

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie



eIF4E a jeho role v regulaci iniciace translace  
u kvasinek

Denisa Kovářová

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

V Praze 2007



Prohlašuji, že tuto práci jsem napsala sama, pouze na základě níže uvedené literatury a rad udělených mým školitelem.

Praha, 28. 4. 2007

.....  
Denisa Kovářová

## Abstrakt :

Eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E) je esenciální protein, který ukotvuje mRNA vazebný komplex eIF4F k 5' konci mRNA, kde se u všech eukaryotních mRNA (kromě organelových) nachází čepičková struktura, která je nezbytná pro tzv. na čepičce závislou iniciaci translace. eIF4E je součástí komplexu, který je dále tvořen eIF4G a eIF4A proteinem. Interakce eIF4E s eIF4G zvyšuje jeho afinitu k čepičce.

Protože je eIF4E zodpovědný za tak významný krok, jako formování iniciačního komplexu, není překvapivé, že je důležitým cílem regulace genové exprese u eukaryot. Transkripční aktivátor c-Myc reguluje eIF4E hladinu prostřednictvím interakce s E-boxy na eIF4E promotoru. Dále je jeho aktivita kontrolována fosforylací, která zvyšuje afinitu eIF4E k čepičce a stimuluje tak translaci *in vivo*. Naopak aktivita eIF4E je inhibována eIF4E vazebnými proteiny (4E-BP), jako je kvasinkový p20. Tyto negativní regulátory blokují interakci eIF4E s eIF4G, a tak brání sestavení eIF4F komplexu.

Tato práce se také zabývá významnými mutacemi na eIF4E, které ovlivňují jeho afinitu k ligandům a někdy dokonce vedou ke vzniku termosenzitivního fenotypu.

**Klíčová slova:** eIF4E, kontrola translace, eIF4F komplex, 4E-BP, m7GpppX čepičková struktura, eIF4G, Caf20p, Eap1p

## Abstract:

The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) is an essential protein that anchors the mRNA cap-binding complex (eIF4F) to the 5' end of mRNAs, where all eukaryotic (except organellar) mRNA possess a cap structure which is required for cap-dependent translation. eIF4E is a component of the eIF4F complex, which also includes eIF4G and eIF4A. The interaction of eIF4E with eIF4G enhances the affinity of eIF4E for the cap structure.

eIF4E is responsible for assembly of a functional translation initiation complex. Given pivotal role of eIF4E in translation, it is not surprising that it is an important target for gene expression control in eukaryotes. The transcriptional activator c-Myc regulates eIF4E levels via interactions with E-boxes in the eIF4E gene promoter. eIF4E is also regulated by phosphorylation, which increases its affinity for mRNA caps, thereby stimulating translation initiation *in vivo*. Conversely, eIF4E activity is suppressed by eIF4E binding proteins (4E-BPs), such as yeast p20. Therefore, the 4E-BPs repress cap-dependent translation by inhibiting assembly of the eIF4F complex.

This work also presents important mutations in residues of eIF4E, which modulate its affinity for ligands. These mutants can confer a temperature-sensitive phenotype.

**Keywords:** eIF4E, translation control, eIF4F complex, 4E-BP, m7GpppX cap structure, eIF4G, Caf20p, Eap1p

## Obsah:

Seznam zkratk: .....	5
1. Úvod .....	6
2. Úloha eIF4E proteinu v translaci .....	6
2.1. Iniciace translace .....	6
2.2. Na čepičce závislá iniciace translace .....	7
2.3. eIF4F komplex.....	8
3. Struktura a vazebná místa na eIF4E proteinu .....	9
3.1. Funkce a struktura eIF4E .....	9
3.2. Interakce eIF4E s 5' koncem mRNA .....	10
3.3. Vazba eIF4E s eIF4G proteinem.....	13
3.4. Vliv S4-H4 smyčky eIF4E proteinu na vazebnou afinitu k ligandům.....	14
4. Regulace eIF4E .....	16
Závěr:.....	19
Seznam použité literatury:.....	20

## Seznam zkratek:

4E-BP	eIF4E vazebný protein
bp	pár bází
CDK28	cyklin-dependentní kináza 28
Da	Dalton
eIF4E	eukaryotický iniciační faktor 4E
eIF4G	eukaryotický iniciační faktor gama
GAP	GTPázu aktivující protein
GMP	guanosin-5'-monofosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
IRES	interní vazebné místo pro ribozóm
kDa	1000 Da
m7G	7-methylguanosin
m7GDP	7-methylguanosin-5'-difosfát
m7GTP	7-methylguanosin-5'-trifosfát
Mnk1	“Map kinase signal integrating kinase 1“, substrát MAP kinázy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
pre-mRNA	prekurzorová mediátorová ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UTR	nepřekládaná oblast
wt	divoký typ

## SEZNAM ZKRATEK AMINOKYSELIN:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparagová kys.	Asp	D
Asparagin nebo asparagová kys.	Asx	B
Cystein	Cys	C
Fenylalanin	Phe	F
Glutamin	Gln	Q
Glutamová kys.	Glu	E
Glutamin nebo glutamová kys.	Glx	Z
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 1. Úvod

Eukaryotní mRNA translace je komplikovaný proces zahrnující vytvoření velkého komplexu složeného z proteinů a RNA, který vede ribozóm k iniciačnímu kodónu.

Příklady kontroly translace lze nalézt na různých stupních translace, mezi které patří rychlá a efektivní regulace na úrovni iniciace translace. Na této regulaci se podílí zejména eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E) rozeznávající m<sup>7</sup>GpppX čepičkovou strukturu na 5' konci mRNA.

Tento iniciační faktor o molekulové hmotnosti cca 25kDa je součástí heterotrimerního komplexu eIF4F (Marcotrigiano *et al.* 1997).

eIF4E je esenciální protein, který je konzervovaný od jednobuněčných eukaryot, přes rostliny, dvoukřídly hmyz až po savce. Dokonce savčí eIF4E může nahradit kvasinkový faktor *in vivo* a stát se součástí proteosyntetického aparátu *S. cerevisiae*. Tato skutečnost odpovídá i faktu, že mechanismus rozeznávání mRNA translačním aparátem je v průběhu evoluce konzervovaný (Altmann *et al.* 1989).

Dostupnost eIF4E pro sestavení eIF4F komplexu je považována za faktor limitující navázání ribozómu, a je tak důležitým cílem regulace translace (Sonenberg a Gingras 1998). Jeho aktivita je kontrolována řadou mechanismů, jako je například malý eIF4E vazebný protein (eIF4E-BP), který blokuje vazbu mezi eIF4E a eIF4G, brání tak složení eIF4F komplexu a inhibuje syntézu proteinů (Gingras *et al.* 2001).

U lidského eIF4E bylo prokázáno, že na jeho dorzální povrch se váže mnoho regulačních molekul včetně více než 200 homeoproteinů, které ovlivňují jaderné a cytoplazmatické aktivity eIF4E (Topisirovic *et al.* 2003).

eIF4E proteinu se věnuje řada studií zejména poté, co byla prokázána jeho zvýšená hladina exprese v nádorových buňkách. Navzdory faktu že je to již více než 25 let, co byl tento iniciační faktor objeven, je zde stále mnoho nezodpovězených otázek kolem jeho biologické role (shrnuté von der Haar 2004).

## 2. Úloha eIF4E proteinu v translaci

### 2.1. Iniciace translace

U eukaryot jsou dvě možné cesty navázání malé ribozomální podjednotky na mRNA. Majoritní je na čepičce závislá iniciace translace. Je umožněna díky modifikaci eukaryotní mRNA, která na svém 5' konci nese čepičkovou strukturu m<sup>7</sup>GpppX, kde X je jakýkoliv nukleotid. Tato struktura slouží jako kotva pro komplex, který zprostředkovává navázání malé ribozomální podjednotky na 5' konec mRNA.

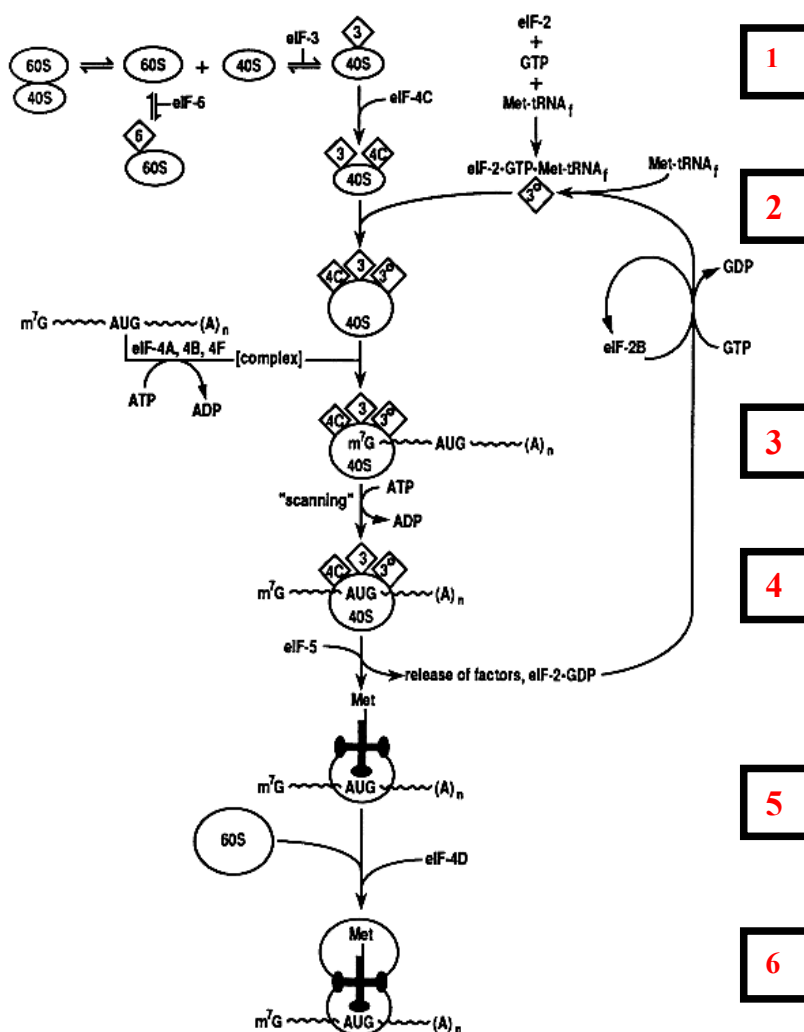
Druhá cesta využívá k navázání malé ribozomální podjednotky interní vazebná místa nazývaná IRES (internal ribosomal entry segments). Děje se tak buď přímým kontaktem RNA a ribozómu nebo prostřednictvím iniciačních faktorů, které váží jak IRES tak ribozóm. Iniciace touto cestou nespolehá na přítomnost čepičky na mRNA a označuje se jako iniciace na čepičce nezávislá (shrnuté von der Haar *et al.* 2004).

V této práci se budu dále věnovat na čepičce závislé translaci.

## 2.2. Na čepičce závislá iniciace translace

Eukaryotní mRNA kromě kódující sekvence nese na svém 5' i 3' konci nepřekládané oblasti, které určují účinnost translace. Na 5' konci se nachází čepička (viz níže) a na 3' konci poly(A) struktura dlouhá ~50 bp u kvasinek a více než 200 bp u vyšších eukaryot (Jacobson a Peltz 1996).

Eukaryotické iniciační faktory (eIF) ovlivňují různé kroky sestavení 48S preiniciačního komplexu (Obr. 1).



Obr. 1: Iniciace translace: krok 1 - vazba eIF3 a eIF1A na 40S ribozomální podjednotku  
 krok 2 - tvorba 43S preiniciačního komplexu  
 krok 3 - interakce preiniciačního komplexu s čepičkou  
 krok 4 - tvorba 48S preiniciačního komplexu na iniciačním kodónu  
 krok 5 - disociace iniciačních faktorů  
 krok 6 - tvorba 80S iniciačního komplexu (Merrick 1992)



Prvním krokem je disociace 80S ribozómu za účasti eIF6. Ten se váže na 60S ribozomální podjednotku, zatímco eIF3 a eIF1A se váží na 40S ribozomální podjednotku (Obr. 1 - krok 1).

Za pomoci eIF3, eIF1A, eIF5 a eIF1 dochází k připojení eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub> ternárního komplexu k 40S podjednotce a k tvorbě 43S preiniciačního komplexu (Obr. 1- krok 2).

43S komplex interaguje s 5' m<sup>7</sup>GTP strukturou, což vyžaduje další faktory - eIF4F komplex a hydrolýzu ATP (Obr. 1- krok 3). Tento krok je primární cíl kontroly translace (shrnutí Gingras *et al* 1999).

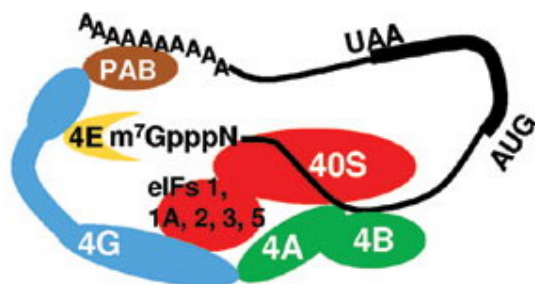
Protože je čepičková struktura lokalizovaná na 5' konci transkriptů, malá ribozomální podjednotka se váže na místo oddělené od iniciačního kodónu až několik set nukleotidů dlouhou nepřekládanou sekvencí 5'UTR (Altmann *et al.* 1987, shrnutí von der Haar *et al.* 2004).

Předpokládá se, že 43S komplex skenuje mRNA ve směru 5' - 3' než dosáhne iniciačního tripletu AUG. Na iniciačním kodónu je pak vytvořen 48S preiniciační komplex (Obr. 1 -krok 4).

Navázané iniciační faktory jsou uvolněny díky GAP proteinu eIF5, který umožňuje hydrolýzu GTP pomocí eIF2 (obr. 1-krok 5). eIF2-GDP je uvolněn z ribozómu a eIF5B umožní připojení 60S podjednotky k 40S-Met-tRNA-mRNA komplexu, oddisociování zbývajících iniciačních faktorů a vytvoření 80S iniciačního komplexu (Obr. 1 - krok 6).

### 2.3. eIF4F komplex

eIF4F se skládá z eIF4E, proteinu vázajícího se na čepičku, z eIF4A, který slouží jako RNA závislá ATPáza a RNA helikáza, a z eIF4G - velký polypeptid obsahující vazebná místa pro eIF4E, eIF4A a PABP (Obr. 2).



Obr. 2: eIF4F komplex - skládá se z eIF4E = protein vázající se na čepičku  
eIF4A = RNA závislá ATPáza a RNA helikáza  
eIF4G = protein interagující s eIF4E, eIF4A. Váže se i na polyA vazebný protein a přivádí tak regulační oblasti na 3'UTR do blízkosti 5' konce RNA. U savců dále interaguje s eIF3 proteinem (von der Haar *et al.* 2004)

Helikázová aktivita eIF4A je pravděpodobně vyžadovaná na rozvolnění sekundární struktury v 5'UTR mRNA, což vede ke snadnějšímu navázání 43S preiniciačního komplexu (shrnutí Gingras *et al.* 1999).

Savčí eIF4G obsahuje také vazebné místo pro eIF3, který se váže na malou ribozomální podjednotku a slouží jako kotva pro eIF4G a umožňuje tak snadnější složení 48S preiniciačního komplexu.

U *S.cerevisiae* nebyla interakce eIF3 a eIF4G prokázána a ani aminokyselinová sekvence kodující eIF3 vazebné místo u vyšších eukaryot nebyla nalezena u ani jedné ze dvou kvasinkových isoform eIF4G. eIF3-eIF4G interakce může být pravděpodobně nahrazená interakcí eIF5 s eIF4G proteinem (Jivotovskaya *et al.* 2005).

Předpokládá se, že při interakci eIF4G s poly(A)-vazebným proteinem (PABP), dochází k cirkularizaci mRNA. To přivádí 5' konec mRNA do blízkosti 3'UTR, kde se nachází většina známých regulačních sekvencí. Cirkularizace mRNA tedy umožní regulaci iniciace translace vazebnými faktory na 3'UTR a tak dochází k funkčnímu propojení mezi konci mRNA v průběhu translace (Gebauer a Hentze 2004).

### 3. Struktura a vazebná místa na eIF4E proteinu

#### 3.1. Funkce a struktura eIF4E

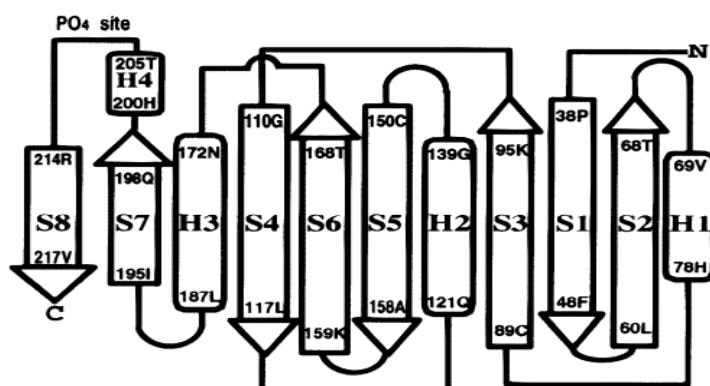
U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl gen kódující eIF4E identifikován jako gen zodpovědný za přechod buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu („cell division cycle gene“, *CDC33*) (Brenner *et al.* 1988, Danaie *et al.* 1999). Jedna z prvních událostí při přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu je nárůst exprese cyklinu 3, nestabilního proteinu, který je přítomný v malém množství v průběhu buněčného cyklu a který se hromadí v časně G1 fázi. V komplexu s CDK28 spouští kaskádu kináz a umožňuje vstup buňky do S fáze. *cdc33-1* termosenzitivní mutanty stejně tak jako *cdc33-42* obsahují eIF4E s nižší cap vazebnou aktivitou a jsou neschopny zajistit dostatečnou produkci Cln3p v nepermissivní teplotě 37°C. V C- koncové doméně se třikrát objevuje konzervativní motiv KXGGXKF a v jednom z nich se nachází i mutace *cdc33-1* (Obr. 3) (Altmann *et al.* 1989)

1	Met	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Lys	Phe	Glu	Glu	Asn	Val	Ser	Val	Asp	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Lys	Thr
	ATG	TCC	GTT	GAA	GAA	GTT	AGC	AAG	AAG	TTT	GAA	GAA	AAC	GTT	TCA	GTC	GAT	GAT	ACC	ACA	GCT	ACT	CCA	AAG	ACT
26	Val	Leu	Ser	Asp	Ser	Ala	His	Phe	Asp	Val	Lys	His	Pro	Leu	Asn	Thr	Lys	Trp <sup>43</sup>	Thr	Leu	Trp <sup>46</sup>	Tyr	Thr	Lys	Pro
	GTT	TTA	AGT	GAC	AGT	GCT	CAC	TTC	GAT	GTC	AAG	CAC	CCA	TTG	AAC	ACC	AAA	TGG	ACT	TTA	TGG	TAC	ACA	AAG	CCA
51	Ala	Val	Asp	Lys	Ser	Glu	Ser	Trp	Ser	Asp	Leu	Leu	Arg	Pro	Val	Thr	Ser	Phe	Gln	Thr	Val	Glu	Glu <sup>73</sup>	Phe	Trp <sup>75</sup>
	GCC	GTC	GAT	AAA	TCT	GAG	TCG	TGG	TCT	GAT	CTA	TTA	CGT	CCC	GTC	ACT	TCA	TTC	CAA	ACT	GTT	GAA	GAA	TTT	TGG
76	Ala	Ile	Ile	Gln	Asn	Ile	Pro	Glu	Pro	His <sup>85</sup>	Glu	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Asp	Tyr	His	Val	Phe	Arg	Asn	Asp	Val
	GCT	ATC	ATT	CAA	AAT	ATT	CCT	GAG	CCA	CAC	GAA	CTA	CCA	TTG	AAA	TCA	GAT	TAC	CAC	GTC	TTC	CGT	AAT	GAC	GTT
101	Arg	Pro	Glu <sup>103</sup>	Trp <sup>104</sup>	Glu	Asp	Glu	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Gly <sup>115</sup>	Lys	Trp <sup>116</sup>	Ser	Phe	Gln	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Ala	Asp
	AGA	CCT	GAA	TGG	GAA	GAT	GAA	GCC	AAT	GCT	AAA	GGT	GGT	AAA	TGG	TCT	TTC	CAA	CTT	AGA	GGA	AAA	GGT	GCT	GAT
126	Ile	Asp	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Thr	Leu	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Glu	Thr	Ile	Asp	Glu	Asp	Asp	Ser	Gln	Ile	Asn
	ATT	GAT	GAA	TTA	TGG	CTA	AGA	ACT	TTA	CTA	GCA	GTT	ATT	GGT	GAA	ACA	ATT	GAT	GAA	GAC	GAC	TCC	CAA	ATT	AAC
151	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Ile	Arg	Lys	Gly	Gly	Asn	Lys	Phe	Ala	Leu	Trp <sup>166</sup>	Thr	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Glu	Pro	Leu
	GGT	GTC	GTT	TTA	AGC	ATT	AGA	AAA	GGT	GGT	AAC	AAG	TTT	GCC	TTA	TGG	ACT	AAA	TCT	GAA	GAC	AAA	GAA	CCA	CTA
176	Leu	Arg	Ile	Gly <sup>179</sup>	Gly	Lys	Phe	Lys	Gln	Val	Leu	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	His	Leu	Glu	Phe	Phe	Pro	His	Ser
	TTG	AGA	ATT	GGT	GGT	AAA	TTC	AAG	CAA	GTT	TTA	AAA	TTA	ACC	GAT	GAC	GGG	CAT	TTG	GAA	TTC	TTT	CCA	CAT	TCC
201	Ser	Ala	Asn	Gly	Arg	His	Pro	Gln	Pro	Ser	Ile	Thr	Leu	***											
	AGT	GCC	AAT	GGT	AGA	CAC	CCT	CAA	CCA	TCA	ATC	ACC	TTG	TAA											

Obr. 3: DNA sekvence eIF4E genu. V C-koncové oblasti se nachází konzervované aminokyseliny, ohraničené v rámečkách. V těchto oblastech jsou lokalizovány mutace významně ovlivňující vazbu k čepičce. Substitute v tryptofanech 43, 46, 115, 166 leucinem drasticky snižuje vazbu k čepičce. Méně závažný efekt byl pozorován u dalších mutací tryptofanových zbytků a sousedních aminokyselin. *cdc33-1* kmen nese mutaci v Gly113 a *cdc33-42* v Glu73 a Gly179 (Altmann *et al.* 1989)

C-koncová oblast eIF4E je vysoce konzervovaná v počtu i pozici aminokyselin u kvasinkového a myšního eIF4E a všechny známé eIF4E sdílí v této oblasti stejnou prostorovou strukturu (Sander a Schneider 1991). Porovnání cdc33 mutací s jinými mutacemi ovlivňujícími funkci eIF4E dokazují, že regiony obsahující tryptofan a jim přilehlé oblasti se podílí na vazebné aktivitě eIF4E k čepičce. Substituce každého z pěti konzervovaných tryptofanů (43, 46, 115, 130, 166) leucinem drasticky snižuje vazbu k čepičkové struktuře (Morino *et al.* 1996). Podobný, avšak méně závažný efekt, byl pozorován také u substituce Trp46 nebo Trp130 fenylalaninem (Altmann *et al.* 1989), a dále substituce Gly113 → Asp v blízkosti Trp115 (Altmann a Trachsel 1989), stejně tak jako u substituce His200 → Ala (Morino *et al.* 1996). Substituce aminokyselin blízko tryptofanu 75 (Glu73 → Lys) a blízko tryptofanu 104 (Glu103-Lys, Gly179-Asp) také vede ke vzniku termosenzitivity (Obr. 3). To dokazuje, že ne pouze tryptofanové zbytky, ale také sousední aminokyseliny jsou důležité pro aktivitu eIF4E (Altmann a Trachsel 1989). Byly provedeny i další studie mutací, které ovlivňují afinitu eIF4E k ligandům (viz níže).

Obrázek 4 znázorňuje sekundární strukturu kvasinkového eIF4E. Ta je tvořena třemi dlouhými (H1-H3), jedním krátkým alfa helixem (H4) a osmi antiparalelními beta listy (S1-S8), poskládanými v pořadí S1-S2-H1-S3-S4-H2-S5-S6-H3-S7-H4-S8 (Marcotrigiano *et al.* 1997).



Obr. 4: Schematický náčrt sekundární struktury kvasinkového eIF4E. Obdélníky znázorňují alfa helixy H1-H4, šipky znázorňují beta-listy S1-S8 (Marcotrigiano *et al.* 1997).

### 3.2. Interakce eIF4E s 5' koncem mRNA

eIF4E se specificky váže na 5' konec mRNA, kde se nachází m<sup>7</sup>GpppX struktura nazývaná čepička (X je jakýkoliv nukleotid).

Čepička usnadňuje translaci většiny mRNA a je také důležitá v jiných procesech, jako je pre-mRNA sestřih, nukleocytoplazmatický transport malých jaderných RNA molekul a stabilita mRNA (Shatkin 1976, Varani 1997).

Modifikaci pre-mRNA m<sup>7</sup>G čepičkovou strukturou zajišťují 3 reakce katalyzované RNA trifosfatázou, RNA guanylyltransferázou a RNA (guanosin-N<sup>7</sup>)metyltransferázou. (Shibagaki *et al.* 1992, Shuman 1995).

Metylovaný guanosin čepičkové struktury obsazuje úzký žlábek tvořený konkávním povrchem složeným z beta listů, krátkého alfa helixu (H4) a smyčky mezi řetězci S1 a S2. Na

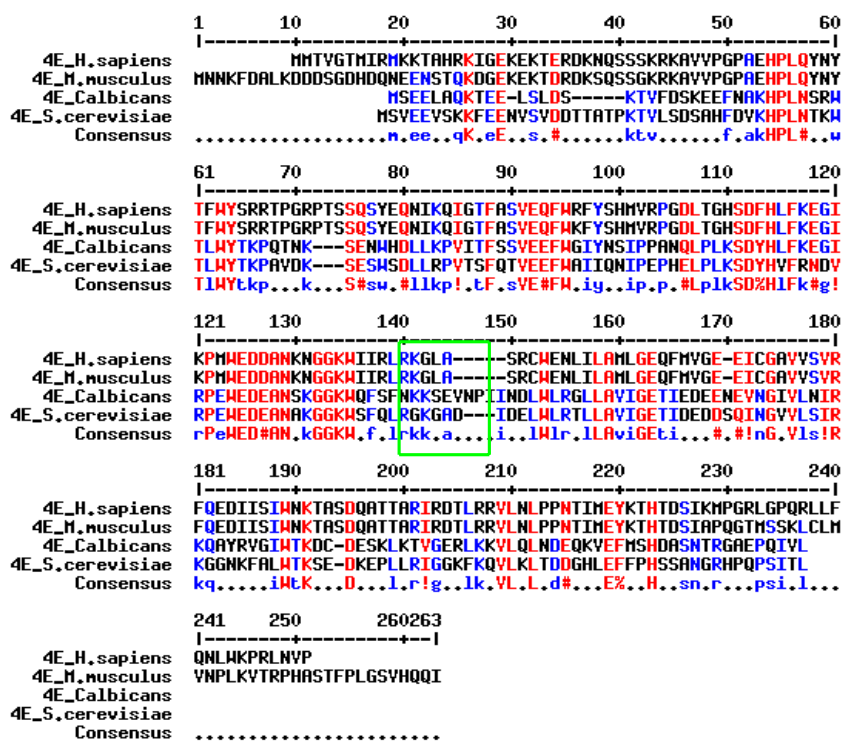
jedné straně je čepička uzavřená řetězci S3 a S4 a na druhé je otevřená (Obr.7) (Marcotrigiano *et al.* 1999).

Navázání m7G je zprostředkováno  $\pi$ - $\pi$  vazbou mezi metylovanou guaninovouází čepičky a indolovými kruhy dvou tryptofanů (Trp56 a Trp102 u lidského eIF4E, Trp58 a Trp104 u kvasinkového eIF4E). Mutace těchto dvou tryptofanů na leucin vede ke ztrátě vazebné afinity k čepičce (Morino *et al.* 1996), zatímco substituce Trp56→Phe a Trp102→Phe, která zachovává  $\pi$ -elektronový oblak, vazebnou afinitu pouze snižuje (Altmann *et al.* 1988). Vazba je ještě zesílena vodíkovými můstky mezi kyslíkovými atomy trifosfátu a polárními atomy zbytků Trp166 u savců a kvasinek a dále Glu103 u savců a Glu105 u kvasinkového eIF4E. K vazbě dále přispívají hydrofóbní a elektrostatické interakce (Marcotrigiano *et al.* 1997, Matsuo *et al.* 1997, Tomoo *et al.* 2003).

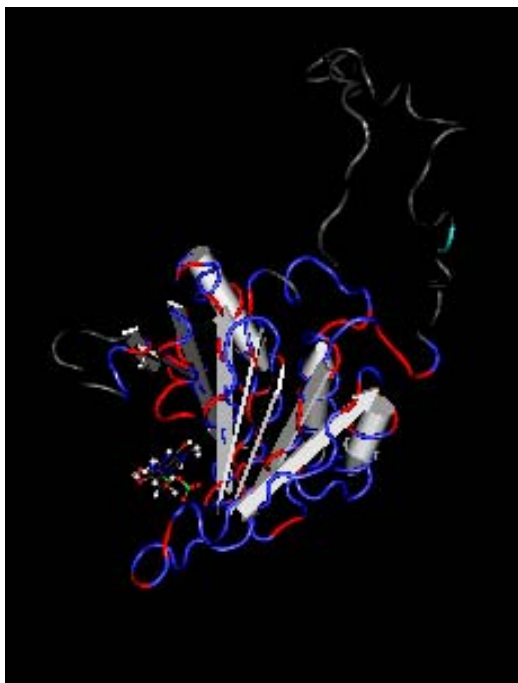
Významný stabilizující efekt má přítomnost metylových skupin na čepičce, které přinášejí pozitivní náboj a zesilují tak patrové interakce.

V kvasinkových buňkách je hladina GTP řádově v milimolárních hodnotách a účinné navázání nemetylovaného GTP by bránilo vazbě čepičky. Proto je preferenční vazba na metylovaný guanosin biologicky významná a umožňuje navázání čepičky i přes vysoké koncentrace GTP (von der Haar *et al.* 2004).

Všechny oblasti účastníci se vazby čepičkové struktury jsou konzervované od kvasinek k savcům. Přestože identita aminokyselinových sekvencí je mezi kvasinkami a savci 33%, myši eIF4E může nahradit kvasinkový eIF4E bez výraznějšího efektu na životnost, růst či dělení buňky (Altmann *et al.* 1989). Identita sekvencí je patrná zejména v oblastech účastnících se vazby čepičky (Obr. 5 a 6).



Obr.5: Barevně odlišená sekvenční podobnost eIF4E u *H.sapiens*, *M.musculus*, *C.albicans*, *S.cerevisiae*, červená barva značí 90% sekvenční podobnost, modře je vyznačená 50% sekvenční podobnost. V zeleném rámečku je ohraničena sekvence S4-H4 smyčky (kapitola 3.4.), která se výrazně liší u *C.albicans*. Tato smyčka významně ovlivňuje afinitu eIF4E k čepičce. Vytvořeno v programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)



Obr. 6: Na struktuře eIF4E u *S.cerevisiae* jsou červeně odlišená místa sekvenční identity s 4E faktorem u *H.sapiens* a *M.musculus*. Struktura eIF4E u *C. albicans* zatím není známá. Identita sekvencí je patrná v oblasti účastnící se vazby čepičky. Vytvořeno v programu „Multalin“ (Corpet 1988)

Způsob vazby čepičky je téměř stejný mezi lidským a myším eIF4E a předpokládá se, že tedy existuje jistý rozpoznávací mechanismus mezi čepičkovou strukturou a žlábkem na eIF4E pro navázání této struktury.

Stejně tak různé analogy čepičkové struktury - m7GDP, m7GTP, m7GpppA ukazují velice podobný způsob interakce. Vazbu samotné m7G části k eIF4E zesiluje přidání fosfátových skupin (Zuberek *et al.* 2004).

Bylo prokázáno, že m7Gppp fragment čepičkové struktury, který vyplňuje žlábek pro čepičku, je nezbytný pro stabilitu eIF4E, protože eIF4E bez navázané čepičky (apo forma eIF4E) může být lehce degradován proteázami (Tomoo *et al.* 2003).

Nedávné studie odhalily strukturní odlišnosti u eIF4E s navázanou čepičkou a apoformy eIF4E. Struktura apoformy se výrazně liší na vazebném povrchu pro čepičku zejména v tryptofanové oblasti a také pozitivně nabitý žlábek pro čepičkovou strukturu je rozvolněný. Změny jsou i na dorzální straně důležité pro vazbu eIF4G/4E-BP.

Studie lidského eIF4E prokázaly, že na těchto odlišnostech se podílí S4-H4 smyčka, která je vzdálená jak vazebnému místu pro čepičku tak vazebnému místu pro eIF4G. Překvapivě jednobodová mutace K119A v S4-H4 smyčce zvyšuje afinitu eIF4E k čepičce i k eIF4G (viz níže) (Volpon *et al.* 2006).

Původně byla S4-H4 smyčka označovaná jako S4-H2, ale dnes jsou ve struktuře lidského eIF4E známy další dva krátké alfa helixy. Kromě osmi beta listů (S1-S8) se zde taky nachází tři dlouhé alfa helixy (H2, H4, H5) a tři krátké jednoobrátkové alfa helixy (H1, H3, H6) (Spivak-Kroizman *et al.* 2002, Volpon *et al.* 2006).

### 3.3. Vazba eIF4E s eIF4G proteinem

eIF4E nese kromě vazebného místa pro čepičkovou strukturu i vazebné místo pro eIF4G protein, které se nachází v N-terminální části eIF4E. Toto místo je vzdálené žlábkou pro čepičku a neobsahuje žádné oblasti účastnící se vazby čepičky (von der Haar *et al.* 2004). Defektní eIF4G vazebné místo na eIF4E brání normální iniciaci translace (Ptushkina *et al.* 1998).

eIF4G obsahuje konzervovanou sekvenci, která se podílí na vazbě k eIF4E. Studie za použití delečních a místně specifické mutagenese prokázaly, že konsensus sekvence je YXXXXL $\phi$ , kde  $\phi$  je obvykle L, ale může být také M či F. Tento motiv je přítomný v kvasinkách, rostlinách i lidském eIF4G (Mader *et al.* 1995).

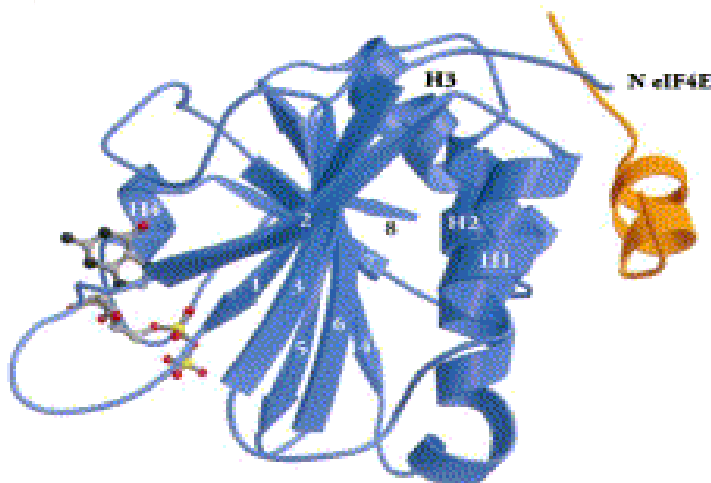
U *S. cerevisiae* jsou známy dvě verze eIF4G proteinu (eIF4G1 a 2), které se váží na eIF4E a na poly(A)vazebný protein (Pab1p).

Studie kvasinkového eIF4G1 peptidu (aminokyselinové zbytky 393-490) ukázaly, že se v roztoku nachází v nestrukturovaném stavu a skládá se pouze při kontaktu s eIF4E. Vytváří alfa helixy z nichž čtvrtý obsahuje konzervovaný motiv YXXXXL $\phi$  a společně s helixy 1, 2 a 5 formuje pravotočivý helikální kruh, který obtáčí N-konec eIF4E. Toto skládání zesiluje asociaci eIF4E s čepičkovou strukturou a je vyžadováno pro optimální růst buňky (Obr. 7) (Gross *et al.* 2003).

Ale i zde můžeme najít rozdíly mezi organismy. Sto aminokyselinových zbytků dlouhý eIF4G peptid zesiluje afinitu kvasinkového eIF4E k čepičkové struktuře desetinásobně (Ptushkina *et al.* 1999), kdežto studie s minimálním lidským eIF4G peptidem (aminokyselinové zbytky 569-580) prokázaly zvýšení afinity jen na dvojnásobek. Tento minimální peptid byl označen jako 4GS (short peptide). Jako 4GL (long peptide) byl označen peptid, který je na N-konci o 8 aminokyselin delší než 4GS. 4GL vykazoval vyšší vazebnou afinitu k eIF4E než jakou měl 4GS.

Podobným studiím, které se věnují modulaci vazebné afinity k čepičce, byl podroben také mutant eIF4E<sub>K119A</sub> (viz níže) (Friedland *et al.* 2005). Bylo prokázáno, že eIF4G a 4E-BP ovlivňují afinitu eIF4E k čepičkové struktuře spíše změnou struktury apofomy, než významnou úpravou proteinu s navázanou čepičkou (Volpon *et al.* 2006).

Také bylo zjištěno, že naopak asociace eIF4E s cap strukturou zvyšuje jeho afinitu k eIF4G proteinu (Haghighat a Sonenberg 1997).



Obr. 7: Struktura eIF4E/7-methyl-GDP/eIF4G peptid - ternárního komplexu, modře je značený eIF4E, na jeho konvexní straně je navázaná čepičková struktura 5' konce RNA. Žlábek pro čepičku je tvořený beta listy, H4 alfa helixem a smyčkou mezi řetězci S1 a S2

Oranžově je značený eIF4G fragment, který interaguje s N-koncovou oblastí eIF4E (Marcotrigiano *et al.* 1999)

eIF4G mění afinitu eIF4E k čepičkové struktuře prostřednictvím interakce se specifickými oblastmi na povrchu eIF4E. Esenciální jsou aminokyseliny z oblasti 37-39 ležící v blízkosti tryptofanů 43 a 46.

K identifikaci oblastí, které ovlivňují afinitu eIF4E k čepičce prostřednictvím interakce eIF4E-eIF4G, byly provedeny studie využívající mutagenезi.

Mutace HPL37-39AAA, W75F, W75R, E72A, V71G a G139D negativně ovlivnily vazbu eIF4E-eIF4G. Bylo zjištěno, že mutace eIF4E proteinu, které vedou k nízké afinitě k eIF4G, také vykazují sníženou vazebnou afinitu k čepičce. Afinitní chromatografie využívající čepičkový analog dokázala, že méně konzervativní mutace E72A vede k horšímu navázání eIF4G peptidu než mutace E72D. Více konzervativní substituce E72D a G139A způsobily malou změnu v afinitě eIF4E k eIF4G peptidu ve 4°C, ale výraznou fenotypovou změnu ve 20°C. Za nepřítomnosti eIF4G peptidu byla vazebná afinita eIF4E k čepičce stejná ve 4°C i 25°C. To dokazuje, že efekt mutace E72D byl zapříčiněn změnou afinity k eIF4G, naproti tomu mutace G139A vedla spíše ke změnám ve vazbě k čepičkové struktuře (Obr. 8) (Ptushkina *et al.* 1998).



Obr. 8. Struktura kvasinkového eIF4E proteinu s barevně vyznačenými místy mutace:  
H37-oranžová  
P38-červená  
L39-modrá  
V71-růžová  
W75-zelená  
E72-bílá  
G139-žlutá  
Tyto oblasti se účastní vazby eIF4G a ovlivňují afinitu eIF4E k čepičce.  
Vytvořeno v programu Cn3D  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)

### 3.4. Vliv S4-H4 smyčky eIF4E proteinu na vazebnou afinitu k ligandům

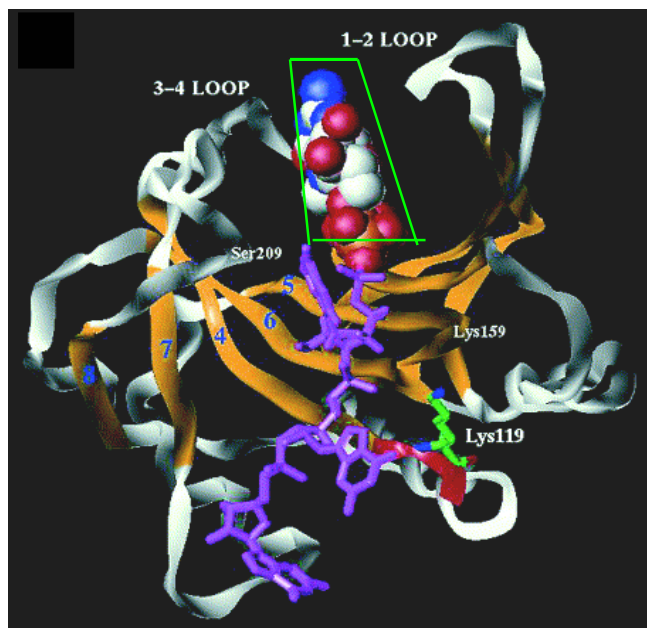
eIF4E je obecně exprimován ve vysokých hladinách v nádorových buňkách. Je spojován zejména s nádory hlavy a krku. Díky těmto pozorováním je věnována značná pozornost výzkumu vazby eIF4E k čepičkové struktuře a regulaci tohoto procesu. Studie dokazují, že vazebná afinita eIF4E k čepičce stejně tak jako k eIF4G peptidu může být ovlivněna bodovými mutacemi, které jsou vzdálené vazebnému místu pro čepičkovou strukturu, jako je například S4-H4 smyčka.



Mutace v S4-H4 smyčce vedla k produkci proteinů s pětkrát až desetkrát vyšší afinitou pro m7GTP než bylo naměřeno u nemutovaného eIF4E. Přestože S4-H4 smyčka eIF4E proteinu není v přímém kontaktu s m7GTP, mutace N118A, K119A a Q120A vykazují zvýšenou afinitu k m7GTP. Je to nejspíše způsobeno malou modifikací v pozici nebo orientaci tryptofanových oblastí lokalizovaných na S1-S2 (W56 u lidského eIF4E) respektive S3-S4 (lidský W102) smyčce.

Mutace K119A odstraňuje v S4-H4 smyčce pozitivní náboj, který interaguje přednostně s fosfátovou oblastí čepičky, což vede k vyšší vazebné afinitě k čepičce. Pro m7GTP vzrostala afinita dvojnásobně a pro m7GpppG afinita mutantní formy 4E vrostla dokonce jedenáctkrát oproti nemutovanému eIF4E. Stejný výsledek jako v případě m7GpppG byl zaznamenán i pro m7GpppA, což ukazuje na důležitost druhého (možná i třetího a čtvrtého) nukleotidu pro vazbu k čepičce. Pokud druhý či třetí nukleotid interaguje s eIF4E prostřednictvím iontových interakcí fosfátových skupin a pozitivního náboje eIF4E, dá se předpokládat, že záměna pozitivně nabitého K za nepolární A bude vazebnou afinitu spíše snižovat než zvyšovat. Ale přesun pozitivního náboje může zesílit hydrofóbní interakce, což způsobí zvýšení úrovně patrové interakce s čepičkovým analogem (Obr. 9) (Spivak-Kroizman *et al.* 2002, Friedland *et al.* 2005)

Studiem S4-H4 smyčky se zabývá i laboratoř biochemie RNA. Předmětem výzkumu je eIF4E z *Candida albicans*, který byl produkován v kmenech CWO4 *S. cerevisiae*. Ukázalo se, že tyto kmeny vykazují mírnou termosenzitivitu. Pokud ale eIF4E z *C. albicans* má mutaci 116Ser→Leu nacházející se právě v S4-H4 smyčce, dojde ke zvýšení termosensitivitu. Byl zde tedy opět potvrzen význam S4-H4 oblasti (nepublikovaná data-Mgr.Zuzana Feketová). Zajímavé je, že tato smyčka se u *C.albicans* výrazně liší svým aminokyselinovým složením jak od kvasinkové tak lidské S4-H4 smyčky (Obr. 5).



Obr. 9: Model vazby m7GpppGGG na lidský eIF4E. Beta listy jsou znázorněny žlutě, S4-H4 smyčka červeně. m7Gpp je ohraničený zeleně. Druhý, třetí a čtvrtý nukleotid jsou označeny fialově. Mutace v S4-H4 smyčce mohou ovlivnit afinitu k čepičkové struktuře i eIF4G, přestože je vzdálená jejich vazebným místům (Spivak-Kroizman *et al.* 2002).



## 4. Regulace eIF4E

eIF4E je jeden z hlavních cílů regulace iniciace translace. Dříve se předpokládalo, že eIF4E je nejméně zastoupený iniciační faktor v buňce. Rau a kolektiv při práci s lyzátem z králíčních retikulocytů prokázali, že eIF4E se může nacházet v mnohem vyšších koncentracích než bylo doposud popsáno (Rau *et al.* 1996). Pomocí polyklonálních protilátek získaných z králíka bylo zjištěno, že v kvasinkových buňkách je z eIF4 faktorů nejvíce zastoupena helikáza eIF4A, která je následovaná eIF4E, vyskytující se v několika kopiích na ribozóm. Svým množstvím tak přesahuje funkčního partnera eIF4G, se kterým v procesu translační iniciace tvoří komplex v zastoupení 1:1, stejně tak jako s regulačním proteinem p20, který je považován za analog lidského eIF4E vazebného proteínu. Avšak zastoupení komplexu eIF4E-eIF4G a eIF4E-p20 je v poměru 1:9.

Pokud je množství eIF4E v buňce redukováno na 30% oproti divokému kvasinkovému kmenu, růst i hladina proteosyntézy jsou ovlivněny pouze minimálně. Tyto výsledky neodpovídají obecně zastávanému názoru, že eIF4E, považovaný za limitující faktor, ovlivňuje translaci více než jiné eIF proteiny. Naproti tomu události v životním cyklu kvasinek, jako je kontrola buněčné velikosti jsou více citlivé na změny v dostupnosti eIF4E proteinu (von der Haar a McCarthy 2002).

Aktivita eIF4E je kontrolována třemi odlišnými mechanizmy.

Každý z těchto mechanismů byl podrobně zkoumán. V dalším textu se zaměřím zejména na regulaci prostředkovanou navázáním inhibičních proteinů.

Prvním z těchto mechanismů je kontrola úrovně genové exprese. Hladina eIF4E mRNA několiknásobně vzrůstá ve fibroblastech jako odpověď na růstové faktory jako je C-myc. C-myc je důležitý pro proliferaci a kontinuální růst buňky. Jeho hladina stoupá jako odpověď na mitogeny a nejvyšší míry dosahuje v G1 fázi. Účastní se regulace genů, mezi které patří i gen kódující eIF4E. C-myc obsazuje 2 vazebná místa na 403 nukleotidů dlouhém eIF4E promotoru, tzv. E boxy, a je tak zodpovědný za aktivaci eIF4E promotoru. Existuje zde tedy korelace mezi hladinou c-myc a hladinou eIF4E mRNA v průběhu buněčného cyklu (Jones *et al.* 1996).

Dále je funkce eIF4E ovlivněna fosforylací. Většina 4E nacházející se v 48S preiniciačním komplexu (~80-85%) je ve fosforylovaném stavu, volný protein je fosforylován z ~50% (Lapmhear a Penniers 1990).

Extrabuněčné stimuly jako hormony, růstové faktory a mitogeny, které podporují buněčný růst a zesilují hladinu translace, také zvyšují fosforylaci eIF4E (Fan, Penman 1970). Naopak eIF4E je defosforylován po tepelném šoku, který je následován poklesem hladiny translace. Míra změn ve fosforylaci je dána velikostí tepelného šoku. Při mírném tepelném šoku k defosforylaci nedochází (Duncan a Hershey 1989).

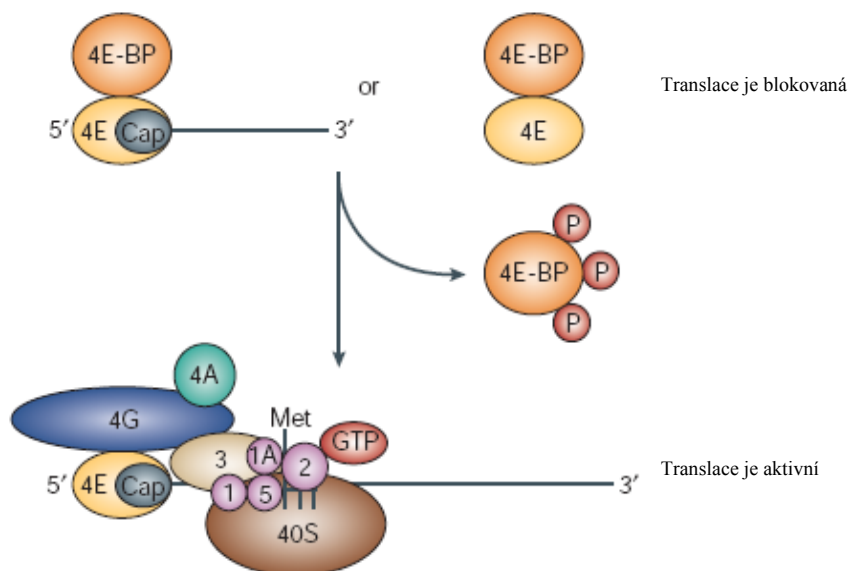
Proteinkinázy Mnk1 a Mnk2 navázané na eIF4G fosforylují savčí eIF4E na Ser209 (Flynn a Proud 1995). Avšak u *Saccharomyces cerevisiae* nebyl nalezen homolog proteinkináz Mnk1 ani Mnk2 a dokonce eIF4E z tohoto organismu postrádá ekvivalent Ser209 savců. Kvasinkový eIF4E je fosforylován zejména na Ser2 a Ser15 v N-koncové části proteinu (Zanchin a McCarthy 1995).

Ve fosforylaci eIF4E má významnou úlohu C-koncová třetina eIF4G, která obsahuje vazebné místo pro Mnk1 kinázu. eIF4G interaguje s N-koncovou částí eIF4E proteinu a přivádí tak Mnk1 kinázu k eIF4E, což vede k jeho fosforylaci *in vivo* (Pyronnet *et al.* 1999).

Původně se předpokládalo, že k fosforylaci dochází na Ser53 (Rychlik *et al.* 1987) avšak později bylo zjištěno, že eIF4E je fosforylován *in vivo* přednostně na Ser209 (Flynn, Proud 1995). Ser209 je lokalizován pod žlábkem pro čepičku, na protější straně se nachází Lys159, který může tvořit solné můstky přes mRNA s fosforylovaným Ser209. Tento můstek slouží jako svorka, která stabilizuje mRNA ve žlábkem. Fosforylace tak může zesilovat vazbu eIF4E s čepičkovou strukturou (Marcotrigiano *et al.* 1997).

Třetí mechanismus regulace eIF4E je uskutečněn rodinou represorových proteinů 4E-BP. 4E-BP je malý, teplotně stabilní protein. Proteiny této rodiny sdílí homologie zejména ve střední části, která obsahuje vazebné místo pro eIF4E. Tyto 4E-vazebné proteiny inhibují na čepičce závislou translaci. Rozpoznávají stejnou eIF4E vazebnou oblast jako eIF4G, tvoří tak molekulární mimikry eIF4G. S eIF4G sdílí motiv YXXXXL $\phi$  a jsou tedy schopny blokovat sestavení translačního aparátu. Delece této sekvence v 4E-BP či mutace tyrosinu či leucinu na alanin znemožňují navázání eIF4E (Marcotrigiano *et al.* 1999).

Vazba 4E-BP k eIF4E je regulována fosforylací. Hyperfosforylace 4E-vazebných proteinů jako odpověď na hormony či růstové faktory snižuje afinitu 4E-BP k eIF4E, způsobuje jeho disociaci a tak zmírňuje translační inhibici (Obr. 10) (Gingras *et al.* 2001).



Obr. 10: Funkce eIF4E-vazebného proteinu (4E-BP). 4E-BP se váže na eIF4E, brání tak navázání eIF4G proteinu a tedy i iniciaci translace. Fosforylace 4E-BP molekuly způsobí její oddisociování od eIF4E, eIF4G může interagovat s eIF4E a dochází k pokračování iniciaci translace (Gebauer a Hentze 2004)

Do rodiny těchto malých proteinů patří také 4E-BP1. Lidský 4E-BP1 může být produkován v kvasinkách, ale jeho aktivita je specificky závislá na koexpresi lidského eIF4E. Ke kvasinkovému eIF4E má totiž znatelně nižší afinitu. Lidský 4E-BP1 byl exprimován v nemodifikovaných kmenech kvasinek. V tomto případě nebyl pozorován žádný efekt na růst buněk. Poté byl stejný protein exprimován v kmenech, kde byl endogenní kvasinkový eIF4E nahrazen lidským eIF4E. Zde došlo k výraznému zpomalení buněčného růstu. Přesto má kvasinkový p20, který je považován za analog lidského 4E-BP, se savcím 4E-BP společně některé funkční rysy, například p20 může být také fosforylován a může interagovat s některými evolučně konzervovanými oblastmi na eIF4E, které jsou rozeznávány eIF4G proteinem (Ptushkina *et al.* 1998)

Vazebné místo na eIF4E pro 4E-BP není mezi kvasinkami a savci konzervované a kvasinkový eIF4E tedy postrádá strukturní rysy vyžadované pro navázání lidského 4E-BP1. Naopak oblast na eIF4E rozhodující pro funkci navázání eIF4G konzervovaná mezi kvasinkami a savci je. Z toho vyplývá zajímavá skutečnost, že vazebná místa na eIF4E pro 4E-BP1 a pro eIF4G protein nejsou pravděpodobně identická (Hughes *et al.* 1999).

U *S. cerevisiae* byly identifikovány dva eIF4E vazebné proteiny, Caf20p (neboli p20) a Eap1p, které jsou považovány za analogy lidského 4E-BP. Bylo dokázáno že oba faktory váží eIF4E a regulují translační iniciaci.

p20 sdílí homologie s eIF4G v konzervovaném sekvenčním motivu, který se účastní vazby s eIF4E, přesto má p20 ~10krát menší afinitu k eIF4E než jakou má eIF4G. Studium p20 (všech 161 aminokyselin) a kvasinkového eIF4G1 peptidu (aminokyselinové zbytky 448-647) bylo dokázáno, že jejich sekvence jsou identické z 21% ( to je 34 aminokyselin). Vazebná interakce p20 s eIF4E je závislá na aminokyselinách ležících v oblasti 71-75 eIF4E proteinu a na rozdíl od eIF4G nevyžaduje vysoce konzervované aminokyseliny v oblasti 37-39 a 139 proteinu eIF4E (Ptushkina *et al.* 1998, von der Haar *et al.* 2000).

Molekulová hmotnost p20 je ~18 kDa a stejně jako savčí 4E-BP se p20 nachází v různých fosforylovaných stavech (Zanchin a McCarthy 1995). Delece části *CAF20*, genu kodujícího p20, stimuluje růst kvasinkových buněk a naopak nadměrná exprese p20 způsobuje pomalejší růst buňky (Altmann *et al.* 1997).

Eap1p je ~70 kDa velký protein, který s p20 sdílí homologie pouze ve vazebném místě pro eIF4E. Delece této domény nebo jednobodová mutace znemožňuje interakci Eap1p s eIF4E. Eap1p soutěží s eIF4G i p20 o navázání na eIF4E *in vivo*. Delecí fragmentu *EAP1* genu nemělo žádný efekt na buňku ve 30°C, ale při teplotě 39°C došlo ke zpomalenému růstu *eap1* kmenu. Termosenzitivní fenotyp může být zvrácen opětovným vložením wt-*EAP1* genu. Termosenzitivní fenotyp je tedy způsoben deficiencí v sestavování Eap1p-eIF4E komplexu (Gregory *et al.* 2000).

## Závěr:

eIF4E je esenciální protein, který najdeme v buňkách od jednobuněčných eukaryot až po savce, kde se významně účastní iniciace translace, ale i dalších buněčných procesů. Je považován za limitující faktor iniciace translace a stal se důležitým předmětem výzkumu, zvláště po té co byla prokázána jeho zvýšená exprese v nádorových buňkách. Klíč k mechanismu maligní transformace iniciačními faktory by mohl přinést také výzkum propojující translační iniciaci a apoptózu (Spivak-Kroizman *et al.* 2002).

eIF4E je pod přísnou kontrolou jak na úrovni hladiny exprese, tak na úrovni aktivity.

Hladina exprese eIF4E je ovlivněna například c-Myc transkripčním aktivátorem. Postranlačně je pak jeho aktivita modulovaná fosforylací. Dlouhou dobu se předpokládalo, že je přednostně fosforylován na Ser53. Mutace v tomto místě byly středem mnoha experimentů, které měly blíže objasnit funkci eIF4E. Později však bylo zjištěno, že je tento protein fosforylován přednostně na Ser209. Tento objev otevřel dveře, které by mohly vést k rozluštění role fosforylace eIF4E v různých buněčných procesech. (Flynn, Proud 1995, Jones *et al.* 1996)

eIF4E je jediný faktor, který je v přímém kontaktu s čepičkou na 5'konci mRNA, proto je ovlivnění této aktivity pod přísným dohledem 4E-vazebných proteinů. Tyto negativní regulátory brání sestavení eIF4F komplexu a tedy i iniciaci translace. Dříve se vědci domnívali, že 4E-BP nijak nemění afinitu eIF4E k čepičce, ale jak eIF4G tak 4E-BP svou vazbou na povrch eIF4E zvyšuje afinitu tohoto proteinu k 5'konci mRNA (Marcotrigiano *et al.* 1999).

K objasnění funkce a zjištění struktury a vazebných míst na eIF4E byly použity studie využívající mutagenesi. Mutace v konservovaných místech nezbytných pro vazbu ligandů významně modulují aktivitu eIF4E a některé vedly k produkci termosenzitivních kmenů, mezi které patří i kmeny CWO4 cdc33-1 a cdc33-42 (Altmann *et al.* 1989).

Ale i mutace vzdálené vazebným místům pro čepičku i eIF4G zvyšují afinitu eIF4E k čepičce a přináší tak zajímavý důkaz o důležitosti dalších domén tohoto faktoru. Nynější úsilí je zaměřeno na tyto mutanty s vysokou afinitou. Mohly by totiž mít praktické využití pro izolaci mRNA s intaktními 5'konci a pro další specifické účely (Friedland *et al.* 2005)

eIF4E by se také mohl v budoucnu stát součástí kombinované terapie, protože pokles hladiny eIF4E způsobí, že buňky jsou citlivější k některým chemoterapeutikám (De Benedetti a Hartus 1999)

eIF4E je podrobně zkoumaný protein. Stále se objevují další a další důkazy o jeho významu v buněčných procesech, přesto je zde mnoho nezodpovězených otázek, které z eIF4E činí lákavý cíl pro budoucí výzkum.

## Seznam použité literatury:

- Altmann M, Handschin C, Trachsel H (1987): mRNA cap-binding protein: cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*, Mol Cell Biol 7: 998-1003
- Altmann M, Muler PP, Pelletier J, Sonenberg N, Trachsel (1989): A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue in vivo. J. Biol. Chem. 264: 12145-7
- Altamnn M, Trachsel H, (1989): Altered mRNA cap recognition activity of initiation factor 4E in the yeast cell cycle division mutant cdc33. Nucleic Acids Res.17(15):5923-31.
- Altmann M, Schmitz N, Verset C, Trachsel H (1997): A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. EMBO J, 16(5):1114-21
- Brenner C, Nakayama A, Goebel M, Tanaka K, Toh-e A., Matsumoto K. (1988): CDC33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae* Mol. Cell. Biol. 8:3556-3559
- Corpet F.(1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890
- Danaie P, Altmann M, Hall M, Trachsel H, Helliwell SB, (1999): CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. Biochem J. 340: 135-141
- De Benedetti A, Hartus AL (1999): eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. The international Journal of Biochemistry and Cell Biology, Volume 3, Issue 1, 59-72
- Duncan RF, Hershey JW (1989): Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery and adaptation. J Cell Biol. 1467-81.
- Fan H, Penman S (1970): Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. J Mol Biol.50(3):655-70
- Flynn A, Proud CG (1995): Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells.J. Biol. Chem. 270:21684-88
- Friedland DE, Wooten WNB, LaVoy JE, Hagedorn CH, Goss DJ(2005):A mutant of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor eIF4E<sub>K119A</sub> Has an Increased Binding Affinity for both m-7-G Cap Analogues and eIF4G Peptides. Biochemistry 44, 4546-4550

- Gebauer F, Hentze M (2004): Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5(10):827-35
- Gingras, A.C, Raught, B., Sonenberg, N., (1999): eIF4E Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:913-963
- Gingras A-C, Raught B, Gygi S.P., Niedzwiecka A, Miron M, Burely S.K., Polakiewicz R.D., Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N (2001): Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15: 2852-2864
- Gregory P. Cosentino, Tobias Schmelzle, Ashkan Haghighat, Stephen B. Helliwell, Michael N. Hall, and Nahum Sonenberg (2000) Eap1p, a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Associated Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. and Cell. Biol.*, p. 4604-4613,
- Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, Lugovskoy A, Sachs A, McCarthy J, Wagner G (2003): Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, 115(6), 739-50
- Haghighat A, Sonenberg N, (1997): eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5' cap structure. *J. Biol. Chem.* 272, 21677-21680
- Hughes JMX, Ptushkina M, Karim M, Koloteva N, von der Haar T, McCarthy J. (1999) Translational repression by human 4E-BP1 in yeast specifically requires human eIF4E as target. *J. Biol. Chem.* 274:3261-4
- Jacobson A, Peltz SW, (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65: 693-739
- Jivotovskaya A, Valášek L, Hinnebusch A, Nielsen K (2005): Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Mol. And Cell. Biol.* 1355-1372
- Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M (1996): An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol. Cell. Biol.* 16:4754-64
- Lamphear BJ, Penniers R., (1990): Cap binding protein complex that restores protein synthesis in heat-shocked Ehrlich cell lysates contains highly phosphorylated eIF-4E. *J. Biol. Chem.* 265: 5333-5336
- Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N (1995): The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. and cell biol.* 15:4990-4997:
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C, Sonenberg, N., Burley, S.K. (1997): Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89:951-961

- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C, Sonenberg, N., Burley, S.K. (1999): Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell.* 707-16
- Matsuo, H., Li, h., McGuire, AM., Fletcher, CM., Gingras A-C. (1997): Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.* 4:717-24
- Merrick W.C. (1992): Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56: 291-315
- Morino S, Hazama H, Ozaki M, Teraoka Y, Shibata S, Doi M, Ueda H, Ishida T, Uesugi S (1996): Analysis of the mRNA cap-binding ability of human eukaryotic initiation factor-4E by use of recombinant wild-type and mutant forms. *Eur.J.Biochem* 239,591-601
- Ptushkina M, von der Haar T., Vasilescu S, Frank R., Birkenhager R., McCarthy J.(1998): Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5'cap in yeast involves a site partially shared by p20. *The EMBO Journal* 4798-4808
- Ptuskina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM, McCarthy JE(1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in high cap-affinity state. *EMBO J* 18: 4068-4075
- Pyronnet S, Imataka H, Gingras A-C, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N.(1999): Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 18:270–279.
- Rau M, Ohlmann T, Morley S, Pain V (1996): A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 271(15): 8983-90
- Rychlik W, Russ MA, Rhoads RE(1987): Phosphorylation site of eukaryotic initiation factor 4E. *J Biol Chem.*262(22):10434-7.
- Shatkin, A.J., (1976):Capping of eukaryotic mRNAs *Cell* 9:645-53
- Shibagaki, Y., Itoh, N., Yamada, H., Nagata, S., Mizumoto, K., (1992): mRNA capping enzyme: isolation and characterization of the gene encoding mRNA guanylyltransferase subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267: 9521-9528
- Shuman, S. (1995): Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 101-129
- Spivak.Kroizman T, Friedland D, De Staercke Ch., Kim M, Gernert, Goss D, Hagedorn C.(2002):Mutations in the S4-H2 loop of eIF4E which increase the affinity for m-7-GTP. *FEBS Letters* 25892
- Sonenberg N, Gingras A-C, (1998): The mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10: 268-275

Tomoo, K., Shen, X., Koumei, O., Yoshikiaki, N., Fukuhara, S., Morino, S., Sasaki, Ma., Taniguchi, T., Miyagawa, H., Kitamura, K., Miura, K., Ishida, T. (2003): Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* 328, 365-383

Topisirovic I, Culjkovic B, Cohen A, Perez JM, Skrabanek L, Borden KL (2003): The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of 4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J* 22: 689-703

Varaini G.(1997): A cap for all occasions. *Structure* 5:855-58

Volpon L, Osborne M, Topisirovic I, Siddiqui N, Borde K (2006): Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. *The EMBO J.* 7601380

von der Haar T, Ball PD, McCarthy JE (2000): Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'Cap by domains of eIF4G. *J Biol. Chem.* 275: 30551-30555

von der Haar T, McCarthy JE (2002): Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Molecular Microbiology* 531-544

von der Haar T, Gross J, Wagner G, McCarthy J(2004): The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature structural and Molecular biology* 11(6):503-11

Zanchin N. I. T., McCarthy J.E.G.,(1995):Characterisation of the *in vivo* phosphorylation sites of the mRNA-cap-binding complex proteins eukaryotic initiation factor-4E and p20 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 26505-26510

Zuberek, J., Jemielity J, Jablonowska A., Stepinski J, Dadlez M., Stolarski R, Darzynkiewicz E (2004):Influence of electric charge variation at residues 209 and 159 on the interaction of eIF4E with the mRNA 5'terminus. *Biochemistry* 43: 5370-5379