilson L.A., Verschoor C.P., Singh G. Ets-1 regulates energy metabolism in cancer cells. *PLoS One*. 2010; 5(10): e13565.
171. Villanueva J., Yung Y., Walker J.L., Assoian R.K. ERK Activity and G1 Phase Progression: Identifying Dispensable Versus Essential Activities and Primary Versus Secondary Targets. *Molecular Biology of the Cell*, 2007; 18: 1457 – 1463.
172. Vousden K.H., Lane D.P. p53 in health and disease. *Molecular Cell Biology*, 2007; 8: 275 – 283.
173. Wang S., Tsun Z., Wolfson R., Shen K., Wyant G.A., Plovanich M.E., Yuan E.D., Jones T.D., Chantranupong L., Comb W., Wang T., Bar-Peled L., Zoncu R., Straub C., Kim C., Park J., Sabatini B.L., Sabatini D.M. The amino acid transporter SLC38A9 is a key component of a lysosomal membrane complex that signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. 2015; 347(6218): 188–194
174. Warburg O.H. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable). 1930
175. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123, 309–314.
176. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 1956; 124, 269–270.

177. Weber J.D., Raben D.M., Phillips P.J., Baldassare J.J. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J*, 1997; 326(Pt. 1): 61 – 68.
178. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G.M., Budinger G.R., Chandel N.S. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010; 107: 8788–8793.
179. Wiley C.D., Vekarde M.C., Lecot P., Liu S., Sarnoski E.A., Freund A., Shirakawa K., Lim H.W., Davis S.S., Ramanathan A., Gerencser A.A., Verdin E., Campisi J. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 2016; 23(2): 303–314.
180. Wu R.F., Ma Z., Liu Z., Terada L.S. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(14): 3553 – 3568.
181. Wu J.J., Liu J., Chen E.B., Wang J.J., Cao L., Narayan N., Fergusson M.M., Rovira I.I., Allen M., Springer D.A., Lago C.U., Zhang S., DuBois W., Ward T., deCabo R., Gavrilova O., Mock B., Finkel T. 2013. Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Reports* 4: 1 – 8.
182. Yamada T., Amann J.A., Tanimoto A., Taniguchi H., Shukuya T., Timmers C., Yano S., Shilo K., Carbone D.P. Histone deacetylase inhibition enhances the antitumor activity of a MEK inhibitor in lung cancer cells harboring RAS mutations. *Mol. Cancer Ther.*, 2018; 17(1): 17 – 25.
183. Yang W., Zheng Y., Xia Y., Ji H., Chen X., Guo F., Lyssiotis C.A., Aldape K., Cantley L.C., Lu Z. ERK1,2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol.* 2012; 14(12): 1295–1304.
184. Yao Y., Li W., Wu J., Germann U.A., Su M.S., Kuida K., Boucher D.M. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:12759-12764.

185. Yip C.K., Murata K., Walz T., Sabatini D.M., Kang S.A. Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Molecular Cell*, 2010; 38: 768–774. DOI 10.1016/j.molcel.2010.05.017.
186. Yoo B.H., Wu X., Li Y., Haniff M., Sasazuki T., Shirasawa S., Eskelinen E., Rosen K.V. Oncogenic ras-induced Down-regulation of Autophagy Mediator Beclin-1 Is Required for Malignant Transformation of Intestinal Epithelial Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2010; 285 (8): 5438–5449.
187. Yoon S., Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24: 21–44.
188. Young A.R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F., Tavares S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F.M., Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009; 23(7): 798 – 803.
189. Young A.R., Narita M., Narita M. Spatio-temporal association between mTOR and autophagy during cellular senescence. *Autophagy*. 2011; 7(11):1387 – 1388.
190. Young M.M., Takahashi Y., Khan O., Park S., Hori T., Yun J., Sharma A.K, Amin S, Hu CD, Zhang J, Kester M, Wang HG. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex(iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287(15): 12455 – 12468.
191. Yuan R., Kay A., Berg W.J., Lebowitz D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2009; 2:45.
192. Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A. J., Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100, 15077–15082.

193. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. *Cell* 1996; 87: 589–592.
194. Zhang C.S., Jiang B., Li M., Zhu M., Peng Y., Zhang Y.L., Wu Y.Q., Li T.Y., Liang Y., Lu Z., Lian G., Liu Q., Guo H., Yin Z., Ye Z., Han J., Wu J.W., Yin H., Lin S.U., Lin S.C. The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metabolism*, 2014; 20: 526–540
195. Zhao J., Goldberg L.A. Coordinate regulation of autophagy and the ubiquitin proteasome system by MTOR. *Autophagy*, 2016; 12(10): 1967 – 1970.
196. Zoncu R., Sabatini D.M., Efeyan A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2011; 12(1): 21–35. doi:10.1038/nrm3025
197. Zong W.X., Rabinowitz J.D., White E. Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*, 2016; 61: 667 – 676.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение автор хотела бы высказать благодарность всем тем, без кого написание этой диссертации было бы невозможно:

Хочу поблагодарить моего научного руководителя Пospelову Татьяну Викторовну за мудрое руководство, поддержку и бесконечное терпение в работе с мной;

Заведующего лабораторией МОДК Пospelова Валерия Анатольевича за помощь и руководство в работе;

Галину Ивановну Блинову, Свету Зубову и Татьяну Вадимовну Быкову за помощь в экспериментах и освоении методик и моральную поддержку;

Иру Суворову, Жанну Шитикову, Богдана Григораша, Алену Гнедину, Марию Вачеславовну Иготти, Кукушкина Александра Николаевича, Светликову Светлану Борисовну, Толкунову Елену Николаевну, Сергея Кошкина за доброжелательность, помощь в освоении методик и поддержку;

Демидова Олега Николаевича за предоставленные эмбриональные фибробласты мыши, обучение некоторым методикам и многочисленные советы, и помощь в научной работе;

Мартынову Марину Георгиевну и Быстрову Ольгу Алексеевну за плодотворное сотрудничество;

Аксенова Николая Дмитриевича и Талецкого Сергея Николаевича, а также Михаила Воробьева и Штейна Григория Израильевича за оперирование приборами, на которых была получена часть экспериментальных данных;

Моих папу и маму, сестер Наташу и Надежду, а также друзей за веру и поддержку.