

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Funkce mTORC1 komplexu v regulaci iniciace translace

mTORC1 complex function in regulation of translation initiation

Lucie Holásková

Školitel: Mgr. Zuzana Feketová

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla všechny prameny a použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 5. 5. 2011, Lucie Holásková

Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala především Mgr. Zuzaně Feketové za trpělivé vedení bakalářské práce, cenné rady a ochotu zabývat se vzniklými problémy. Poděkování patří i mé rodině za podporu při studiu.

Abstrakt:

Práce se zabývá charakteristikou mTOR a jeho účasti na regulaci iniciace translace. Především se zaměřuje na ovlivnění iniciace translace. mTOR protein je součástí dvou komplexů, které se v organismech vyskytují – mTORC1 a mTORC2. Eukaryotický iniciační faktor 4E (eIF4E) hraje důležitou roli při kontrole iniciace translace. Aktivita eIF4E proteinu je regulována represorovými proteiny z rodiny 4E binding proteins (4E-BPs). Navázání těchto proteinů na eIF4E je regulováno stavem jejich fosforylace. Aby došlo k uvolnění 4E-BP1 z eIF4E musí dojít k fosforylaci na čtyřech fosforylačních místech (Thr37, Thr46, Ser65 a Thr70). Práce přináší formou rešerše i přehled některých dalších dějů, které se u mTOR dráhy vyskytují.

Klíčová slova: mTOR, regulace, iniciace translace

Abstract:

My bachelor thesis deals with the effect of mTOR pathway to different processes in the cell. In particular, it focuses on the influence of translation initiation. mTOR protein is part of two complexes, which occur in different organisms – mTORC1 and mTORC2. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) plays an important role in controlling translation initiation. The activity of eIF4E protein is regulated by family of repressor 4E-binding proteins (4E-BPs). Linking these proteins to eIF4E is regulated by their phosphorylation state. For the release of 4E-BP1 from eIF4E, phosphorylation must occur at four phosphorylation sites (Thr37, Thr46, Ser65 and Thr70). The study also covers some of the other events that occur in the mTOR pathway.

Key words: mTOR, regulation, translation initiation

Obsah

1	Úvod	1
2	Struktura mTOR	2
2.1	HEAT motivy.....	2
2.2	FAT doména a FATC doména.....	3
2.3	FRB doména.....	3
3	Rapamycin a s ním interagující proteiny	4
3.1	Rapamycin	4
3.2	FKBP/ FK506 „binding“ protein.....	4
3.3	Rheb protein	6
4	mTOR komplexy	7
4.1	mTORC1	7
4.1.1	Raptor – KOG1 („Kontroller of Growth-1“).....	7
4.1.2	LST8/ GβL	8
4.2	mTORC2	9
4.2.1	AVO1 / Sin1 (SAPK-„interacting“ protein 1).....	9
4.2.2	AVO3 / Rictor („Rapamycin insensitive companion of mTOR“).....	9
4.2.3	PRR5 („Prolin rich“ protein 5).....	10
5	Role eIF4F komplexu při iniciaci translace	11
5.1	Iniciace translace	11
5.2	eIF4F komplex.....	12
5.2.1	eIF4E.....	13
5.2.2	eIF4A	14
5.2.3	eIF4G	15
6	Regulace mTOR	17
6.1	TSC1 a TSC2.....	18
6.2	Akt (protein „kinasa“ B/PKB)	18
6.3	PRAS-40.....	19
6.4	„Downstream“ regulace	19

6.4.1	TOS motiv (TOR “signaling motif”)	20
6.4.2	RAIP motiv	20
6.5	S6 kináza 1	21
6.6	4E „binding“ protein 1 / PHAS-I	22
7	Závěr	24
8	Použitá literatura	25

Seznam zkratek

4E-BP1	4E binding protein 1
4E-BP2	4E binding protein 2
4E-BP3	4E binding protein 3
Akt/PKB	protein kinasa B
CTD	C-terminus domain
eIF1	eukaryotic translation initiation factor 1A
eIF1A	eukaryotic translation initiation factor 1
eIF2	eukaryotic translation initiation factor 2
eIF3	eukaryotic translation initiation factor 3
eIF4B	eukaryotic initiation factor-4B
eIF4E	eukaryotic initiation factor-4E
eIF4F	eukaryotic initiation factor-4A
eIF4G	eukaryotic initiation factor-4G
FAT	FRAP, ATM, TRRAP domain
FATC	FAT C-terminus domain
FKBP	FK506 binding protein
FKBP12	FK506 binding protein 12kDa
FKBP38	FK506 binding protein 38kDa
FRAP	FKBP-rapamycin-associated protein
FRB	FKBP12-rapamycin binding domain
GBL	G protein beta subunit-like
HEAT	Huntignton, EF3, A-subunit of PP2A, TOR1 motif
LST8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
Met-tRNA _i ^{Met}	initiator methionine transfer RNA
MNK1	MAP kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
NRD	negative regulative domain
PABP	poly(A) – binding protein
PDK1	3 -phosphoinositide-dependent protein kinase – 1
PDK2	3 -phosphoinositide-dependent protein kinase – 2
PH	pleckstrin homology domain
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

PIKK	phosphoinositide three-kinase-related kinase
PIP ₃	phosphatidylinositol (3,4,5) - triphosphate
PKC	protein kinase C
PRAS-40	proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa
PRR5	prolin rich protein 5
RAFT1	rapamycin and FKPB target
RAPT	rapamycin target
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
RBD	Raf-like Ras-binding domain
RBP1	rapamycin binding protein
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR
RNC	raptor N-terminal conserved
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
S6K2	Ribosomal protein S6 kinase beta-2
Sin1	SAPK-interacting protein 1
TOP	terminal oligopyrimidine tract
TOS	TOR signaling motif
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
UTR	untranslated region

1 Úvod

Při rozhodování, na jaké téma budu psát bakalářskou práci, jsem v odborné literatuře narazila na zajímavé články o mTOR dráze. Především mě pak zaujal vliv mTORC1 a mTORC2 na ostatní děje v buňce. Proto jsem se rozhodla, že se v této práci pokusím shrnout informace o struktuře, funkci a regulaci těchto komplexů. A podrobněji bych se chtěla zaměřit na význam mTORC1 komplexu při regulaci iniciaci translace. Pro pochopení této problematiky je však nutné popsat i ostatní děje, proteiny a regulátory, které se mTOR dráhy účastní.

V druhé kapitole se zaměřuji na stavbu mTOR proteinu. Popisuji jednotlivé domény, které se na tomto proteinu vyskytují – FRB doména, FAT a FATC domény, HEAT motiv, NRD doména a katalytickou doménu. Všechny tyto domény jsou důležité pro správnou funkci celého proteinu.

V třetí kapitole popisují proteiny, které interagují s rapamycinem či proteiny, které regulují jeho funkci (Rheb protein). Rapamycin je imunosupresivní molekula, která patří mezi inhibitory mTORC1. Jako inhibitor funguje rapamycin pouze v komplexu s FKBP12.

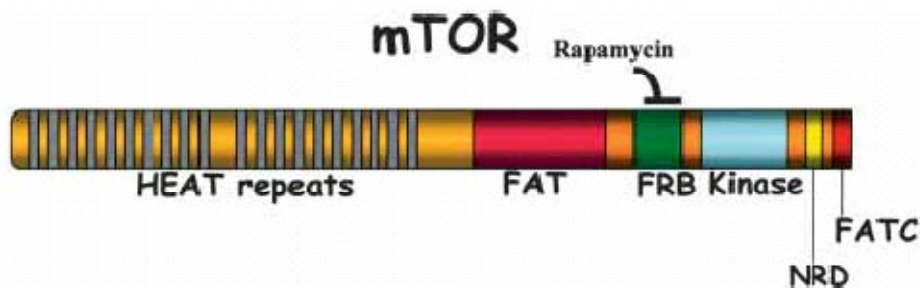
V čtvrté kapitole přibližuji strukturu dvou komplexů, které mTOR vytváří – mTORC1 a mTORC2. Popisují zde jednotlivé proteiny, které se váží na jednotlivé komplexy. Pro oba komplexy je společný protein GβL, v dalších se pak liší. Na mTORC1 se váže raptor. U mTORC2 se nachází rictor a Sin1 protein a PRR5.

Pátá kapitola je zaměřena na iniciaci translace, především na význam eIF4F komplexu. eIF4F komplex, který je složen ze tří podjednotek eIF4A, eIF4E a eIF4G je důležitým regulátorem iniciace translace.

Poslední kapitola je zaměřena na regulaci mTOR dráhy - „upstream“ a „downstream“ regulace.

2 Struktura mTOR

mTOR (mammalian target of rapamycin) patří do skupiny serin/threoninových kináz. mTOR můžeme najít i pod dalšími zkratkami jako je FRAP (FKBP-rapamycin-associated protein), RAFT1 (rapamycin and FKBP target) nebo RAPT (rapamycin target). Jedná se o klíčovou molekulu v buňce, která ovlivňuje několik různých drah. Jednou z hlavních funkcí je kontrola buněčného růstu v závislosti na obsahu živin v buňce. Mezi další funkce patří regulace iniciace translace (Brunn et al. 1997), organizace cytoskeletu v buňce, ovlivnění G1 fáze v buněčném cyklu (Fingar et al. 2004), degradace proteinů prostřednictvím autofágie (Noda and Ohsumi 1998) a regulace transkripce (biogeneze ribozomů) (Powers and Walter 1999).



Obr. 1 Primární struktura mTOR proteinu. Na N-konci se nachází HEAT motivy, které jsou důležité pro protein-protein interakce. Protein-protein interakce je funkcí i FAT domény. FRB doména je místo, kam se váže FKBP12-rapamycin komplex. Směrem k C konci se vyskytuje katalytická kinázová doména, která má homologii pro PI3Ks a je to místo pro vazbu s LST8. Na C-konci se vyskytuje FATC doména. Tato doména se nevyskytuje samostatně, ale vždy ve vazbě s FAT doménou. Její funkcí je kontrola kinázové aktivity (Hay and Sonenberg 2004).

Jedná se o molekulu o velikosti cca 300kDa a je složena z 2549 aa. Je rozdělena na několik domén. Pro všechny TOR proteiny je specifická C (-COOH) -terminální doména (CTD). Jedná se o oblast s velkou homologií pro katalytické domény fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) a fosfatidylinositol 4-kinázy. mTOR je protein kináza, která je součástí dvou komplexů mTORC1 a mTORC2 (viz. kap.4).

2.1 HEAT motivy

Na N-terminální doméně se nachází 20 kopií HEAT motivů. Zkratka HEAT je složenina prvních písmen 4 proteinů – Huntignton, EF3, A-podjednotka PP2A, TOR1. Každý motiv HEAT se skládá ze dvou alfa helixů (každý o 40 aa). Oba tyto helixy mají specifické

uspořádání hydrofobních a hydrofilních zbytků. Proto mají velkou roli při tvorbě protein-protein interakcí v proteinech (Andrade and Bork 1995).

2.2 FAT doména a FATC doména

FAT (FRAP, ATM, TRRAP) doména, která se nachází ve všech fosfatidylinositol kinázách (PIKK), je další součástí TOR proteinu. Hlavní funkcí FAT domény je protein – protein interakce, nutná pro udržení tvaru celého proteinového komplexu. Jedná se o doménu, bez níž mTOR protein není aktivní.

Další doménou, která patří do stejné kinázové rodiny jako FAT doména je FATC (FAT C-terminus) doména. FATC doména se nachází na úplném konci CTD (Dames et al. 2005). Jedná se o sekvenci dlouhou přibližně 35 aa. FATC a FAT doména se vyskytují společně za vzájemné interakce, jelikož FATC doména je příliš malá, než aby mohla fungovat zcela samostatně. Mezi její další vlastnosti je možné zařadit význam pro správnou funkci PI-kinázové domény, která je vklíněná mezi tyto dvě domény (viz. obr.1) (Bosotti, Isacchi and Sonnhammer 2000).

Mezi katalytickou doménou a FATC doménou je tzv. negativně regulující doména (NRD).

2.3 FRB doména

Směrem k N (-NH₂)-terminální doméně se nachází oblast FKBP12-rapamycin „binding“ doména (FRB), která se skládá z přibližně ze 100 aa. Jedná se o doménu, která má regulační funkci (Vilella-Bach et al. 1999). Je to oblast, kde dochází k navázání komplexu FKBP12-rapamycin (viz. kap.3.2) na mTOR protein. Rapamycin se vyskytuje v hydrofobní kapse FKBP12, která reaguje s hydrofobní oblastí v FRB. Tím dochází ke společné vazbě (Choi et al. 1996). Výskyt této domény v proteinu TOR byl objeven u *S. cerevisiae*.

Za FRB doménou se vyskytuje katalytická kinázová doména, na kterou nasedá LST8 (viz. kap.4.1.2), a tím dochází ke zpevnění interakce mezi raptorem a mTOR. Katalytická doména mTOR obsahuje signifikantní aminokyselinovou homologii s katalytickou doménou PI3K.

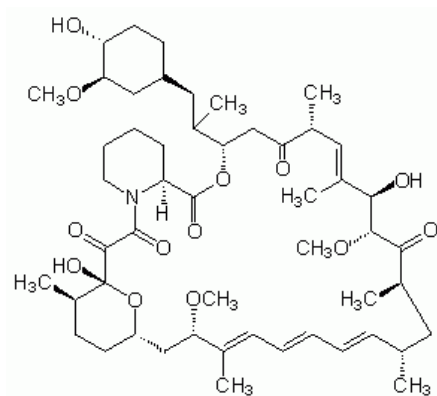
3 Rapamycin a s ním interagující proteiny

3.1 Rapamycin

Rapamycin dostal své jméno podle Rapa-Nui, místa kde byl objeven. Rapa-Nui je jméno pro Velikonoční ostrov, který se nachází v Pacifickém oceánu.

Jedná se o bakteriální antibiotikum s lipofilní povahou, které má chemické složení $C_{51}H_{79}NO_{13}$ (viz. obr.2) (Vezina, Kudelski and Sehgal 1975). Rapamycin patří do rodiny imunopresivních látek, které jsou produkovány bakterií *Streptomyces hygroscopicus*. Je důležitým faktorem pro tvorbu inhibičního komplexu FKBP12-rapamycin komplex, který se váže do FRB domény (která se nachází na C-terminálním konci) na mTOR proteinu. Rapamycin tvoří komplex s RBP1 u bakterií a s FKBP proteinem u eukaryot. Rapamycin-„binding“ protein 1 (RBP1) je kvasinkový protein o velikosti 13kDa, který je kódován genem se sekvencí 114 aa. RBP má vysokou sekvenční homologii s lidským FKBP (Koltin et al. 1991).

Komplexy mTORC1 a mTORC2 (viz. kap.3.1 a 3.2) se liší svojí senzitivitou na rapamycin. mTORC1 je rapamycin senzitivní, oproti tomu mTORC2 na přítomnost rapamycinu nereaguje.



Obr. 2 Struktura rapamycinu (Dumont and Su 1996)

3.2 FKBP/ FK506 „binding“ protein

FK506 „binding“ protein patří do rodiny proteinů, která má peptidyl-prolyl izomerázovou aktivitu (Siekierka et al. 1989). Fungují jako chaperony pro proteiny, které obsahují prolinové zbytky. Rapamycin se váže na tento protein a vytváří s ním komplex, který

se váže na mTOR protein v oblasti FRB domény, a tím dochází k inaktivaci celého proteinu. Tento protein je schopen vázat již zmíněný rapamycin a jemu podobný FK506.

FK506 je imunosupresivní chemická látka známá jako tacrolimus. Rapamycin a FK506 mají velmi podobnou strukturu. Obě tyto látky jsou schopny vázat imunofilin. Tím dochází ke vzniku dvou různých komplexů, které mají odlišné funkce v organismu. Imunofilin má peptidyl-prolyl isomerázovou aktivitu. FK506 po navázání imunofilinu a následnému navázání FKBP12 váže kalcineurin. Oproti tomu rapamycin s imunofilinem a navázaným FKBP12 se váže na mTOR protein (Heitman, Movva and Hall 1991, Koltin et al. 1991). FK506 redukuje peptidyl-prolyl izomerázovou aktivitu (Sabatini et al. 1994). FK506-FKBP12 komplex (viz. obr.3) interaguje s kalcineurinem, a tím dochází k inhibici signálu pro transdukcii T-lymfocyt a inhibici transkripce IL-2 (Liu et al. 1991).



Obr. 3 Struktura FKBP12 – FK506 komplexu. FKBP12 je zobrazen sekundární strukturou.

(<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fkbp-cartoon-1fkj.png>)

FKBP12-rapamycin komplex se váže do FRB domény na mTOR proteinu a terminální segment tohoto komplexu se váže i na kinázovou katalytickou doménu mTOR. Nejprve však musí dojít k navázání rapamycinu na FKBP12. Poté může dojít k navázání celého komplexu na FRB doménu (Oshiro et al. 2004).

Do FKBP rodiny proteinů patří kromě FKBP12 i FKBP38 (známý i jako FKBP8), který má molekulovou hmotnost 38kDa. FKBP38 je endogenní inhibitor mTORC1. Pokud se FKBP38 naváže na mTOR v oblasti FRB domény, dochází ke ztrátě schopnosti mTORC1 dodat signál „downstream“ cílům. Na rozdíl od FKBP12, FKBP38 nepotřebuje k inhibici mTORC1 tvořit komplex s rapamycinem. FKBP38 je regulováno Rheb proteinem. Rheb

aktivovaný GTP interaguje s FKBP38 a tím zabraňuje inaktivaci mTORC1 proteinu (Ma et al. 2010).

3.3 Rheb protein

Rheb („Ras homolog enriched in brain“) je malý protein s GTPázovou aktivitou, patřící do proteinové podrodiny Ras, který aktivuje mTORC1 při navázání GTP. Ras podrodina patří do rodiny malých GTPáz. Rheb protein patří do „upstream“ aktivátorů mTORC1 a zároveň hraje roli jako „downstream“ regulátor TSC1-TSC2 komplexu (viz. kap.6.1). Mezi funkce Rheb proteinu patří stimulace fosforylace S6K1 a 4E-BP1 (Yang et al. 2006).

4 mTOR komplexy

mTOR se v buňkách vyskytuje ve dvou komplexech – mTORC1 a mTORC2. U *S.cerevisiae* a ostatních kvasinek se nachází dva homology genu pro TOR – TOR1 a TOR2. Oproti tomu u všech eukaryotních organismů se nachází pouze jediný gen pro TOR. Základním rozdílem těchto dvou komplexů je resistance na imunosupresivní látku – rapamycin. Další rozdíl je v dalších podjednotkách, které se na TOR protein připojují.

TOR je základní proteinovou podjednotkou v obou komplexech. Rozdíly mezi oběma komplexy jsou v dalších připojených proteinových podjednotkách a v citlivosti na rapamycin. Oba tyto komplexy fosforylují hydrofobní motivy na následných protein kinázách, což vede k jejich aktivaci. mTORC1 fosforyluje S6K1 a 4E-BP1 a mTORC2 fosforyluje Akt.

4.1 mTORC1

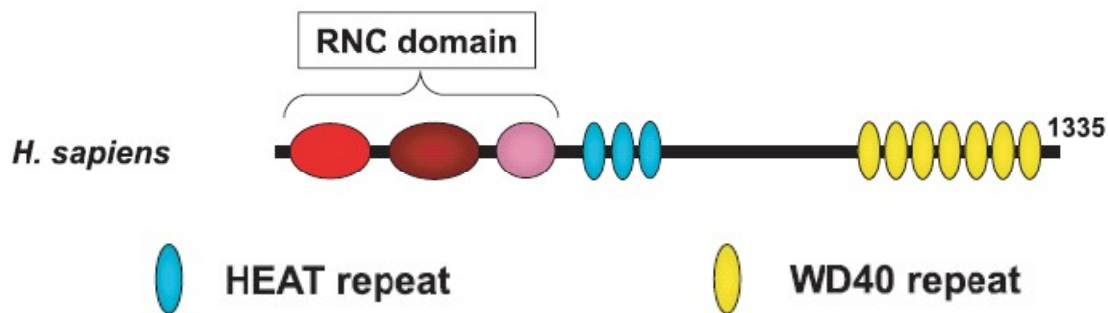
TORC1 se *S. cerevisiae* kromě hlavního proteinu TOR1 nebo TOR2 skládá z KOG1 a LST8 u (Loewith et al. 2002). U savců se vyskytují homology KOG1 = raptor a LST8 = mLST8. Jeho hlavní funkcí je fosforylace efektorů jako je S6K a 4E-BP1. mTORC1 je citlivý na rapamycin. Rapamycin tvoří komplex s FKBP12. Tento komplex je schopen se vázat na TOR1 nebo TOR2 v mTORC1, ale nikoli u mTORC2 nebo TORC2 (Loewith et al. 2002). mTORC1 reguluje několik esenciálních buněčných funkcí. Nejlépe známá je regulace syntézy proteinů, která je pozitivně regulovaná mTORC1. Dochází i k regulaci autofágie, kde mTORC1 působí jako její inhibitor (Mizushima et al. 2008).

4.1.1 Raptor – KOG1 („Kontroller of Growth-1“)

Raptor (=„regulatory associated protein of mTOR“) je 150kDa velký mTOR vázající protein, který je důležitý pro správnou funkci TOR signalizace. Raptor se váže na HEAT doménu mTOR. Jeho cDNA definuje ORF, který kóduje 1335 aa. Na N-konci tohoto polypeptidu se nachází RNC (=„raptor N-terminal conserved“). Směrem k C-konci se nacházejí tři HEAT motivy (viz. obr.4). Tento počet motivů je vždy stejný pro všechny organismy. Následuje sedm WD40 motivů, které se nacházejí na C-terminální doméně (Kim et al. 2002).

Funkce raptoru je pozitivní regulace „downstream“ efektorů. Mezi další funkce řadíme stabilizaci komplexu tzv. mTOR-raptor interakce. K této stabilizující interakci dochází při nedostatku aminokyselin v buňce nebo nedostatku zdroje energie. Tím dochází k inhibici mTOR signalizační dráhy a represí mTOR kinázové dráhy (Kim et al. 2002). mTOR-raptor

komplex je důležitým činitelem při fosforylaci 4E-BP1 (4E-,binding“ protein 1) a S6K1 (Hara et al. 2002).



Obr. 4 Struktura raptoru u *H. sapiens*. Na N-konci se nachází RNC doména, následují 3 HEAT motivy a na C-konci se pak vyskytuje sedm WD40 repetíc. (Yonezawa et al. 2004)

4.1.2 LST8/ GβL

GβL (G protein β „subunit-like“ protein, homolog u *S. cerevisiae* - LST8) je protein, který slouží jako pozitivní regulátor mTOR dráhy, který reaguje na hladinu živin (Kim et al. 2003). Jedná se o protein o velikosti 36kDa. Tato molekula je složena ze sedmi WD40 repetíc (Ochotorena et al. 2001). Ve WD40 se vyskytují sekvence, které jsou velmi podobné sekvencím, které obsahuje β-podjednotka heterotrimerických G-proteinů. GβL se vyskytuje u všech eukaryotních organismů (Rodgers et al. 2001).

Na kinázovou doménu mTOR se GβL pravděpodobně váže nezávisle na proteinu raptor. Po jeho navázání dochází k výraznému zvýšení kinázové aktivity mTOR na substrátech 4E-BP1 a S6K1, pokud je na mTOR pevně navázán raptor, k zlepšení aktivity mTOR nedochází (Kim et al. 2003). Vazba mezi mTOR a raptorem je ovlivnitelná koncentrací přítomných živin. Oproti tomu vazba mezi GβL a mTOR je na koncentraci živin nezávislá. Vazba GβL-mTOR je rezistentní vůči detergentům (Kim et al. 2003). Proto je tato vazba daleko stabilnější než vazba mezi mTOR a raptorem (Kim et al. 2002). Jak jsem zmínila výše, vzniká při nedostatku živin specifická interakce mezi mTOR a proteinem raptor, která je závislá na přítomnosti GβL (Kim et al. 2003). Přesný mechanismus inhibice kinázové aktivity mTOR proteinu závislé na přítomnosti živin není, pokud je mi známo, popsán.

4.2 mTORC2

TORC2 obsahuje TOR2, AVO1, AVO2, AVO3, LST8 a PRR5 u *S. cerevisiae* (Loewith et al. 2002). Stejně jako u TORC1 jsou známé savčí homology AVO1= Sin1, AVO3 = rictor, LST8 = mLST8. Tento komplex má specifickou funkci při kontrole tvorby aktinového cytoskeletu a celkové polarizace buňky. K regulaci aktinového cytoskeletu dochází za pomoci Rho proteinu a PKC (protein kinasa C). Rho protein patří do rodiny malých GTPáz. mTORC2 je stejně jako kvasinkový TORC2 je „rapamycin insensitive“. To znamená, že rapamycin není schopný se navázat na mTOR2 protein (Jacinto et al. 2004).

Tento komplex hraje klíčovou kinázovou roli při fosforylaci Ser473 na Akt/PKB. Tento děj reguluje buněčný růst, proliferaci a metabolismus (Sarbasov et al. 2005).

4.2.1 AVO1 / Sin1 (SAPK-„interacting“ protein 1)

Sin1 obsahuje dvě domény „Raf-like Ras-binding domain“ (RBD) a „pleckstrin homology domain“ (PH) (viz. obr.5). Jedná se o protein, který má funkci v signalizaci transdukce a regulaci polarizace aktinového cytoskeletu (Wilkinson et al. 1999).



Obr. 5 Struktura Sin1. A. Sin1 u *Homo sapiens*, B. Avo1 u *Saccharomyces cerevisiae* (Schroder et al. 2007)

Velikost tohoto proteinu, který je kódován jedním genem, se liší v závislosti na alternativním sestřihu. Tato hodnota se může pohybovat mezi 52-80kDa (Schroder et al. 2004).

4.2.2 AVO3 / Rictor („Rapamycin insensitive companion of mTOR“)

Rictor je důležitá podjednotka mTORC2, která není senzitivní k rapamycinu. Jedná se o protein o velikosti 200kDa. Rictor-mTOR komplex hraje důležitou roli při fosforylaci Ser473 na Akt. Redukce exprese proteinu rictor či mTOR způsobuje inhibici Akt/PKB efektoru. Rictor-mTOR komplex způsobuje přímou fosforylaci Ser473 a zároveň usnadňuje fosforylaci na Thr308, která je prováděna PDK1 (viz. kap.6.2) (Sarbasov et al. 2005). Navázání rictoru na mTOR není inhibováno přítomností rapamycinu ani ovlivněno hladinou

živin, jak je tomu v případě mTORC1. mTORC2 není citlivý na přítomnost rapamycinu, jelikož se na něj neváže raptor, na který se rapamycin částečně váže (Shiota et al. 2006).

4.2.3 PRR5 („Prolin rich“ protein 5)

PRR5 je protein kódovaný genem, který se nachází v oblasti na chromosomu, která je deletována u některých případech rakoviny prsu a střeva (Johnstone et al. 2005). PRR5 interaguje s rictorem a tato interakce je mnohem odolnější než vazba mezi mTORC2 a rictorem. Interakce mezi PRR5 a rictorem neovlivňuje jeho navázání na mTORC2 a nemá vliv na fosforylaci Akt pomocí mTORC2. Umlčení PRR5 nicméně inhibuje fosforylaci Akt a S6K1, čímž dochází ke snížení míry proliferace buněk (Woo et al. 2007).

Jedná se o nově objevený protein asociovaný s mTORC2 komplexem a je pravděpodobné, že se nejedná o poslední. Očekává se také, že může dojít k objevení nových interagujících faktorů s mTORC1 komplexem a to by mohlo mít vliv na rozlišení různých funkcí, které tyto komplexy vykonávají.

5 Role eIF4F komplexu při iniciaci translace

Translace se skládá ze tří částí – iniciace, elongace a terminace. V této kapitole se budu věnovat pouze iniciaci, která je vzhledem k tématu mé práce nejdůležitější. Iniciace translace je dost rozsáhlý pojem a není cílem mé práce podrobně se zabývat všemi ději a faktory, které do této fáze patří. Především se zaměřím na eIF4F komplex, který je v regulaci iniciace translace přes mTOR dráhu velmi důležitý.

Primární časovou regulaci iniciace translace bychom mohli rozdělit na krátkodobou a dlouhodobou. Krátkodobá fáze, která proběhne během několika minut, reguluje aktivitu či uspořádání podjednotek translačního komplexu. Například se tyto změny mohou týkat fosforylace na iniciačních faktorech a na specifických RNA-vazebných proteinech. Dlouhodobá kontrola je proces, který se projevuje během několika hodin až dní. Jedná se o kontrolu na buněčné úrovni – syntéza translačních faktorů a ribozomů. Což je proces regulující množství aktivního materiálu, který vstupuje do translace (Proud 2007).

5.1 Iniciace translace

V této kapitole bych chtěla shrnout děje, které se vyskytují při iniciaci translace. Jedná se jen o velmi stručný popis jednotlivých kroků. Detailní popis by byl nad rámec této práce.

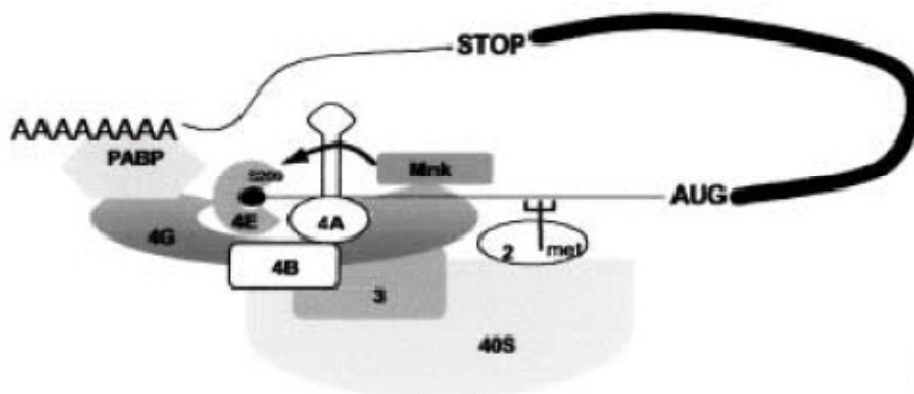
Iniciace translace u eukaryot vede k sestavení 80S ribozomu, který obsahuje aminoacylovanou iniciátorovou tRNA ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$), která je navázána v P (peptidickém) místě na malé podjednotce ribozomu. Antikodon $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ hraje důležitou roli pro nalezení iniciačního kodonu na mRNA. Pro tento proces je nutná přítomnost eukaryotických iniciačních faktorů (eIFs). eIF2, GTP a $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ spolu vytvoří tzv. ternární komplex, který se dohromady s eIF3, eIF1 a eIF1A váže na 40S podjednotku ribozomu a vytvoří 43S preiniciační komplex (Benne and Hershey 1978). 43S komplex obsahuje 40S podjednotku, eIF3 a eIF2-ternární komplex. Po navázání 5' konce mRNA na 43S, které je umožněno faktory eIF4A, eIF4B a eIF4F (viz. kap.6.2), začne 43S komplex skenovat mRNA ve směru 3' konci mRNA dokud nenarazí na iniciační AUG kodon. Skenování 5'-UTR je ATP dependentní. Bez přítomnosti eIF1 by 43S komplex nebyl schopný rozeznat „cognate“ a „noncognate“ iniciační kodony. Pokud dojde k nalezení iniciačního kodonu, který je ve správném kontextu, dochází k jeho zastavení a k vytvoření stabilního 48S komplexu (Pestova and Kolupaeva 2002). Nakonec dojde k navázání 60S komplexu na 48S komplex. Jelikož povrch 40S podjednotky ribozomu je obsazen faktory eIF1, eIF1A, eIF2 a eIF3, nemůže dojít k navázání 60S podjednotky bez odstranění těchto faktorů. K tomu dochází na základě

konformačních změn, které probíhají při vytváření tzv. uzavřené konformace již zmíněného stabilního 48S komplexu. Po nalezení iniciačního kodonu dojde k vytvoření vazeb mezi antikodonem Met-tRNA_i^{Met} a kodonem mRNA. Vznikem vazeb mezi bázemi kodonu a antikodonu dojde k vzdálení C-terminálních konců eIF1 a eIF1A od sebe. Tím dojde ke snížení afinity 43S komplexu k eIF1 a tento faktor se přesune na eIF3 nebo se odpojí. Tím dojde ke vzniku uzavřeného komplexu (Unbehaun et al. 2004).

Translační iniciační faktory 1 a 1A jsou zároveň negativními regulátory hydrolyzy GTP z eIF2. Po jejich přeskupení může dojít k hydrolyze GTP z eIF2, která je způsobena eIF5, a tím dojde k odpojení tohoto faktoru a většiny ostatních faktorů od komplexu. To umožní připojení 60S podjednotky ke komplexu. Proces připojení velké podjednotky je podporován vazbou GTP na eIF5B. Následně dojde k vytvoření 80S iniciačního komplexu (Maag et al. 2005). Část faktorů se definitivně odpojí až při připojení 60S podjednotky (Pisarev et al. 2006).

5.2 eIF4F komplex

Každá eukaryotická buněčná mRNA obsahuje na svém 5'konci čepičku (m⁷GpppN; kde N je jakýkoli nukleotid a m je methylová skupina) (Morino et al. 2000). Čepička hraje významnou roli pro mRNA. Kromě role v iniciaci translace funguje čepička jako stabilizátor jaderné mRNA a cytoplazmatické mRNA (Green, Maniatis and Melton 1983). Mezi další funkce patří role při jaderno-cytoplasmatickém transportu, pomoc při sestřihu pre-mRNA. eIF4F komplex je složen ze tří podjednotek – eIF4A, eIF4E a eIF4G (Morino et al. 2000). eIF4F komplex je zodpovědný za připojení mRNA na ribozom a díky interakcím mezi podjednotkami i za úspěšné zahájení iniciace translace.



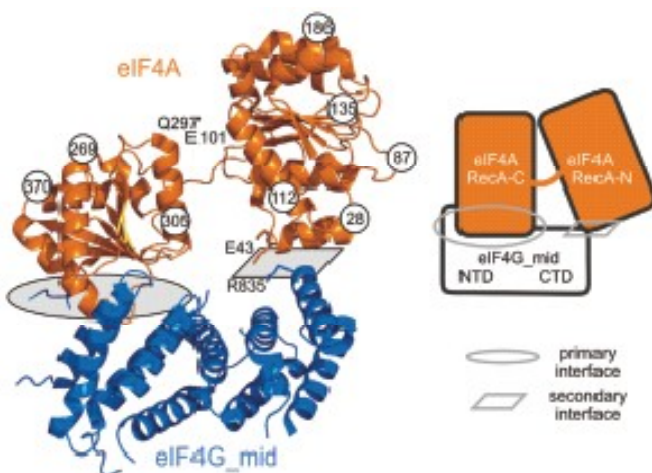
Obr. 6 Navázání iniciačního komplexu na 5'čepičku. eIF4E se naváže na 5'čepičku (znázorněna jako černá tečka). Následně dojde k navázání eIF4G proteinu na dorzální stranu eIF4E proteinu. PABP (poly(A)-,binding“ protein) se váže na N- konec eIF4G, Mnk a eIF4A vazebná místa se nacházejí na C konci. Na střední části eIF4G dochází k navázání eIF3. Tento faktor následně zabezpečuje navázání 40S podjednotky ribozomu. Na 40S podjednotce ribozomu je navázán eIF2 spolu iniciátorovou Met-tRNA^{Met}. Následně dochází k aktivaci eIF4A helikázy. eIF4B (je kofaktor, který je potřeba pro správnou aktivaci eIF4A helikázy) se připojuje k eIF4F-mRNA komplexu. Díky eIF4A dochází k rozvinutí sekundární struktury na 5'-UTR oblasti a dochází ke skenování, dokud nedojde k nalezení AUG iniciačního kodonu. (Scheper and Proud 2002)

5.2.1 eIF4E

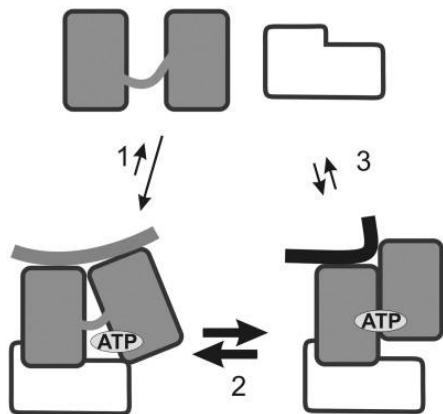
eIF4E je malý protein o velikosti 24kDa. Váže se na čepičku a je zodpovědný za připojení mRNA ke zbytku translačního aparátu (Frederickson, Montine and Sonenberg 1991). eIF4E má fosforylační místo na Ser209. Fosforylace eIF4E zvyšuje afinitu k čepičce. Toto místo je fosforylováno dvěma specifickými kinázami. Tyto kinázy jsou MNK1 (MAP kinase interacting protein 1) a PKC (protein kinase C) (Whalen et al. 1996). MNK1 kináza je substrát ERK a p38 MAPK kináz (Waskiewicz et al. 1997). Na eIF4E se mohou vázat proteiny z rodiny translačních represorových proteinů (tzv. „4E-binding proteins“; 4E-BP). Interakce s 4E-BP brání začlenění eIF4E do aktivního iniciačního komplexu a tím dochází k inhibici na čepičce závislé translaci. Tato inhibice je způsobena fosforylací 4E-BP1, která probíhá PI3K-Akt-mTOR dráhou. eIF4E je důležitou molekulou při iniciaci translace. Navázání 4E-BP na eIF4E nezmění afinitu eIF4E k čepičce, ale zabraňuje vazbě mezi eIF4G a eIF4E, a tím nedojde k vytvoření aktivního eIF4F komplexu (Haghighat et al. 1995). 4E-BP a eIF4G sdílejí stejný eIF4E vazebný motiv YXXXXLφ (kde X je jakákoli aminokyselina a φ je hydrofobní aminokyselinový zbytek) (Mader et al. 1995).

5.2.2 eIF4A

Tato RNA dependentní ATPáza má velikost 45kDa a patří do rodiny DEAD – box RNA helikáz. DEAD box je motiv složený z aminokyselinových zbytků: Asp-Glu-Ala-Asp. Společně s eIF4B je eIF4A zapojen do rozvinutí sekundární struktury v 5' UTR závislém na ATP (Rogers, Komar and Merrick 2002). eIF4A je složena ze dvou RecA domén, které obsahují motivy, které se účastní navázání a hydrolýzy ATP (Sengoku et al. 2006). V neaktivní otevřené konformaci má protein činkovitý tvar - RecA domény jsou spojené flexibilní částí proteinu a nedochází k interdoménovým kontaktům. eIF4A je navázána na mRNA pomocí eIF4G (Dominguez et al. 1999). Primární spojení je vytvořeno mezi C-terminální RecA doménou a na N-terminální doménou eIF4G. Sekundární spojení je následně vytvořeno mezi N-terminální RecA doménou a C-terminální částí eIF4G (viz. obr.7). RecA domény se díky navázání na eIF4G přiblíží (Hilbert et al. 2011). V uzavřené aktivní konformaci dochází ke zrušení sekundárního spojení mezi N-terminální doménou RecA a eIF4G, jelikož dochází k přiblížení obou RecA podjednotek eIF4A. Nedojde ke vzniku vazeb mezi nimi, ale podjednotky jsou daleko blíže než v otevřené konformaci (viz. obr.8) (Caruthers, Johnson and McKay 2000). V tomto případě eIF4G zabraňuje N-terminální doméně eIF4A k příliš velkému oddálení od C-terminální domény RecA (Schutz et al. 2008).



Obr. 7 Schéma interakce mezi eIF4A a eIF4G. eIF4A je složena ze dvou RecA podjednotek. K primárnímu spojení dochází mezi C-terminální RecA doménou a N-terminální doménou eIF4G. Následně dochází ke vzniku sekundárního spojení mezi N-terminální RecA doménou a C-terminální doménou eIF4G. (Hilbert et al. 2011)

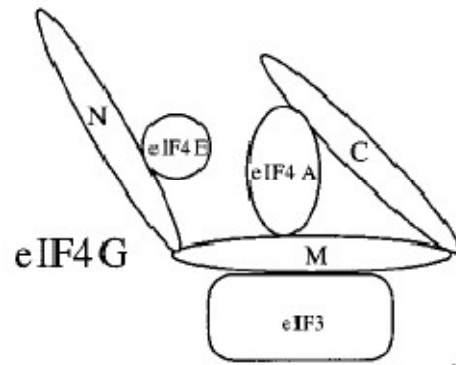


Obr. 8 Model konformačních změn eIF4A při vlivu eIF4G. Na horním obrázku je otevřená konformace, vpravo dole zavřená konformace a vlevo dole polootevřená konformace. Při nepřítomnosti eIF4G nastává pouze situace 3 – kdy dochází k výměně mezi otevřenou a zavřenou formou. Při přítomnosti eIF4G dochází k fixaci eIF4A v polootevřené formě, jelikož zabraňuje k přiblížení podjednotek. eIF4G napomáhá k rychlým cyklickým změnám mezi uzavřenou formou a polootevřenou formou. Po navázání ATP na RecA domény spustí RNA tvorbu uzavřené aktivní konformace. Poté dojde k hydrolýze ATP na ADP+P. Tato reakce od sebe oddálí obě podjednotky, dojde k uvolnění mRNA a uvolnění fosfátu. (Hilbert et al. 2011)

5.2.3 eIF4G

Eukaryotický iniciační faktor 4 gamma je spolu s eIF4A a eIF4E součástí eIF4F komplexu. eIF4G je „scaffolding“ protein, který hraje důležitou roli při interakcích mezi translačními faktory a malou ribozomální podjednotkou během iniciační fáze syntézy proteinů. Na svém N-konci obsahuje eIF4G vazebné místo pro PABP. Vazba mezi eIF4G a PABP způsobí zacyklení mRNA (viz. obr.9). Součástí N-terminální domény je také místo pro vazbu eIF4E. Ve střední části obsahuje eIF4G protein vazebný motiv pro eIF4A a eIF3. Jsou známé dvě izoformy eIF4GI a eIF4GII. Obě tyto izoformy obsahují na C-konci druhé vazebné místo pro eIF4A a spolu s ním je zde vazebné místo pro Mnk1 (Marcotrigiano et al. 2001). eIF4GI je protein o velikosti 171 kDa. eIF4GII, který je 176 kDa velký, má 46% identitu s eIF4GI izoformou (Morino et al. 2000).

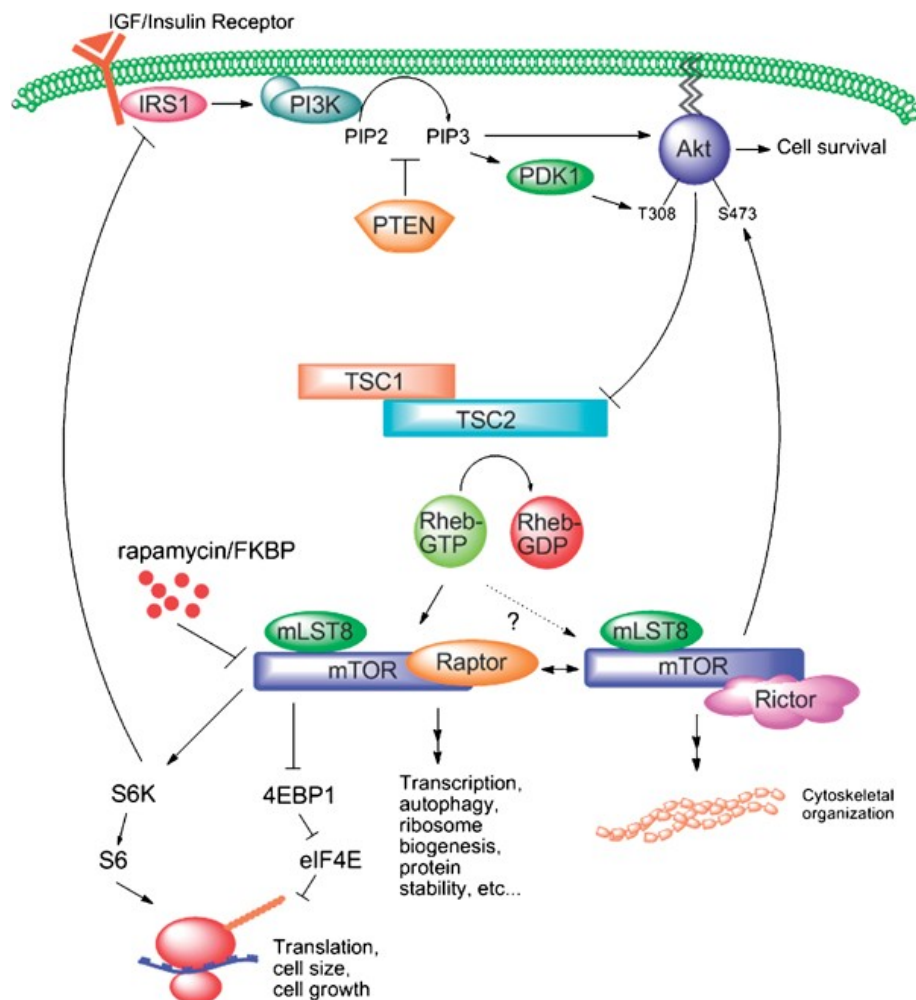
eIF4G nejenom váže na sebe jiné proteiny, ale často i zlepšuje jejich funkci. V předešlé kapitole jsem již zmínila vliv eIF4G na eIF4A. Zvýšená hladina eIF4E podporuje onkogenezi. Fosforylace eIF4E na Ser209 je zodpovědná za jeho kancerogenní potenciál. Tato fosforylace je katalyzovaná „mitogen-activated“ protein kinázou Mnk1, substrát Erk1/2 a p38 MAPKs. Vazba s eIF4G, který váže i eIF4E, dostane Mnk1 a její substráty do fyzické blízkosti. Vazba mezi Mnk a eIF4G je důležitá pro fosforylaci eIF4E. MAPK zprostředkovaná fosforylace aktivního místa Mnk1 kontroluje vazbu na eIF4G, jelikož C-terminální doména Mnk1 omezuje interakci s eIF4G, a tím brání fosforylaci eIF4E v nepřítomnosti MAPK signálu (Pyronnet 2000, Pyronnet et al. 1999).



Obr. 9 Model interakce eIF4G s iniciačními faktory. (Imataka and Sonenberg 1997)

6 Regulace mTOR

mTOR dráha je regulována několika faktory – výskytem aminokyselin, živin, růstových faktorů či stresovým statutem. Zmíněné faktory následně ovlivňují proteiny, které se podílejí na mTOR signální dráze. Přítomnost intracelulárních aminokyselin reguluje fosforylaci S6K1 (viz. kap.6.5) a 4E-BP1 (viz. kap.6.6) (Christie et al. 2002). Tyto substráty regulují syntézu proteinů. Insulin patří do skupiny růstových faktorů, které ovlivňují mTOR dráhu. Přítomnost insulinu je důležitý signál pro insulinový receptor v membráně, což vede k aktivaci IRS1 a PI3K. Lipidové molekuly PI3K nebo PIP₃ dokáží navázat Akt či PDK1 na plasmatickou membránu. Dále dochází k aktivaci signálních proteinů, které jsou popsány v dalších kapitolách.



Obr. 10 Schéma regulace mTOR. (Corradetti and Guan 2006)

6.1 TSC1 a TSC2

TSC je dominantně autozomální onemocnění, které je způsobeno nádorovými supresorovými geny TSC1 a TSC2 (1993).

Tyto dva proteiny spolu interagují za vzniku TSC1-TSC2 heterodimeru. TSC1-TSC2 komplex je negativním regulátorem mTORC1 komplexu (Yang et al. 2006). TSC2 obsahuje na svém N-konci leucinový zip, který slouží pro interakci s TSC1. TSC1 stabilizuje celý komplex a roli regulátora má TSC2.

TSC1 („Tuberous sclerosis complex 1“) je gen na 9q34 chromosomu. Transkript genu *TSC1*, který má velikost 8,6 kbp, kóduje mimo jiné TSC1 protein, známý i pod názvem hamartin, o velikosti 130kDa (van Slegtenhorst et al. 1997).

TSC2 („Tuberous sclerosis complex 2“) je gen na 16p13.3 chromosomu (Leung and Robson 2007), který kóduje protein TSC2, který se nazývá tuberin (van Slegtenhorst et al. 1997). Tuberin je protein o velikosti 190kDa a obsahuje 1784 aa. TSC2 má GTPázovou aktivitu, která se aktivuje až po navázání na GTP-Rheb protein. Následně dochází k hydrolyze z GTP na GDP. Rheb v komplexu s GTP není aktivní.

6.2 Akt (protein „kinasa“ B/PKB)

Akt je také jinak označována jako serin/threonin protein kináza B (PKB). Akt je jedna z nejdůležitějších „survive“ kináz.

Pro správnou aktivaci musí být Akt fosforylována na dvou místech kinázami PDK1 a PDK2. PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase – 1) fosforyluje Akt na dvou místech. První je na straně aktivační smyčky na Thr308 a druhé fosforylační místo je Ser473 (Andjelkovic et al. 1997), které je fosforylováno také mTORC2. Pro úplnou aktivaci Akt kinázy musí dojít k fosforylaci na obou místech (Belham, Wu and Avruch 1999, Toker and Newton 2000). PDK1 je 556 aa velký protein s karboxy-terminální katalytickou doménou a amino-terminální doménou, která je nekatalytická a obsahuje PH domény. PH domény umožňují navázání na fosfatidylinositol (3,4) bifosfát (PIP2) a na fosfatidylinositol (3,4,5) trifosfát (PIP3). Fosforylace na Thr308 je zcela závislá na PIP₃. Pro lepší funkci dochází k navázání Akt/PKB na PIP₃, tím dochází k navázání na plasmatickou membránu a ke konformačním změnám, což zlepšuje přístupnost Thr308 pro PDK1 (Belham et al. 1999).

6.3 PRAS-40

PRAS-40 („proline-rich“ Akt/PKB „substrate“ 40 kDa) je protein o velikosti 40 kDa, který se váže na raptor. Jedná se o negativního regulátora mTORC1, pokud dojde k jeho navázání. Rozvolnění této vazby je způsobeno přítomností insulínu (Wang, Harris and Lawrence 2008). PRAS-40 obsahuje TOS motiv (viz. kap.6.4.1), který se skládá z aminokyselinových zbytků FVMDE (Phe-Val-Met-Asp-Glu) a se nachází mezi aa 129-133. Tento motiv je důležitý pro interakci mezi raptorem a PRAS-40. Pokud dojde k navázání na raptor, nemůže se na raptor navázat jiný protein obsahující TOS motiv (4E-BP1 nebo S6K1), a tím dochází k inhibici dalších dějů (Wang et al. 2007). Je známo, že dochází k fosforylaci pomocí Akt/PKB na C-konci (Thr246) PRAS-40 (viz. obr.11). Sama aktivace Akt je dostačující k fosforylaci PRAS-40. PRAS-40 reguluje zastavení buněčného cyklu, inhibici fosforylace S6K1 a aktivaci mTORC1 proteinem Rheb (Kovacina et al. 2003).



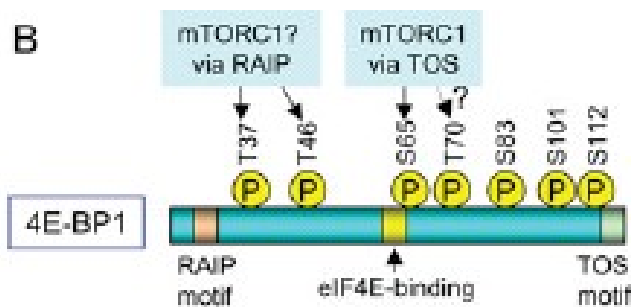
Obr. 11 Schéma PRAS-40. (Kovacina et al. 2003)

6.4 „Downstream“ regulace

mTOR je důležitým proteinem, který reguluje proces iniciace translace. Kontroluje a reguluje aktivaci S6 kinázy 1 a 2. Zároveň kontroluje inhibici eukaryotického iniciačního faktoru 4E (eIF4E) pomocí 4E-vazebných proteinů 1, 2 a 3 (4E-BP1/2/3) (Schalm and Blenis 2002). Aktivace (fosforylace) těchto substrátů je závislá na obsahu insulínu, růstových faktorů a dále může být závislá na přítomnosti aminokyselin. Hladovění na aminokyseliny způsobuje rychlé snížení mTOR signalizace např. dochází k defosforylaci 4E-BP1 a S6K1. Zároveň insulín, jako signál pro fosforylace, nemůže plně provádět svoji funkci. Největší efekt na správnou funkci má leucin. Při nedostatku leucinu nedochází k fosforylaci, a tím k aktivaci S6K1, ale zároveň nedostatek leucinu ovlivňuje dostupnost eIF4E při iniciaci translace (Kimball et al. 1999).

6.4.1 TOS motiv (TOR “signaling motif”)

Jedná se o společný motiv S6K1 a 4E-BP1. TOS motiv je esenciální pro přímou fosforylaci mTORC1 komplexu. Je zároveň nezbytnou součástí pro interakci mezi raptorem a S6K1 nebo 4E-BP1. Tento motiv je složen z pěti za sebou jdoucích aminokyselin (Schalm and Blenis 2002) a u různých proteinů se může ve složení aminokyselin lišit. U S6K1 se jedná o následující aminokyseliny: FDIDL (Phe-Asp-Ile-Asp-Leu). U S6K2 jde o FDLDL (Phe-Asp-Leu-Asp-Leu) (Proud 2007). Ve všech kinázách S6K se tento motiv vyskytuje na N terminálním konci, ale u 4E-BP1 se tento motiv nachází na C terminálním konci (Schalm et al. 2003). TOS motiv je u všech 4E-BPs stejný. Skládá se z těchto pěti aminokyselin FEMDI (Phe-Glu-Met-Asp-Ile). K fosforylaci na 4E-BP1 dochází na Thr37/46, Ser65 a Thr70. S TOS motivem souvisí pouze fosforylace Ser65 a Thr70 (viz. obr.12), Thr37 a Thr65 jsou místa, kde dochází k fosforylaci RAIP (Arg-Ala-Ile-Pro) motivem (viz kap.6.4.2).



Obr. 12 Schema 4E-BP1 s vyznačeným TOS motivem a fosforylačními místy. (Proud, 2007)

Při mutaci či delecii v této oblasti dochází k inhibici aktivace S6K1 a tím nedojde k fosforylaci Thr389 v hydrofobním motivu (Schalm and Blenis 2002).

6.4.2 RAIP motiv

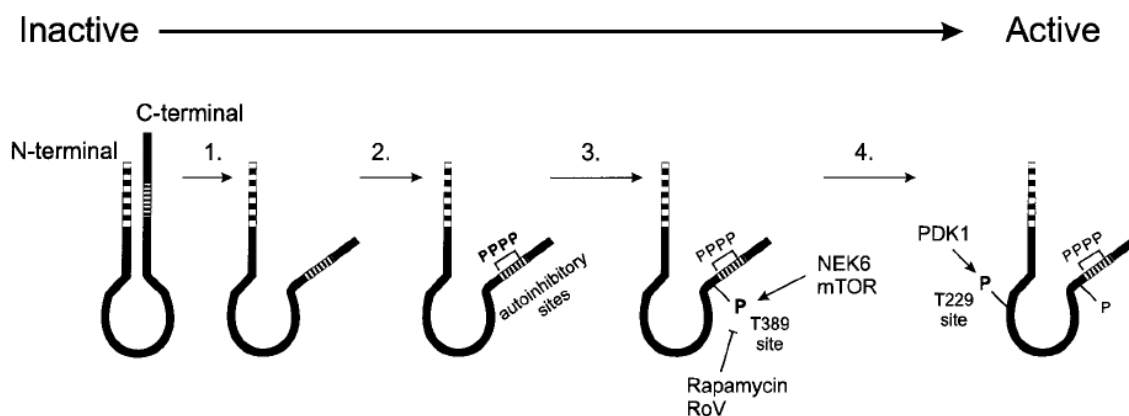
RAIP motiv a TOS motiv patří do jedné skupiny regulátorů 4E-BP1. RAIP motiv byl identifikován na základě procesu, kde probíhá kaspázami regulovaný sestřih 4E-BP1. Dochází k odstranění prvních 24 aminokyselinových zbytků, což znemožňuje regulaci 4E-BP1 insulinem, ale schopnost 4E-BP vázat se na čepičku zůstává zachována. Tím dochází

k inhibici na čepičce závislé translaci (Tee and Proud 2002). Název RAIP motivu je odvozen z názvů prvních čtyř vystřižených aminokyselinových zbytků: Arg-Ala-Ile-Pro, což jsou rozhodující aminokyseliny pro funkci RAIP motivu (Schalm and Blenis 2002).

Mezi fosforylací TOS motivem a RAIP motivem je velký rozdíl. Ser65 a Ser70 nemohou být fosforylovány při nedostatku živin v buňce. Může docházet ke zvýšení aktivity v přítomnosti insulinu a tato fosforylace je rapamycin senzitivní. Naopak Thr37 a Thr46 jsou na TOS motivu nezávislé, ale vyžadují již zmíněný RAIP motiv. RAIP motiv je závislý na přítomnosti aminokyselin a necitlivý na rapamycin (Wang et al. 2005).

6.5 S6 kináza 1

Jedná se o protein o velikosti 70kDa. Pokud dojde k přenesení signálu z mTOR dojde k fosforylaci a následné aktivaci S6K1. Aktivace S6K1 zahrnuje několik konformačních změn a fosforylací (viz. obr.13). První krok aktivace je uvolnění vazby mezi C-terminální doménou a N-terminální doménou. Na C-terminální doméně se vyskytují čtyři fosforylační místa - Ser-411, Ser-418, Ser-424 a Thr-421, která jsou fosforylována prolin-řízenými kinázami. Fosforylace těchto míst je důležitá pro další krok aktivace, kde dojde k fosforylaci Thr-389 v hydrofobním motivu, který se nachází ve všech AGC kinázách. Jako poslední krok aktivace je fosforylace Thr-229 PDK1 (Hannan, Thomas and Pearson 2003). S6K1 následně fosforyluje S6 protein, který se nachází na malé 40S podjednotce eukaryotického ribozomu. Tento proces způsobuje zvýšení rychlosti mRNA translace. Rapamycin způsobuje inhibici fosforylace a aktivace S6K1 a tím dochází i k inhibici fosforylace ribozomálního S6 proteinu (Jefferies et al. 1997).

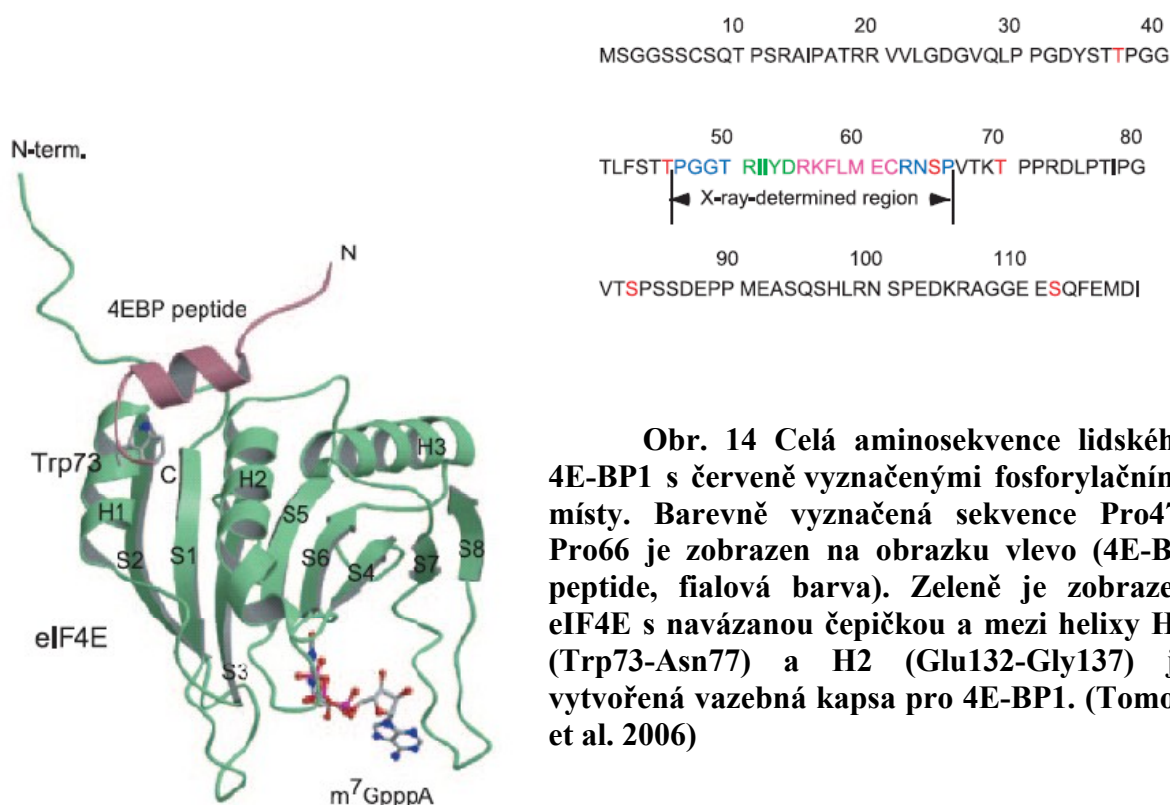


Obr. 13 Model aktivace S6K1. V první kroku se musí zrušit interakce mezi C-terminálním a N-terminálním koncem. Poté dojde k fosforylaci na 4 místech na C-terminální doméně (označeno PPPP). Následuje fosforylace na Thr389 a jako poslední dochází k fosforylaci na Thr229. Tím dojde k plné aktivaci S6K1. (Hannan et al. 2003)

6.6 4E „binding“ protein 1 / PHAS-I

4E-BP1 je rapamycin senzitivní protein o velikosti 12kDa. Tento polypeptid se váže na eIF4E. eIF4E se váže na čepičku na 5'konci mRNA (viz. kap.5.2.1) Navázání 4E-BP1 na eIF4E zabraňuje následné vazbě mezi tímto proteinem a mezi dalším eukaryotickým iniciačním faktorem eIF4G. 4E-BP1 a eIF4G spolu soutěží o vazebné místo na eIF4E. 4E-BP1 zabraňuje iniciaci translace, když inhibuje tvorbu 48S pre-iniciačního komplexu. Tento proces se označuje jako inhibice na čepičce závislé iniciace translace (Haghighat et al. 1995).

Thr37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83, Ser101 a Ser112 je sedm fosforylačních míst na 4E-BP1 u *Homo sapiens*. Thr37, Thr46, Ser65, Thr70 jsou regulovány signálními drahami. Nejprve dochází k fosforylaci na Thr70, což vede k fosforylaci Thr37, Thr46. Jako poslední je fosforylován Ser65 (Ayuso et al. 2010). Ser65 má největší vliv pro vazbu mezi 4E-BP1 a eIF4E. Je to způsobeno vznikem vodíkových můstků mezi Ser65 a Asn77 ve vazebné kapse eIF4E (Tomoo et al. 2006).



Obr. 14 Celá aminosekvence lidského 4E-BP1 s červeně vyznačenými fosforylačními místy. Barevně vyznačená sekvence Pro47-Pro66 je zobrazena obrázku vlevo (4E-BP peptide, fialová barva). Zeleně je zobrazen eIF4E s navázanou čepičkou a mezi helixy H1 (Trp73-Asn77) a H2 (Glu132-Gly137) je vytvořená vazebná kapsa pro 4E-BP1. (Tomoo et al. 2006)

Fosforylace translačních represorů 4E-BP1 závislá na mTOR vede k jejich disociaci od eIF4E, to způsobuje zvýšenou tvorbu komplexu eIF4F (Zindy et al. 2011).

Insulin je pozitivním regulátorem iniciace translace, protože patří mezi signály zvyšující fosforylaci 4E-BP1, tím dochází ke snížení afinity pro navázání na eIF4E. Jako příklad bych uvedla práci Bhandari et al. 2001, kde se dokazuje vliv insulinu na fosforylaci 4E-BP1. Na Western blotu byly objeveny 3 izoformy 4E-BP1 – α , β , γ . Nefosforylovaná α izoforma se nejrychleji pohybuje a váže se na eIF4E s největší afinitou. β izoforma, která je hyperfosforylovaná se pohybuje pomaleji a na eIF4E se váže s nízkou afinitou. γ izoforma, která se pohybuje nejpomaleji ze tří uvedených izoform, je nejvíce fosforylována a na eIF4E se neváže (Bhandari et al. 2001).

Jeden z nových klinických výzkumů je zaměřen na vliv enzastaurinu, což je syntetická látka s potencionální protinádorovou aktivitou. Enzastaurin potlačuje abiogenezi a indukuje apoptózu u různých nádorových buněčných linií, tím že dochází k inhibici PKC/PI3K/Akt signální dráhy. Tím dochází k udržení 4E-BP1 na eIF4E a dochází k inhibici eIF4F komplexu (Dumstorf et al. 2010). Tato klinická studie je jednou z mnoha, které se zbývají problematikou vzniku nádorů a možnosti jejich léčení pomocí ovlivnění eIF4F komplexu.

7 Závěr

mTOR dráha a její význam v buňce se ukázala tématem velmi rozsáhlým, ale zcela jistě zasluhujícím pozornost. Tato bakalářská práce nabízí nahlédnutí do této problematiky. Práce v první části shromáždila dostupné informace o struktuře mTOR proteinu, který se skládá z několika domén – od N-terminálního konce HEAT motivy, FAT doména, FRB doména, kinázová doména, NRD doména a na C-terminálním konci FATC doména. Každá z těchto domén má svou funkci pro správnou aktivaci či inhibici mTOR proteinu. Je známo, že mTOR protein je součástí dvou komplexů mTORC1 a mTORC2. Tyto komplexy se liší interagujícími proteiny. mTORC1 na sebe váže raptor a LST8. LST8 je protein, který se vyskytuje i u komplexu mTORC2. Mezi další proteiny mTORC2 patří rictor, Sin1 a PRR5.

V druhé části jsem přiblížila průběh iniciace translace a význam eIF4F komplexu v ní.

Poslední část je zaměřena na regulaci mTOR dráhy. V této práci jsem se chtěla zaměřit na regulaci mTORC1 komplexu na iniciaci translace, kdy dochází k zablokování vazebného místa na eIF4E, na které se vážou proteiny eIF4G a 4E-BP. Represorový protein 4E-BP při navázání na eIF4E způsobuje inhibici iniciace translace, jelikož nedojde k vytvoření aktivního eIF4F komplexu. V této dráze je několik dalších regulačních proteinů, například TSC1, TSC2, Akt/PKB, PRAS-40.

Tato problematika má využití i v klinické praxi. Zde dochází k vývoji farmaceutických látek, které mají protinádorové vlastnosti. Jako příklad bych mohla uvést výrobu nových analogů rapamycinu (inhibitor mTORC1 aktivity) – temsirolimus, everolimus a deforolimus. Klinické testy prokazují velký význam těchto rapamycinových analogů v léčbě zhoubných nádorů.

8 Použitá literatura

- Andjelkovic, M., D. R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N. J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J. M. Lucocq & B. A. Hemmings (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, 272, 31515-24.
- Andrade, M. A. & P. Bork (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*, 11, 115-6.
- Ayuso, M. I., M. Hernandez-Jimenez, M. E. Martin, M. Salinas & A. Alcazar. (2010). New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. In *J Biol Chem*, 34355-63. United States.
- Belham, C., S. Wu & J. Avruch. (1999). Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. In *Curr Biol*, R93-6. England.
- Benne, R. & J. W. Hershey (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, 253, 3078-87.
- Bhandari, B. K., D. Feliers, S. Duraisamy, J. L. Stewart, A. C. Gingras, H. E. Abboud, G. G. Choudhury, N. Sonenberg & B. S. Kasinath. (2001). Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. In *Kidney Int*, 866-75. United States.
- Bosotti, R., A. Isacchi & E. L. Sonnhammer. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. In *Trends Biochem Sci*, 225-7. England.
- Brunn, G. J., C. C. Hudson, A. Sekulic, J. M. Williams, H. Hosoi, P. J. Houghton, J. C. Lawrence, Jr. & R. T. Abraham (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 277, 99-101.
- Caruthers, J. M., E. R. Johnson & D. B. McKay. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 13080-5. United States.
- Choi, J., J. Chen, S. L. Schreiber & J. Clardy (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, 273, 239-42.
- Christie, G. R., E. Hajduch, H. S. Hundal, C. G. Proud & P. M. Taylor. (2002). Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. In *J Biol Chem*, 9952-7. United States.
- Corradetti, M. N. & K. L. Guan. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? In *Oncogene*, 6347-60. England.
- Dames, S. A., J. M. Mulet, K. Rathgeb-Szabo, M. N. Hall & S. Grzesiek. (2005). The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. In *J Biol Chem*, 20558-64. United States.
- Dominguez, D., M. Altmann, J. Benz, U. Baumann & H. Trachsel (1999) Interaction of translation initiation factor eIF4G with eIF4A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274, 26720-6.
- Dumont, F. J. & Q. Su. (1996). Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. In *Life Sci*, 373-95. England.

- Dumstorf, C. A., B. W. Konicek, A. M. McNulty, S. H. Parsons, L. Furic, N. Sonenberg & J. R. Graff. (2010). Modulation of 4E-BP1 function as a critical determinant of enzastaurin-induced apoptosis. In *Mol Cancer Ther*, 3158-63. United States: 2010 Aacr.
- Fingar, D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou & J. Blenis (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 24, 200-16.
- Frederickson, R. M., K. S. Montine & N. Sonenberg (1991) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is increased in Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol*, 11, 2896-900.
- Green, M. R., T. Maniatis & D. A. Melton. (1983). Human beta-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in *Xenopus* oocyte nuclei. In *Cell*, 681-94. United States.
- Haghighat, A., S. Mader, A. Pause & N. Sonenberg (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J*, 14, 5701-9.
- Hannan, K. M., G. Thomas & R. B. Pearson. (2003). Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. In *Biochem J*, 469-77. England.
- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch & K. Yonezawa. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. In *Cell*, 177-89. United States.
- Hay, N. & N. Sonenberg. (2004). Upstream and downstream of mTOR. In *Genes Dev*, 1926-45. United States.
- Heitman, J., N. R. Movva & M. N. Hall (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- Hilbert, M., F. Kebbel, A. Gubaev & D. Klostermeier. (2011). eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism. In *Nucleic Acids Res*, 2260-70. England.
- Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. (1993) In *Cell*, 1305-15. United States.
- Imataka, H. & N. Sonenberg (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol*, 17, 6940-7.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall & M. N. Hall. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In *Nat Cell Biol*, 1122-8. England.
- Jefferies, H. B., S. Fumagalli, P. B. Dennis, C. Reinhard, R. B. Pearson & G. Thomas (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, 16, 3693-704.
- Johnstone, C. N., S. Castellvi-Bel, L. M. Chang, R. K. Sung, M. J. Bowser, J. M. Pique, A. Castells & A. K. Rustgi. (2005). PRR5 encodes a conserved proline-rich protein

- predominant in kidney: analysis of genomic organization, expression, and mutation status in breast and colorectal carcinomas. In *Genomics*, 338-51. United States.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & D. M. Sabatini. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. In *Cell*, 163-75. United States.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & D. M. Sabatini. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. In *Mol Cell*, 895-904. United States.
- Kimball, S. R., L. M. Shantz, R. L. Horetsky & L. S. Jefferson (1999) Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*, 274, 11647-52.
- Koltin, Y., L. Faucette, D. J. Bergsma, M. A. Levy, R. Cafferkey, P. L. Koser, R. K. Johnson & G. P. Livi (1991) Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol Cell Biol*, 11, 1718-23.
- Kovacina, K. S., G. Y. Park, S. S. Bae, A. W. Guzzetta, E. Schaefer, M. J. Birnbaum & R. A. Roth. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. In *J Biol Chem*, 10189-94. United States.
- Leung, A. K. & W. L. Robson. (2007). Tuberous sclerosis complex: a review. In *J Pediatr Health Care*, 108-14. United States.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman & S. L. Schreiber. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. In *Cell*, 807-15. United States.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe & M. N. Hall. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. In *Mol Cell*, 457-68. United States.
- Ma, D., X. Bai, H. Zou, Y. Lai & Y. Jiang. (2010). Rheb GTPase controls apoptosis by regulating interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Bcl-XL. In *J Biol Chem*, 8621-7. United States.
- Maag, D., C. A. Fekete, Z. Gryczynski & J. R. Lorsch. (2005). A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. In *Mol Cell*, 265-75. United States.
- Mader, S., H. Lee, A. Pause & N. Sonenberg (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 Cell Biol*, 15, 4990-7.
- Marcotrigiano, J., I. B. Lomakin, N. Sonenberg, T. V. Pestova, C. U. Hellen & S. K. Burley. (2001). A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. In *Mol Cell*, 193-203. United States.
- Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo & D. J. Klionsky. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. In *Nature*, 1069-75. England.

- Morino, S., H. Imataka, Y. V. Svitkin, T. V. Pestova & N. Sonenberg (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol*, 20, 468-77.
- Noda, T. & Y. Ohsumi (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273, 3963-6.
- Ochotorena, I. L., D. Hirata, K. Kominami, J. Potashkin, F. Sahin, K. Wentz-Hunter, K. L. Gould, K. Sato, Y. Yoshida, L. Vardy & T. Toda (2001) Conserved Wat1/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *J Cell Sci*, 114, 2911-20.
- Oshiro, N., K. Yoshino, S. Hidayat, C. Tokunaga, K. Hara, S. Eguchi, J. Avruch & K. Yonezawa. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. In *Genes Cells*, 359-66. England.
- Pestova, T. V. & V. G. Kolupaeva (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev*, 16, 2906-22.
- Pisarev, A. V., V. G. Kolupaeva, V. P. Pisareva, W. C. Merrick, C. U. Hellen & T. V. Pestova. (2006). Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. In *Genes Dev*, 624-36. United States.
- Powers, T. & P. Walter (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 10, 987-1000.
- Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. In *Biochem J*, 217-34. England.
- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. In *Biochem Pharmacol*, 1237-43. England.
- Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter & N. Sonenberg (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J*, 18, 270-9.
- Rodgers, B. D., M. A. Levine, M. Bernier & C. Montrose-Rafizadeh. (2001). Insulin regulation of a novel WD-40 repeat protein in adipocytes. In *J Endocrinol*, 325-32. England.
- Rogers, G. W., Jr., A. A. Komar & W. C. Merrick (2002) eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72, 307-31.
- Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst & S. H. Snyder. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. In *Cell*, 35-43. United States.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali & D. M. Sabatini. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In *Science*, 1098-101. United States.
- Schalm, S. S. & J. Blenis. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. In *Curr Biol*, 632-9. England.

- Schalm, S. S., D. C. Fingar, D. M. Sabatini & J. Blenis. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. In *Curr Biol*, 797-806. England.
- Scheper, G. C. & C. G. Proud. (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? In *Eur J Biochem*, 5350-9. Germany.
- Schroder, W., N. Cloonan, G. Bushell & T. Sculley. (2004). Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. In *Gene*, 17-23. Netherlands.
- Schroder, W. A., M. Buck, N. Cloonan, J. F. Hancock, A. Suhrbier, T. Sculley & G. Bushell. (2007). Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. In *Cell Signal*, 1279-89. England.
- Schutz, P., M. Bumann, A. E. Oberholzer, C. Bieniossek, H. Trachsel, M. Altmann & U. Baumann. (2008). Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 9564-9. United States.
- Sengoku, T., O. Nureki, A. Nakamura, S. Kobayashi & S. Yokoyama. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. In *Cell*, 287-300. United States.
- Shiota, C., J. T. Woo, J. Lindner, K. D. Shelton & M. A. Magnuson. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. In *Dev Cell*, 583-9. United States.
- Siekierka, J. J., S. H. Hung, M. Poe, C. S. Lin & N. H. Sigal (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341, 755-7.
- Tee, A. R. & C. G. Proud (2002) Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. *Mol Cell Biol*, 22, 1674-83.
- Toker, A. & A. C. Newton. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. In *Cell*, 185-8. United States.
- Tomoo, K., F. Abiko, H. Miyagawa, K. Kitamura & T. Ishida. (2006). Effect of N-terminal region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide. In *J Biochem*, 237-46. Japan.
- Unbehaun, A., S. I. Borukhov, C. U. Hellen & T. V. Pestova. (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. In *Genes Dev*, 3078-93. United States.
- van Slegtenhorst, M., R. de Hoogt, C. Hermans, M. Nellist, B. Janssen, S. Verhoef, D. Lindhout, A. van den Ouweland, D. Halley, J. Young, M. Burley, S. Jeremiah, K. Woodward, J. Nahmias, M. Fox, R. Ekong, J. Osborne, J. Wolfe, S. Povey, R. G. Snell, J. P. Cheadle, A. C. Jones, M. Tachataki, D. Ravine, J. R. Sampson, M. P. Reeve, P. Richardson, F. Wilmer, C. Munro, T. L. Hawkins, T. Sepp, J. B. Ali, S. Ward, A. J. Green, J. R. Yates, J. Kwiatkowska, E. P. Henske, M. P. Short, J. H. Haines, S. Jozwiak & D. J. Kwiatkowski (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 277, 805-8.

- Vezina, C., A. Kudelski & S. N. Sehgal (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28, 721-6.
- Vilella-Bach, M., P. Nuzzi, Y. Fang & J. Chen (1999) The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J Biol Chem*, 274, 4266-72.
- Wang, L., T. E. Harris & J. C. Lawrence, Jr. (2008). Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. In *J Biol Chem*, 15619-27. United States.
- Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth & J. C. Lawrence, Jr. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. In *J Biol Chem*, 20036-44. United States.
- Wang, X., A. Beugnet, M. Murakami, S. Yamanaka & C. G. Proud. (2005). Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. In *Mol Cell Biol*, 2558-72. United States.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud & J. A. Cooper (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J*, 16, 1909-20.
- Whalen, S. G., A. C. Gingras, L. Amankwa, S. Mader, P. E. Branton, R. Aebersold & N. Sonenberg (1996) Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem*, 271, 11831-7.
- Wilkinson, M. G., T. S. Pino, S. Tournier, V. Buck, H. Martin, J. Christiansen, D. G. Wilkinson & J. B. Millar (1999) Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J*, 18, 4210-21.
- Woo, S. Y., D. H. Kim, C. B. Jun, Y. M. Kim, E. V. Haar, S. I. Lee, J. W. Hegg, S. Bandhakavi & T. J. Griffin. (2007). PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. In *J Biol Chem*, 25604-12. United States.
- Yang, Q., K. Inoki, E. Kim & K. L. Guan.(2006). TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6811-6. United States.
- Yonezawa, K., C. Tokunaga, N. Oshiro & K. Yoshino. (2004). Raptor, a binding partner of target of rapamycin. In *Biochem Biophys Res Commun*, 437-41. United States.
- Zindy, P., Y. Berge, B. C. Allal, T. Filleron, S. Pierredon, A. Cammas, S. Beck, L. Mhamdi, L. Fan, G. Favre, J. P. Delord, H. Roche, F. Dalenc, M. Lacroix-Triki & S. Vagner. (2011). Formation of the eIF4F translation initiation complex determines sensitivity to anti-cancer drugs targeting the EGF and HER2 receptors. In *Cancer Res*.

Internetové zdroje:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fkbp-cartoon-1fkj.png>