

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Šimek

TOR signalizace u kvasinek

TOR signalling in yeast

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.8.2013

.....

Poděkování:

Děkuji prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. a Mgr. Michalu Čápovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval mým rodičům, kteří mi byli oporou během celého studia.

Obsah

Seznam často používaných zkratk	5
Abstrakt	6
1 Úvod	7
2 Struktura TOR proteinů	8
3 Struktura TOR komplexů	9
3.1 TOR komplex 1	9
3.2 TOR komplex 2	10
4 Lokalizace TOR komplexů	12
4.1 Lokalizace TORC1	12
4.2 Lokalizace TORC2	12
5 Regulace TOR komplexu 1	13
5.1 Inhibice rapamycinem	13
5.2 Další inhibitory TORC1	13
5.3 Aminokyselinami zprostředkovaná aktivace TORC1	13
5.4 Role glutamátu, glutaminu a leucinu při regulaci TORC1	15
5.5 Regulace TORC1 zpětnou vazbou	16
6 Signalizace TOR komplexu 1	18
6.1 Efektory TORC1	18
6.2 Regulace vstupu do G ₀ fáze a transkripce ESR genů	20
6.3 Regulace syntézy ribozomů	21
6.4 Regulace autofagie	22
6.5 Regulace iniciace translace a syntézy aminokyselin	23
6.6 Regulace importu živin a exprese permeáz	24
7 Regulace TOR komplexu 2	26
8 Signalizace TOR komplexu 2	26
9 Závěr	28
10 Literatura	29

Seznam často používaných zkratk

EGO	escape from growth arrest	únik ze zadržení růstu
mTORC1	mammalian TOR complex 1	savčí TOR komplex 1
RiBi	ribosome biogenesis factors	faktory biogeneze ribozomů
RP	ribosomal protein	ribozomální protein
TOR	The target of rapamycin	cíl rapamycinu
TORC1	TOR complex 1	TOR komplex 1
TORC2	TOR complex 2	TOR komplex 2

Abstrakt

TOR („Target of rapamycin“) protein je vysoce konzervovaná serin/threoninová kináza, která je centrální komponentou signálních kaskád regulujících buněčný růst a metabolismus eukaryotních organismů od kvasinek až po člověka. TOR proteiny byly objeveny v roce 1991 u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jako cíl antimykotika a imunosupresoru rapamycinu. Kvasinky nesou na rozdíl od většiny eukaryotních organismů dva TOR geny, které kódují dva homologní proteiny Tor1p a Tor2p. Ty jsou součástí dvou komplexů TORC1 a TORC2. TORC1 je specificky inhibován rapamycinem a je zodpovědný za regulaci buněčného růstu v závislosti na množství a kvalitě dostupných živin. TORC2, který je necitlivý k účinkům rapamycinu, reguluje polymerizaci aktinu, syntézu sfingolipidů a endocytózu. Tato práce popisuje oba komplexy a je zaměřena především na regulaci a signalizaci TORC1.

Klíčová slova: TOR, TORC1, TORC2, rapamycin

Abstract

TOR („Target of rapamycin“) protein, a highly conserved Ser/Thr protein kinase, is a central component of signalling network that controls cell growth in diverse eukaryotic organism, ranging from yeast to man. TOR proteins were first identified in yeast *Saccharomyces cerevisiae* in 1991 as the targets of the antifungal and immunosuppressive agent rapamycine. In contrast to most eukaryotes, yeast contains two TOR homologues , Tor1p and Tor2p. These proteins are components of multiprotein complexes TORC1 and TORC2. TORC1 is specifically inhibited by rapamycine and controls cell growth in response to quality of the available nutrients. TORC2, which is insensite to rapamycine, regulates actin polymerization, sphingolipid biosynthesis and endocytosis. This work is focused on description of both TOR complexes, especially on downstream and upstream regulation of TORC1.

Key words: TOR, TORC1, TORC2, rapamycin

1 Úvod

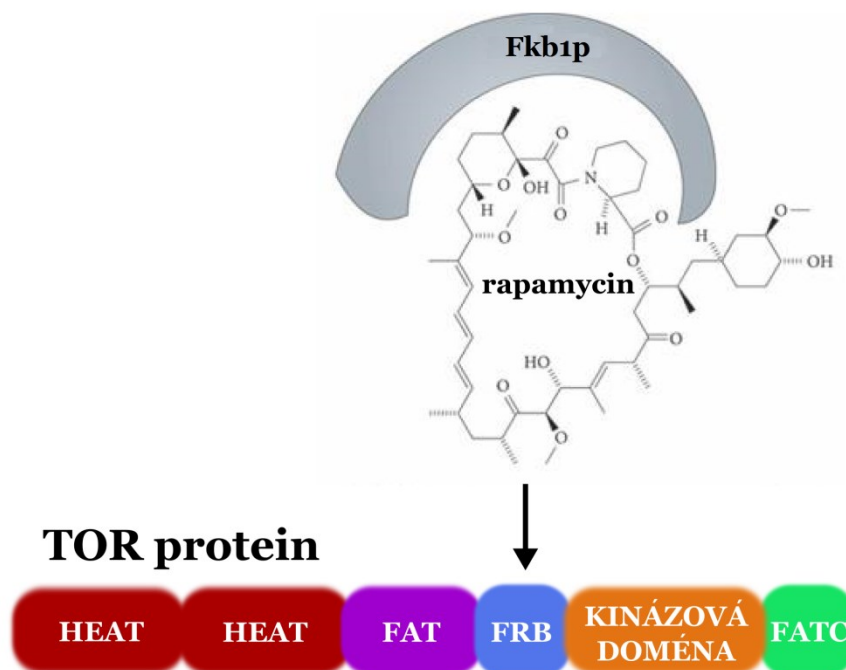
TOR („Target of rapamycin“) protein je vysoce konzervovaná serin/threoninová kináza, která je centrální komponentou signálních kaskád regulujících buněčný růst a metabolismus eukaryotních organismů od kvasinek až po člověka. TOR proteiny byly objeveny v roce 1991 u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jako cíl antimykotika a imunosupresoru rapamycinu, z čehož vychází jejich pojmenování (Heitman et al., 1991). Rapamycin je přírodní produkt (makrolid) izolovaný z půdní bakterie *Streptomyces hygroscopicus* objevené na ostrově Rapa Nui (Velikonoční ostrov) v roce 1972, podle něhož byl pojmenován (Sehgal et al., 1975; Vezina et al., 1975). Izolace a identifikace mutantů rezistentních vůči účinkům rapamycinu vedla k objevu tří genů: *FPR1*, *TOR1* a *TOR2* (Heitman et al., 1991).

Kvasinky nesou na rozdíl od většiny eukaryotních organismů dva TOR geny, které kódují dva homologní proteiny Tor1p a Tor2p (Helliwell et al., 1994). Tyto proteiny jsou hlavní součástí dvou funkčně a strukturně odlišných komplexů (Loewith et al., 2002; Zheng et al., 1995). Prvním je TOR komplex 1 (TORC1) specificky inhibovaný rapamycinem. Účinek rapamycinu vede k zastavení buněčného cyklu, vstupu do G₀ fáze, snížení syntézy proteinů, zvýšení exprese genů reagujících na stres, spuštění autofagie a k přechodu na alternativní metabolismus uhlíku a dusíku. TORC1 je tedy zodpovědný za regulaci buněčného růstu v závislosti na množství a kvalitě dostupných živin. Druhým komplexem je méně prostudovaný TOR komplex 2 (TORC2), který je necitlivý k účinkům rapamycinu a reguluje polymeraci aktinu, syntézu sfingolipidů a endocytózu.

Od 90. let dvacátého století na téma TOR signalizace bylo doposud publikováno několik tisíc prací; to je několik set ročně. Je tak nemožné probrat všechny dostupné informace v práci tohoto rozsahu. Cílem této práce je proto zrekapitulovat TOR signalizaci u kvasinek a přehledně shrnout relevantní literaturu. Tato práce je zaměřená především na popis struktury, regulace a popis hlavních metabolických drah, které TOR komplexy svou aktivitou ovlivňují. Podrobněji jsou zde rozepsány především informace o lépe prostudovaném TORC1 proteinovém komplexu.

2 Struktura TOR proteinů

Kvasinky nesou na rozdíl od většiny eukaryotních organismů dva TOR geny, které kódují dva paralogy: Tor1p a Tor2p. Tyto proteiny jsou 280 kDa velké, z 67% identické (Helliwell et al., 1994) a obsahují několik funkčně odlišných domén. N-koncová polovina proteinu se skládá z přibližně dvaceti tandemově se opakujících HEAT motivů („Huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1“)(Obrázek 2.1)(Perry and Kleckner, 2003). Tyto motivy vytvářejí povrch pro protein-proteinové interakce a jsou nezbytné pro vytvoření multiproteinových komplexů (Wullschleger et al., 2005). Vedle HEAT motivů se vyskytuje FAT doména, která pravděpodobně interaguje s podjednotkami TOR komplexů nebo se podílí na skládání proteinu. Za FAT doménou je FRB („Fkb1p-rapamycin binding domain“), na kterou se váže toxický Fkb1p-rapamycinový komplex (více kapitola 5.1). Dále následuje kinázová doména a na C-konci je FATC doména (Alarcon et al., 1999; Bosotti et al., 2000; Dames et al., 2005). Přítomnost několika s proteiny interagujících domén naznačuje, že TOR proteiny interagují s mnoha dalšími proteiny a vytvářejí komplexy, které jsou popsány v další kapitole.

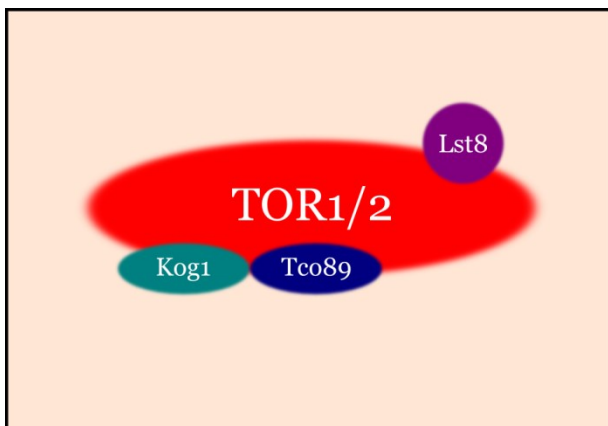


Obrázek 2.1: Schéma konzervované struktury domén TOR proteinu. N-konec TOR proteinu obsahuje tandem HEAT motivů důležitých pro protein-proteinovou interakci. Vedle nich se vyskytuje FAT doména, FRB doména, kinázová doména a na C-konci FATC doména. FRB doména je místo, kam se váže Fkb1p-rapamycinový komplex. Převzato a upraveno z (Benjamin et al., 2011).

3 Struktura TOR komplexů

3.1 TOR komplex 1

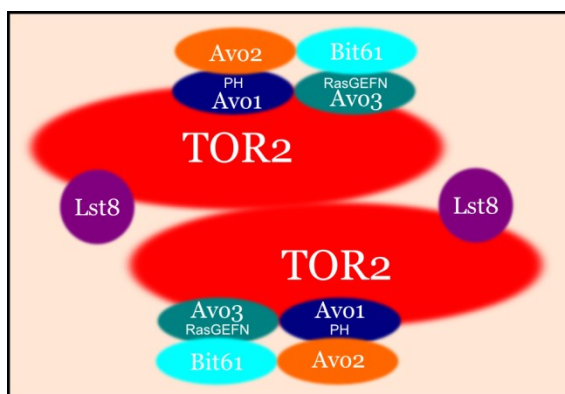
Tor komplex 1 tvoří přibližně 2 MDa velký komplex (Loewith et al., 2002), který vytváří dimery podobně jako TORC2 a mTORC1 (Wullschleger et al., 2005; Yip et al., 2010). Jádrem tohoto na rapamycin a živiny citlivého komplexu se u *S. cerevisiae* skládá z konzervovaných podjednotek Kog1p, Lst8p a jednoho ze dvou proteinů Tor1p nebo Tor2p (Obrázek 3.1)(Tabulka 3.1)(Loewith et al., 2002). TOR proteiny u kvasinek jsou ortology savčího mTOR proteinu (Yip et al., 2010). Tor1p není nezbytný pro životaschopnost buňky a v případě jeho ztráty může být v TORC1 nahrazen Tor2p, který je také součástí TORC2 a jeho ztráta je pro organismus letální (Helliwell et al., 1994; Wullschleger et al., 2005). Protein Kog1p („kontroller of growth 1“) má molekulární hmotnost 176 kDa, obsahuje čtyři vnitřní HEAT motivy, sedm WD40 motivů na C-konci a RNC („raptor N-terminal conserved“) doménu, která se váže na N-konec TOR proteinu a interaguje se substráty TORC1. Kog1p je z 27% sekvenčně identický se savčím ortologem raptor a stejně jako on je nezbytný pro navázání substrátu na komplex (Hara et al., 2002; Loewith et al., 2002). Esenciální protein Lst8p („lethal with sec thirteen“) je z 28% sekvenčně identickým ortologem savčího mLST8 (známým také jako GβL)(Kim et al., 2003; Loewith et al., 2002). Je tvořen sedmi WD40 motivy, váže se na TORC1 i TORC2 v místě kinázové domény, kterou stabilizuje, a u TORC2, mTORC1 a mTORC2 je nezbytný pro kinázovou aktivitu komplexu (Kim et al., 2003; Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2005). TORC1 dále obsahuje nekonzervovaný protein Tco89p („TOR complex one 89kDa subunit“), který zprostředkovává signály od EGO komplexu k TORC1 (více kapitola 5)(Binda et al., 2009; Reinke et al., 2004).



Obrázek 3.1: Složení TOR komplexu 1. TORC1 je 2MDa velký komplex složený z Lst8p, Kog1p, Tco89p a Tor1p nebo Tor2p.

3.2 TOR komplex 2

K rapamycinu necitlivý TORC2 se skládá z následujících šesti proteinů: Tor2p, Avo1p, Avo2p, Avo3p, Bit61p a Lst8p, z nichž esenciální jádro komplexu tvoří vysoce konzervované podjednotky Tor2p, Avo1p, Avo3p a Lst8p (Obrázek 3.2)(Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2005). Výzkumy naznačují, že se komplex vyskytuje jako multimer a vytváří TORC2-TORC2 dimery, které vznikají HEAT-FAT interakcí mezi TOR proteiny. V buňce byly nalezeny dvě odlišně velké formy TORC2 (1,5-2 MDa a 0,7-0,8 MDa), které představují monomerní a dimerní formu komplexu (Wullschleger et al., 2005). Avo1p („adheres vocariously to TOR2“) je přibližně 131 kDa velký esenciální protein, jehož savčím ortologem je mSin1 (Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2005), a má na svém C-konci PH doménu, která zajišťuje navázání komplexu na plazmatickou membránu (Berchtold and Walther, 2009). Avo3p má velikost 164 kDa a jeho savčím ortologem je mAVO3 známý také jako rictor (Loewith et al., 2002; Wullschleger et al., 2005). Obsahuje RasGEFN doménu, kterou můžeme najít na N-konci Ras GTPáz, ovšem funkce této domény u Avo3p je doposud nejasná (Loewith et al., 2002). Avo1p a Avo3p jsou důležité pro správné sbalení komplexu a jeho stabilitu, jsou také autofosforylovány, což je důležité pro regulaci kinázové aktivity komplexu a pro zprostředkování signálů efektorům. Navázání těchto dvou proteinů na N-konec Tor2p vytváří místo pro navázání Avo2p a pravděpodobně i Bit61p. Rezistence TORC2 k rapamycinu je způsobena navázaným Avo1p v místě FRB domény na Tor2p, kterou překrývá (Wullschleger et al., 2005). Avo2p je neesenciální podjednotkou komplexu, která interaguje se substráty TORC2 Slm1p a Slm2p a pravděpodobně plní funkci adaptorového proteinu (Audhya et al., 2004; Wullschleger et al., 2005). Bit61p („61 kDa binding partner of Tor2p“) je neesenciální složkou komplexu a jeho funkce není známa (Reinke et al., 2004). Lst8p se váže na C-konec Tor2p a je zodpovědný za stabilitu a zachování kinázové funkce (Wullschleger et al., 2005), jak bylo popsáno výše.



Obrázek 3.2: Složení TORC2. TORC2 se skládá z Avo1p, Avo2p, Avo3p, Lst8p, Bit61p a na rozdíl od TORC1 výhradně z Tor2p. Avo3p obsahuje RasGEFN doménu a Avo1p PH doménu. Všechny komponenty mohou být v komplexu přítomny ve dvou kopiích, jelikož TORC2 vytváří dimer.

Tabulka 3.1: Komponenty TOR komplexů u kvasinek

Protein	Savčí ortolog	Komplex	Funkce
Tor1p	mTOR	TORC1	Katalytická podjednotka, proteinkináza
Tor2p	mTOR	TORC1/2	Katalytická podjednotka, proteinkináza
Kog1p	raptor	TORC1	Navázání substrátu na komplex
Lst8p	mLST8 (GβL)	TORC1/2	Stabilita a zachování kinázové funkce komplexu
Tco89	-----	TORC1	Příjem signálu od EGO komplexu
Avo1p	mSIN1	TORC2	Stabilita a regulace aktivity komplexu, ukotvení komplexu na membránu
Avo3p	rictor	TORC2	Stabilita a regulace aktivity komplexu
Avo2p	-----	TORC2	Adaptorový protein
Bit61p	-----	TORC2	Není známa

4 Lokalizace TOR komplexů

4.1 Lokalizace TORC1

Oba TOR komplexy se nacházejí na prostorově různých místech uvnitř buňky, kde plní svou odlišnou signalizační funkci. Značení pro TORC1 specifické podjednotky Kog1p GFP značkou vedlo ke zjištění, že se TORC1 vyskytuje na vakuolární membráně. To bylo potvrzeno označením dalších podjednotek komplexu 1: esenciálního Lst8p a neesenciálního Tco89p, které byly též vizualizovány na membráně vakuoly (Berchtold and Walther, 2009; Reinke et al., 2004). Lokalizace komplexu 1 reagujícího na dostupnost a kvalitu živin na vakuolární membráně se zdá být logická, jelikož vakuola je u kvasinek hlavní zásobárnou živin (více kapitola 5)(Binda et al., 2009). Není ovšem vyloučeno, že se TORC1 nachází i na jiných místech uvnitř buňky, neboť bylo odhaleno, že Tor1p vstupuje do jádra, kde interaguje s promotorem 35S rDNA a reguluje syntézu 35S rRNA (Li et al., 2006).

4.2 Lokalizace TORC2

TOR komplex 2 se nachází na doméně plazmatické membrány zvané MCT („membrane compartment containing TORC2“). Tato interakce TORC2 s membránou je zprostředkována podjednotkou komplexu Avo1p, která se na membránu váže PH doménou na C-konci, a je zcela nezbytná pro životaschopnost buňky (Berchtold and Walther, 2009). Tor2p, který je především součástí TORC2 (cca 90%) (Berchtold and Walther, 2009; Loewith and Hall, 2011), byl objeven také na vnitřních buněčných membránách pravděpodobně intracelulárního transportu (Kunz et al., 2000; Wedaman et al., 2003). TORC2 lze tedy pravděpodobně najít na více místech uvnitř buňky, ale převážně se vyskytuje na plazmatické membráně, kde reguluje polarizaci aktinového cytoskeletu a endocytózu (více kapitola 8).

5 Regulace TOR komplexu 1

5.1 Inhibice rapamycinem

Rapamycin se po vstupu do buňky váže na svůj cytosolický receptor Fkb1p a vytváří Fkb1p-rapamycinový komplex, který přímo inhibuje kinázovou aktivitu TORC1 (Schreiber, 1991; Zheng et al., 1995). Fkb1p je vysoce konzervovaná malá peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza, která se za normálních okolností účastní skládání proteinů a je kódována v úvodu zmíněným genem *FPR1*. Tento protein není cílem rapamycinu, ale spíše kofaktorem nutným pro projev jeho toxicity. Mutace a změna jeho sekvence vede k rezistenci buňky před jeho účinkem (Heitman et al., 1991). K inhibici aktivity TORC1 dojde po navázání Fkb1p-rapamycinového komplexu na C-koncovou FRB doménu TOR proteinu (Obrázek 2.1). Mutace v místě FRB domény znemožňuje rapamycinu interagovat s TOR proteiny a buňka je poté rezistentní před jeho účinkem (Cafferkey et al., 1993; Heitman et al., 1991; Helliwell et al., 1994). Přesný mechanismus jakým Fkb1p-rapamycin interaguje s TOR proteiny, ovšem doposud není znám (Heitman et al., 1991; Zheng et al., 1995).

5.2 Další inhibitory TORC1

Aktivita TORC1 je kromě rapamycinu a jeho derivátů inhibována širokým spektrem stresorů. Mezi tyto stresory patří například kofein, nedostatek živin (nedostatek látek obsahujících dusík, fosfor a uhlík), hypertonické prostředí (NaCl, KCl), oxidanty (H₂O₂), ethanol, slabé organické kyseliny, arsenik a teplotní šok (Hosiner et al., 2009; Urban et al., 2007; Wanke et al., 2008). Aktivita TORC1 je dále inhibována také na základě intracelulárních signálů, kterými jsou poškozená DNA nebo mitochondriální disfunkce (Kawai et al., 2011; Shen et al., 2007).

5.3 Aminokyselinami zprostředkovaná aktivace TORC1

Mechanismus jakým je aktivita TORC1 regulována, byl intenzivně studován především u savců, kde se na jeho regulaci podílí včetně aminokyselin mnoho dalších signálních molekul, jakými jsou například hormony nebo růstové faktory (Sarbasov et al., 2005). Zatímco regulace TORC1 u jednobuněčných organismů, jakým je například *Saccharomyces cerevisiae*, byla donedávna zcela neznámá a jako hlavní

regulátory aktivity TORC1 u těchto organismů byly objeveny aminokyseliny (Binda et al., 2009; Bonfils et al., 2012).

Klíčovým komponentem, který zprostředkovává signály o dostupnosti aminokyselin k TORC1, jsou Rag GTPázy patřící do skupiny Ras GTPáz. Tyto GTPázy jsou vysoce konzervované od kvasinek až po člověka (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). U člověka můžeme najít čtyři geny (*RagA*, *RagB*, *RagC* a *RagD*) kódující proteiny, z nichž si jsou RagA s RagB a RagC s RagD sekvenčně velmi podobné (Sekiguchi et al., 2001). Kvasinky nesou pouze dva geny pro Rag GTPázy, ty kódují protein Gtr1p, který je přibližně z 52% sekvenčně shodným ortologem RagA/B, a Gtr2p, který je se svými savčími ortology RagC a RagD sekvenčně shodný ze 46% (Dubouloz et al., 2005; Sekiguchi et al., 2001). Gtr1p a Gtr2p společně vytvářejí heterodimery (stejně jako jejich savčí ortology), což je zcela unikátní, jelikož žádné další GTPázy z Ras skupiny dimery netvoří (Sancak et al., 2008). Gtr1p a Gtr2p hrají významnou roli při aktivaci TORC1 v závislosti na dostupnosti aminokyselin, jsou nezbytné pro návrat do buněčného cyklu po pominutí účinku rapamycinu a podobně jako jejich savčí ortology vytvářejí Gtr1p-GTP-Gtr2p-GDP komplex, který aktivuje TOR komplex 1 (Binda et al., 2009; Dubouloz et al., 2005; Sancak et al., 2008). Gtr GTPázy interagují s dalšími pro kvasinky specifickými proteiny Ego1p (Meh1p) a Ego3p (Slm4p) a vytvářejí stabilní EGO („escape from growth arrest“) komplex lokalizovaný na vakuolární membráně (Obrázek 5.1). Tento komplex je ukotven na vakuolární membránu Ego proteiny a kromě aktivace TORC1 se podílí také na regulaci mikroautofagie (Dubouloz et al., 2005) a na přesunu Gap1p permeáz z pozdního endozomu na plazmatickou membránu (Gao and Kaiser, 2006).

Aktivace TORC1 indukovaná aminokyselinami zahrnující aktivitu Gtr1p a Gtr2p u kvasinek byla podrobně popsána v práci (Binda et al., 2009). Heterodimer ve formě Gtr1p-GTP a Gtr2p-GDP se vyznačuje největší aktivitou a stimuluje fosforylaci Sch9p kinázy, která je přímým substrátem TORC1. Delece genu *GTR1* nebo *GTR2* vede ke snížení fosforylace a aktivity Sch9p. Gtr1p se ve formě Gtr1p-GTP váže na podjednotky TOR komplexu 1 Tco89p a Kog1p. Ačkoliv není znám přesný způsob, jakým EGO komplex váže a mění aktivitu TORC1, zdá se, že tak dochází především přes Tco89p podjednotku TORC1. Buňka s mutovaným Tco89p totiž není schopna regulovat aktivitu TORC1 přes EGO komplex (Binda et al., 2009). Interakce mezi wild-type Gtr1p a TORC1 vede k citlivosti buňky na aminokyseliny, ovšem interakce

mezi stále aktivním Gtr1p-GTP mutantem a TORC1 má za následek ztrátu citlivosti na aminokyseliny. Aminokyseliny tudíž aktivují Gtr proteiny, které následně interagují s TORC1, což vede k jeho aktivaci (Binda et al., 2009).

Gtr proteiny ovšem nejsou aktivovány aminokyselinami přímo, ale jsou aktivovány přes Vam6p, který je guanin-nukleotid výměnným faktorem Gtr1p (Binda et al., 2009). Vam6p (známý také jako Vps39p) je vysoce konzervovanou komponentou HOPS („homotypic fusion and vacuole protein sorting“) komplexu, který je navázán na vakuolární membráně, kde se účastní regulace lokalizace vakuolárních proteinů a fúze vakuol (Wurmser et al., 2000). Delece *VAM6* způsobuje silný růstový defekt podobný fenotypu u buněk s mutovanými komponenty EGO komplexu. Vam6p je podle všeho guanin-nukleotid výměnným faktorem Gtr1p a tím i regulátorem aktivity TORC1. Vam6p se váže na Gtr1p a vyvolává vyvázání GDP, který je poté nahrazen GTP. Jestliže v buňce gen *VAM6* deletujeme, rapidně klesne množství Gtr1p-GTP, což podporuje hypotézu, že Vam6p reguluje Gtr1p a je jejím guanin-nukleotid výměnným faktorem (Binda et al., 2009).

Celý výše popsaný model regulace TORC1 v závislosti na přítomnosti aminokyselin není pravděpodobně konzervovaný a je typický pro kvasinky a jim podobné organismy. Protein Gtr1p totiž není schopen aktivovat TOR komplex 1 bez přítomnosti aminokyselin, zatímco savčí RagA/B může reaktivovat TORC1 nezávisle na aminokyselinách. Dalším rozdílem v regulaci u kvasinek a savců je změna lokalizace komponentů jednotlivých komplexů účastnících se aktivace TOR kinázy. Zatímco u savců je relokace jednotlivých komponentů dráhy při regulaci nezbytná, komponenty EGO komplexu a TORC1 u kvasinek jsou stále lokalizovány na membráně vakuoly nezávisle na výskytu aktivátorů či inhibitorů TOR dráhy (Binda et al., 2009; Dubouloz et al., 2005; Sancak et al., 2008).

5.4 Role glutamátu, glutaminu a leucinu při regulaci TORC1

Ačkoliv přesný mechanismus, jakým jsou vnímány aminokyseliny EGO komplexem, není znám a účastní se ho pravděpodobně široké spektrum aminokyselin, bylo zjištěno, že obzvláště důležitou roli při regulaci TORC1 hrají glutamát, glutamin a leucin (Bonfils et al., 2012; Crespo et al., 2002; Komeili et al., 2000).

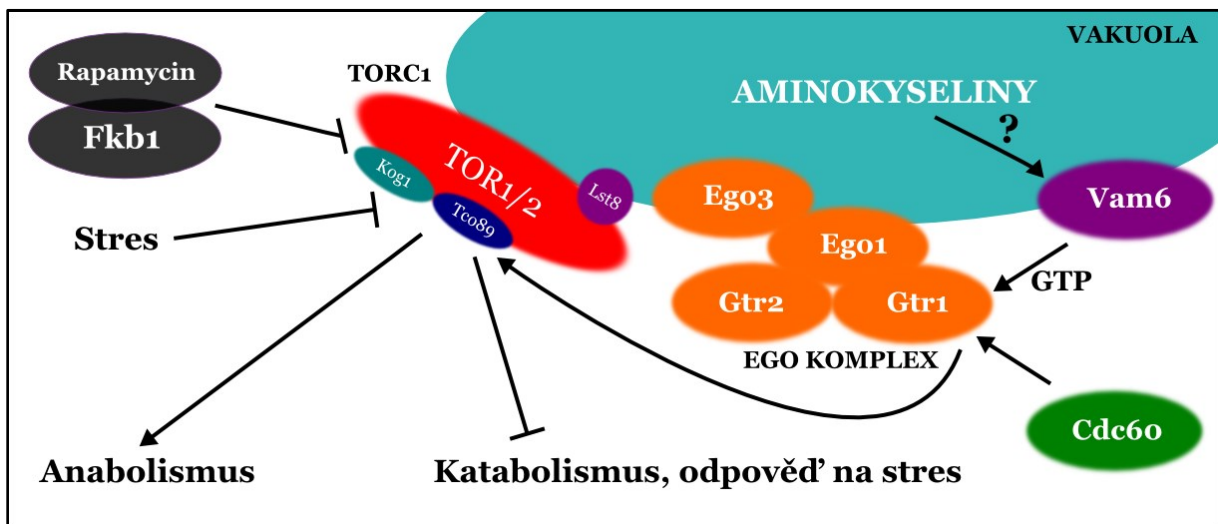
Glutamát respektive glutamin mají klíčovou úlohu v metabolismu dusíku. Glutamát je u kvasinek přeměněn na glutamin glutamin-syntetázou (GS). Ten je u kvasinek preferovaným zdrojem dusíku a klíčovým prekurzorem pro syntézu purinových i pyrimidinových nukleotidů, dalších molekul obsahujících dusík (jako například NAD⁺) a v případě potřeby může být snadno přeměněn na α -ketoglutarát využitelný pro získání energie v citrátovém cyklu (Magasanik and Kaiser, 2002). Nedostatek glutaminu vyvolává u buňky podobný fenotyp jako inaktivace TORC1 rapamycinem. To má za následek aktivaci a jadernou relokizaci Gln3p a heterodimerního transkripčního faktoru Rtg1p-Rtg3p a následnou produkci proteinů potřebných pro syntézu a udržení homeostáze glutamátu a glutaminu (více kapitola 6). Ovšem na rozdíl od účinku rapamycinu během nedostatku glutaminu nejsou aktivovány transkripční faktory Gat1p, Msn2p a Msn4p. To naznačuje, že TORC1 specificky reguluje vybrané buněčné procesy na základě přítomnosti glutaminu (Crespo et al., 2002).

Leucin je aminokyselinou potřebnou pro aktivaci TORC1 u savců i kvasinek. Dochází tak přes leucyl-tRNA syntetázu (LeuRS), která je přímým senzorem této aminokyseliny (Bonfils et al., 2012; Han et al., 2012). LeuRS (Cdc60p) je enzym lokalizovaný v cytoplazmě, který zprostředkovává přiřazení leucinu k odpovídající tRNA a účastní se tak translace. Ukázalo se, že také reguluje aktivitu proteinu Gtr1p tím, že blokuje hydrolýzu GTP. Dochází tak přes specifickou doménu CP1, která přímo interaguje s Gtr1p-GTP a blokuje hydrolýzu GTP, změna sekvence v místě této domény znemožňuje navázání Cdc60p na Gtr1p. Celý proces je spuštěn navázáním leucinu na Cdc60p, který po interakci s leucinem změní svou konformaci a je poté schopen přes CP1 doménu blokovat hydrolýzu GTP u Gtr1p, čímž udržuje TORC1 aktivní (Bonfils et al., 2012).

5.5 Regulace TORC1 zpětnou vazbou

Přímé substráty TOR komplexu 1 Sch9p kináza a Sfp1p jsou pozitivními regulátory exprese genů ribozomálních proteinů a proteinů nezbytných pro jejich biogenezi (RiBi)(více kapitola 6)(Huber et al., 2009; Jorgensen et al., 2004; Lempiainen and Shore, 2009). Zvýšení exprese genu pro Sfp1p vede ke snížení aktivity TORC1 a tím i jím zprostředkované fosforylaci Sch9p. Naopak mutace v genu pro Sfp1p má za následek hyperfosforylaci Sch9p, což odhaluje existenci negativní

zpětné vazby, která reguluje expresi ribozomálních a RiBi genů pravděpodobně v důsledku poklesu syntézy ribozomů a spojuje signální dráhy kontrolované Sfp1 a Sch9p. Tato regulace TORC1 zpětnou vazbou je zcela důležitá pro přežití buněk s nefunkčním Sch9p nebo Sfp1p, jelikož buňky s mutovaným genem *SCH9* a deletovaným *SFP1* nejsou schopny života (Lempiainen et al., 2009). Je zajímavé, že mutace Sch9p sice vede k hyperaktivaci TORC1 (Urban et al., 2007), ale nijak neovlivňuje fosforylaci Sfp1p. Tato zpětná vazba se tedy zdá být specifická pouze pro TORC1 regulovanou fosforylaci Sch9p a s největší pravděpodobností neovlivňuje TORC1 signalizaci k Sfp1p (Lempiainen et al., 2009).



Obrázek 5.1: Schéma regulace TORC1. Hlavním regulátorem TORC1 je EGO komplex. Ten se skládá z proteinů Ego3p, Ego1p, Gtr2p a Gtr1p a nachází se stejně jako TORC1 na membráně vakuoly, kde reaguje na množství aminokyselin uvnitř vakuoly přes Vam6p. Vam6p je guanin-nukleotid výměnný faktor zajišťující připojení guaninových nukleotidů k Gtr1p proteinu. Cdc60p je leucyl-tRNA syntetáza, která přes CP1 doménu brání hydrolyze GTP z Gtr1p v závislosti na přítomnosti leucinu. Aktivní TORC1 spouští uvnitř buňky anabolické procesy a zároveň inhibuje procesy katabolické a odpověď na stres.

vede k neustálé aktivitě nezávislé na TORC1. Vystavíme-li buňku účinkům stresového prostředí (rapamycin, nedostatek živin bohatých na dusík a uhlík, vysoká teplota a další), dochází k defosforylaci C-konce proteinu a Sch9p ztrácí svou kinázovou aktivitu (Urban et al., 2007).

Druhým nejlépe prostudovaným efektozem TORC1 jsou 2A (PP2A) a s nimi interagující fosfatázy. PP2A se v buňce vyskytuje v podobě heterotrimerického proteinového komplexu složeného ze strukturní A podjednotky, katalytické C podjednotky a regulační podjednotky B nebo B'. Genom kvasinek kóduje tři PP2A katalytické podjednotky, kterými jsou Pph21p, Pph22p a Pph3p a společně se označují jako PP2Ac. PP2A může obsahovat i několik dalších s PP2A-interagujících katalytických podjednotek, jakým je například serin/treoninová fosfatáza Sit4p, která hraje důležitou roli v TORC1 signalizaci (De Virgilio and Loewith, 2006; Reinke et al., 2004; Ronne et al., 1991). TORC1 reguluje aktivitu těchto fosfatáz přes protein Tap42p. Dojde-li k fosforylaci Tap42p TOR komplexem 1, fosforylovaný Tap42p se poté váže na katalytické podjednotky Pph21p, Pph22p a Sit4p, čímž dochází k vytvoření s Tap42p interagujících fosfatázových komplexů, které také interagují s jedním z regulačních proteinů Rrd1p nebo Rrd2p (DiComo and Arndt, 1996; Zheng and Jiang, 2005). Rrd1p nebo Rrd2p jsou peptidyl-prolyl cis/trans-izomerázy, které společně s Tap42p vytváří Tap42p-PP2Ac-Rrd2p nebo Tap42p-Sit4p-Rrd1p komplex. RRD proteiny jsou nezbytné pro aktivaci navázaných fosfatáz a Tap42p plní inhibiční roli (DiComo and Arndt, 1996; Duvel et al., 2003; Zheng and Jiang, 2005). Za příznivých podmínek dostatku živin se fosfatázové komplexy interagující s Tap42p vyskytují na membráně, kde interagují s TORC1. Účinek rapamycinu nebo nedostatek živin obsahujících dusík zruší navázání na TORC1 a Tap42p-fosfatázový komplex se dostává do cytosolu. Jakmile je komplex v cytoplasmě, dochází k defosforylaci Tap42p a k přerušení interakce s fosfatázami, které jsou poté aktivovány nebo dojde ke změně jejich substrátové specifity (Duvel et al., 2003; Yan et al., 2006). Jak TORC1 mechanisticky zajišťuje fosforylaci Tap42p je nejasné. Tap42p může být fosforylován přímo TORC1 nebo přes Tip41p („Tap42 interacting phosphoprotein“). Tip41p byl identifikován jako inhibitor, který je schopen specificky interagovat s defosforylovaným Tap42p (Jacinto et al., 2001). Bylo ovšem zjištěno, že proteiny Tip41p a Tap42p spolu mohou kooperovat při určování substrátové specifity PP2A a Sit4p a že oba proteiny mohou plnit obdobnou funkci při TORC1 signalizaci (Kuepfer et al., 2007). Většina genů kódujících výše zmíněné proteiny se zdá být konzervovaná

a má své savčí ortology. Nedávno byl například objeven $\alpha 4$ (savčí ortolog Tap42p) jako esenciální regulátor PP2A komplexu u myši (Kong et al., 2009).

Sch9p kináza a Tap42p-fosfatázové komplexy jsou hlavními substráty signalizace TORC1, přes oba tyto substráty dochází k regulaci pro buňku životně důležitých procesů. Kromě těchto dvou substrátů TORC1 přímo interaguje i s řadou dalších substrátů (Loewith and Hall, 2011), jsou jimi například Sfp1p (Lempiainen et al., 2009), Gln3p (Bertram et al., 2000), Atg13p (Kamada et al., 2010) a Npr1p (De Craene et al., 2001), jejich funkce v rámci TOR dráhy je popsána níže.

6.2 Regulace vstupu do G_0 fáze a transkripce ESR genů

U *Saccharomyces cerevisiae* je vstup do stacionární G_0 fáze indukován ztrátou aktivity signalizačních drah řízených TOR komplexem 1, cAMP-závislou proteinkinázou A (PKA) a Pho80p-Pho85p cyklinem aktivovaným kinázovým komplexem, které regulují proliferaci buňky v závislosti na přítomnosti živin nezbytných pro růst (Pedruzzi et al., 2003; Wanke et al., 2005). Stacionární fáze je charakteristická zastavením transkripce a translace mRNA většiny genů, expresí genů reagujících na stres a syntézou glykogenu a trehalózy (Werner-Washburne et al., 1993). TORC1 zabraňuje vstupu do této fáze regulací substrátu proteinkinázy A Rim15p. Tuto kinázu TORC1 udržuje ve fosforylovaném stavu přes Sch9p kinázu. Fosforylovaný Rim15p na místě Ser1061 a Thr1075 interaguje s 14-3-3 proteiny a ty ho udržují v cytoplazmě, což brání jeho relokizaci z cytoplazmy do jádra, kde aktivuje vstup do stacionární fáze (Pedruzzi et al., 2003; Urban et al., 2007; Wanke et al., 2005).

Je-li kvasinková buňka vystavena stresu, dochází ke spuštění transkripční odpovědi známé jako „environmental stress response“ (ESR) (Gasch and Werner-Washburne, 2002). To vede k transkripci stovek stresem regulovaných genů (chaperony, superoxid dismutáza, atd.), které jsou regulovány transkripčními faktory Msn2p, Msn4p a Gis1p (Obrázek 6.1) (Beck and Hall, 1999; Zhang et al., 2009). Ty jsou za nepříznivých podmínek v jádře aktivovány výše zmíněnou serin/threoninovou kinázou Rim15p (Pedruzzi et al., 2003). Ovšem transkripční faktory Msn2p a Msn4p jsou primárně regulovány intracelulární lokalizací, kterou TORC1 řídí přes Tap42-fosfatázy (Duvel et al., 2003; Gerner et al., 2002). Stresem vyvolaná reakce zahrnuje též aktivaci proteinů Igo1p a Igo2p Rim15p kinázou. Tyto proteiny jsou z 58%

sekvenčně identické a brání degradaci mRNA genů stresové odpovědi (Talarek et al., 2010).

6.3 Regulace syntézy ribozomů

Buněčný růst vyžaduje velké množství ribozomů, které zajistí dostatečnou syntézu proteinů. Biogeneze ribozomů zahrnuje koordinovanou regulaci všech tří jaderných RNA polymeráz, které regulují produkci čtyř ribozomálních RNA (rRNA), 78 ribozomálních proteinů (RP) a početné skupiny proteinů interagujících s rRNA známých jako RiBi („ribosome biogenesis factors“), jež zajišťují jaderný transport pre-ribozomálních částic do cytoplazmy a jejich správné složení. TORC1 reguluje biosyntézu ribozomů na transkripční úrovni (Lempiainen and Shore, 2009; Warner, 1999).

TORC1 reguluje svou aktivitou činnost RNA polymerázy I, která transkribuje 35S prekurzor rRNA, přes transkripční faktor Rrn3p. Ten je za pro růst příznivých podmínek lokalizován v jádře, kde interaguje s RNA polymerázou I. Inaktivací TORC1 působením rapamycinu dochází k zastavení syntézy rRNA přerušením interakce mezi Rrn3p a RNA polymerázou I a ta poté není schopna nasedat na rDNA (Claypool et al., 2004; Zaragoza et al., 1998).

RNA polymerázu III, která transkribuje gen 5S na rDNA a tRNA, TOR komplex 1 reguluje přes vysoce konzervovaný negativní regulátor Maf1p. Ten se u rostoucích buněk hromadí v cytoplazmě, kde je zadržován přímou fosforylací Sch9p kinázou, čímž je zabráněno interakci s RNA polymerázou III a inhibici transkripce (Huber et al., 2009; Lee et al., 2009).

Kvasinkový ribozom je tvořen 78 proteiny, které jsou kódovány 137 geny (většina z nich je kódována dvěma geny) (Lempiainen and Shore, 2009). TORC1 reguluje expresi těchto genů několika způsoby. Částečně tak dochází přes transkripční faktor Fhl1p („Forkhead-like 1 protein“) obsahující DNA vazebnou doménu, kterou se váže na promotory RP genů. Je-li TORC1 aktivní, poté Fhl1p interaguje se svým koaktivátorem Ifh1p a iniciuje transkripci ribozomálních proteinů, naopak je-li TORC1 inaktivován, pak Fhl1p interaguje se svým represorem Crf1p a transkripce RP je zastavena. Interakce s koregulátory a tím i aktivace transkripce je tedy závislá na aktivitě TORC1, který ji reguluje pravděpodobně přes protein kinázu A a jí

regulovanou kinázu Yak1p, jež během ztráty aktivity přímo fosforyluje a aktivuje Crf1p. Ten se poté hromadí v jádře a navazuje se na Fhl1p namísto Ifh1p (Martin et al., 2004; Rudra et al., 2005).

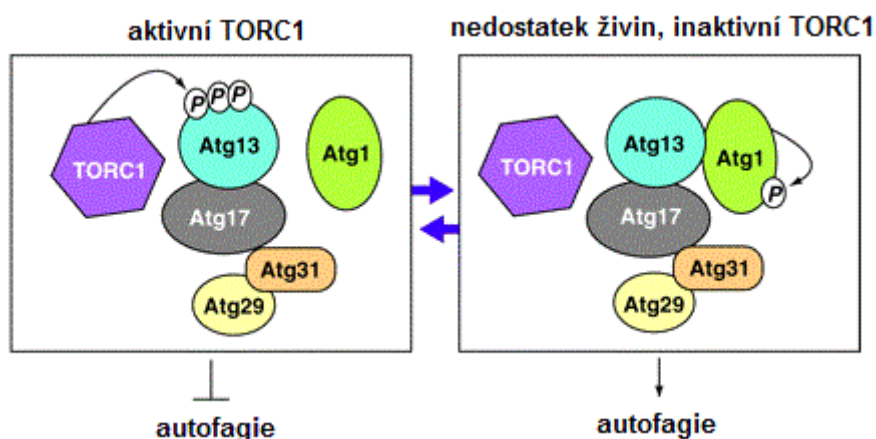
Dalším klíčovým mechanismem, kterým TORC1 reguluje transkripci ribozomálních proteinů, je přímá fosforylace „zinc-finger“ proteinu Sfp1p (Lempiainen et al., 2009; Marion et al., 2004; Singh and Tyers, 2009). Ten je-li lokalizován v jádře, tak přímo interaguje s promotory RP genů a spouští jejich transkripci. Jaderná lokalizace Sfp1p je řízena interakcí s Rab eskortním proteinem Mrs6p (Lempiainen et al., 2009; Singh and Tyers, 2009).

Sfp1 se dále podílí na aktivaci exprese velkého počtu RiBi genů, které představují okolo 200 protein-kódujících genů a přibližně 75 genů malých jaderných RNA (Lempiainen and Shore, 2009; Marion et al., 2004). Zajímavostí je, že overexprese Sfp1p vede k výraznému zvýšení produkce RiBi proteinů (více než RP), ačkoliv zatím nebyla odhalena interakce proteinu Sfp1p s promotory RiBi genů (Jorgensen et al., 2004). RiBi geny jsou regulovány také přes Sch9p kinázu, ta přímo fosforyluje transkripční represor Stb3p, který se v nefosforylovaném stavu váže na RRPE element RiBi promotoru, a represor Dot6p a jeho homolog Tod6p, který se v nefosforylovaném stavu váže na PAC element RiBi promotoru, čímž aktivuje transkripci RiBi genů (Huber et al., 2011; Liko et al., 2010).

6.4 Regulace autofagie

Autofagie je proces konzervovaný od kvasinek až po člověka a rostliny, který vede k degradaci širokého spektra cytoplazmatických proteinů a lipidů ve vakuole. Tento katabolický proces zajišťuje buňce energii a zdroje pro syntézu proteinů nezbytných pro přežití při nedostatku živin.

Proces autofagie je řízen esenciálními a vysoce konzervovanými ATG („autophagy-related genes“) geny (Xie and Klionsky, 2007). TORC1 reguluje autofagii tím, že přímo fosforyluje protein Atg13p na několika místech obsahujících serin a zabraňuje tak spouštění tohoto procesu. Je-li TORC1 inaktivován, dochází k defosforylaci Atg13p, který poté interaguje s proteinem Atg1p a vytváří s ním Atg13p-Atg1p heterodimerický komplex. Na tento komplex se následně vážou další ATG proteiny (Atg17p, Atg29p a Atg31p) a poté dochází ke vzniku PAS („preautofagosomal structure“) a zahájení procesu autofagie (Obrázek 6.2)(Kamada et al., 2010).



Obrázek 6.2: Schéma TORC1 zprostředkované regulace autofagie přímou fosforylací Atg13p. Převzato a upraveno z (Chen and Klionsky, 2011).

6.5 Regulace iniciace translace a syntézy aminokyselin

U buněk *S. cerevisiae* vystavených účinkům rapamycinu bylo zjištěno, že ztráta aktivity TORC1 má za následek brzkou inhibici iniciace translace. Tento proces zabraňuje syntéze proteinů, které nejsou nezbytné pro přežití, a zbytečnému plýtvání živin při jejich nedostatku (Barbet et al., 1996). TORC1 řídí iniciaci translace regulací fosforylace iniciačního faktoru translace eIF2 (Cherkasova and Hinnebusch, 2003). EIF2 iniciuje translaci tím, že přivádí tRNA^{Met} k malé ribozomální podjednotce a zprostředkovává formování preiniciačního komplexu translačního aparátu. Má-li buňka nedostatek aminokyselin, dochází k zastavení translace většiny mRNA fosforylací α podjednotky eIF2. Ta je přímo fosforylována 180 kDa velkou protein kinázou Gcn2p (Hinnebusch, 2005). Tato kináza je aktivována nenabitými tRNA, které se v buňce hromadí při nedostatku aminokyselin. Inaktivována je fosforylací v místě Ser577, čímž ztrácí afinitu k tRNA, aby i v případě dostatku živin nedocházelo k aktivaci v buňce se volně vyskytujícími nenabitými tRNA (Cherkasova and Hinnebusch, 2003). Aktivitu Gcn2p kinázy buňka reguluje přes Sch9p kinázu i Tap42p-fosfatázy. Na inaktivaci Gcn2p se podílí Sch9p prozatím neznámým způsobem a pravděpodobně nepřímou, ovšem je známo, že v případě mutace Sch9p dochází k aktivaci Gcn2p (Urban et al., 2007). K aktivaci dochází přes proteinem Tap42p regulované fosfatázy, které defosforylují Gcn2p v místě Ser577 (Cherkasova and Hinnebusch, 2003).

TORC1 dále reguluje přes eIF2 GAAC („general amino acid control“) signalizační dráhu, která je hlavním regulátorem biosyntézy aminokyselin u kvasinek. Tato dráha je aktivována transkripčním aktivátorem Gcn4p, jež spouští transkripci více než pětiset genů účastnících se syntézy aminokyselin (Natarajan et al., 2001). Jak bylo popsáno výše, účinek rapamycinu nebo nedostatek živin obsahujících dusík rapidně snižuje translaci tím, že dojde k fosforylaci α podjednotky eIF2. Ačkoliv fosforylace eIF2 α má za následek ukončení translace velkého množství proteinů, translace mRNA kódující Gcn4p je naopak aktivována. Dochází tak specificky přes čtyři krátké otevřené čtecí rámce na mRNA genu *GCN4* (Hinnebusch, 1997).

V neposlední řadě TORC1 reguluje RTG („retrograde response pathway“) signalizační dráhu. Tato dráha zprostředkovává signály o nedostatku glutamátu a glutaminu uvnitř mitochondrií do buněčného jádra, kde poté dochází k expresi genů citrátového a glyoxylátového cyklu důležitých pro jejich syntézu (Komeili et al., 2000; Liu and Butow, 2006). Na expresi těchto genů se podílí transkripční faktory Rtg1p a Rtg3p, které vytváří heterodimerní Rtg1p-Rtg3p komplex (Jia et al., 1997), jenž je za příznivých podmínek lokalizovaný v cytoplasmě, ovšem při nedostatku glutaminu nebo přítomnosti rapamycinu dochází k relokizaci tohoto komplexu do jádra, kde iniciuje transkripci (Crespo et al., 2002; Komeili et al., 2000). TORC1 reguluje vstup Rtg1p-Rtg3p komplexu do jádra prostřednictvím proteinu Mks1p, který interaguje s proteiny Bmh1p a Bmh2p, čímž vytváří cytoplazmatickou kotvu. Inaktivace TOR komplexu 1 má poté za následek navázání proteinu Rtg2p na Mks1p, rozpad cytoplazmatické kotvy a následný vstup Rtg1p-Rtg3p komplexu do jádra (Dilova et al., 2004; Dilova et al., 2002). Do regulace této dráhy není zapojena Sch9p kináza, ale TORC1 ji pravděpodobně reguluje pouze přes Tap42-fosfatázy (Duvel et al., 2003; Urban et al., 2007).

6.6 Regulace importu živin a exprese permeáz

S. cerevisiae mění typy permeáz přenášejících aminokyseliny na plazmatické membráně v závislosti na dostupnosti a kvalitě živin. Dochází tak regulací aktivity serin/threoninové kinázy Npr1p. Ta je za podmínek vhodných pro růst fosforylována a inaktivována, což vede ke stabilizaci selektivních aminokyselinových permeáz na cytoplazmatické membráně, jakou je například tryptofan přenášející permeáza Tat2p (Beck et al., 1999; Schmidt et al., 1998). Je-li buňka vystavena účinkům rapamycinu

či nedostatku na dusík bohatých sloučenin, poté dochází k defosforylaci a aktivaci Npr1p kinázy Sit4p fosfatázou. To má za následek degradaci potravně selektivních Tat2p permeáz a stabilizaci Gap1p permeáz na plazmatické membráně. Ty jsou méně potravně selektivní, přenášejí široké spektrum aminokyselin a tím zajišťují buňce přísun živin při nedostatku preferovaných zdrojů (Beck et al., 1999; Jacinto et al., 2001; Schmidt et al., 1998).

Exprese Gap1p permeázy a dalších proteinů zodpovědných za příjem a zpracování alternativních zdrojů dusíku (jako například Mep2p, Dal5p, Bat2p a Agp1p) je regulována TORC1 přes GATA transkripční faktor Gln3p (Shamji et al., 2000). Ten je součástí NDP („nitrogen discrimination pathway“) signalizační dráhy známé rovněž jako NCR („nitrogen catabolite repression“). Má-li buňka optimální podmínky pro růst, je tato signalizační dráha inaktivována a transkripční faktor Gln3p je fosforylován, což vede k interakci s proteinem Ure2p, který brání jeho translokaci do jádra (Cardenas et al., 1999; Hardwick et al., 1999). Inaktivace TORC1 rapamycinem či nedostatkem dusíku má za následek fosfatázou Sit4p řízenou defosforylaci Gln3p, přerušení jeho interakce s Ure2p a přesun do jádra, kde aktivuje transkripci genů pro zpracování méně preferovaných zdrojů dusíku, jakými jsou například prolin nebo allantoin (Cardenas et al., 1999; Cooper, 2002; Duvel et al., 2003; Hardwick et al., 1999; Jacinto et al., 2001).

TORC1 dále ovlivňuje expresi aminokyselinových permeáz přes SPS (Ssy1p, Ptr3p, Ssy5p) senzorový proteinový komplex, který udržuje aktivní regulaci Tap42p-fosfatázových komplexů. Tento komplex je lokalizován na plazmatické membráně, kde vnímá extracelulární aminokyseliny. Navázáním aminokyseliny na tento senzor dochází k translokaci transkripčního faktoru Stp1p do jádra, kde aktivuje transkripci AAP („amino acid permease“) genů (Andreasson and Ljungdahl, 2002; Shin et al., 2009).

7 Regulace TOR komplexu 2

Kvůli absenci specifického inhibitoru, jakým je u TORC1 rapamycin, je o regulaci TORC2 velmi málo známo. Studie naznačují, že aktivitu TORC2 pravděpodobně regulují přímou interakcí ribozomy. Tento mechanismus zaručuje aktivitu TORC2 pouze v rostoucích buňkách (Zinzalla et al., 2011). Dalším pravděpodobným regulátorem může být stres vyvolaný prostředím, který inhibuje TORC2 signalizaci za nepříznivých podmínek. Mechanismus jakým buňka reguluje aktivitu TORC2 za stresových podmínek je doposud neznámý, uvažuje se, že se na něm podílejí proteiny Slm a stresem aktivovaná fosfatáza calcineurin (Bultynck et al., 2006; Mulet et al., 2006).

8 Signalizace TOR komplexu 2

Prvním a prozatím nejlépe prostudovaným procesem, jenž je regulován aktivitou TORC2 je polarizace aktinového cytoskeletu. Genetické studie poukazují na protein kinázu C1 (Pkc1p) jako na prostředníka, přes kterého TORC2 reguluje organizaci aktinu. Pkc1p je součástí CWI („The cell wall integrity pathway“), jež reguluje remodelaci a polarizaci buněčné stěny během buněčného růstu (Helliwell et al., 1998a; Helliwell et al., 1998b). Pkc1p se zdá být fosforylována aktivitou TORC2, ovšem není známo, je-li Pkc1p fosforylována přímo či nikoliv (Facchinetti et al., 2008). Dalším předpokládaným efektozem, kterým TORC2 reguluje aktinový cytoskelet je Ypk2p. Tato kináza patří do skupiny AGC kináz je pravděpodobně hlavním substrátem TORC2 u *Saccharomyces cerevisiae* a je přímo fosforylována v oblasti Ser641 a Thr659 (Kamada et al., 2005). Do regulace aktinového cytoskeletu jsou zapojeny také Slm proteiny. Slm jsou TORC2 a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) navazující proteiny vytvářející dva homology Slm1p a Slm2p, které mohou regulovat organizaci aktinu nezávisle na Ypk2p, a jejich přímá fosforylace Tor2p kinázou se zdá být důležitá pro jejich lokalizaci na plazmatické membráně (Audhya et al., 2004; Fadri et al., 2005).

Druhým procesem regulovaným TORC2 je endocytóza. TORC2 zdá se kontrolovat endocytózu přes CWI, Ypk2p a její homolog Ypk1p, ovšem přesný mechanismus této regulace není znám (deHart et al., 2002; Luo et al., 2008).

Posledním známým procesem, který je pod kontrolou TORC2 je syntéza sphingolipidů. Ty slouží jako součást lipidické dvojvrstvy a jsou také využívány jako

signální molekuly. TORC2 řídí jejich syntézu přes Ypk2p, antagonistou tohoto procesu je Ca²⁺/calmodulin-závislá fosfatáza calcineurin, která zajišťuje přežití buňky za nepříznivých podmínek (Aronova et al., 2008; Mulet et al., 2006).

9 Závěr

TORC1 a TORC2 hrají významnou roli v regulaci buněčného růstu. Jejich aktivita je regulována množstvím a kvalitou dostupných živin, stresem a ribozomy. Velkou neznámou ovšem zůstává přesný mechanismus, jakým jsou změny růstových podmínek buňkou zaznamenávány a dále signalizovány k TOR komplexům, které na tyto stimuly reagují změnou své kinázové aktivity. Nedávné studie začaly odhalovat nové signalizační dráhy a substráty spojené s aktivitou TORC1 a TORC2. Pochopení těchto signalizačních procesů je v současnosti pro vědce a lékaře velmi zajímavým a důležitým objektem zájmu. Tyto procesy regulující buněčný růst, buněčné dělení a buněčnou smrt jsou elementárními aspekty života, a proto je jejich farmaceutická regulace klinicky velmi důležitá. Pochopení a charakterizace kompletní TOR signalizační sítě u kvasinek a savců může vést k odhalení mnoha faktorů, na které se bude možno v budoucnu zaměřit při léčbě různých lidských onemocnění. Už dnes jsou známy genetické choroby, jako například tuberózní skleróza nebo Peutz-Jeghersův syndrom (Inoki et al., 2005), které jsou způsobeny zvýšenou aktivitou TOR signalizace. Zvýšená kinázová aktivita TOR komplexů byla zjištěna také u mnoha lidských maligních chorob a v neposlední řadě i u metabolických poruch vedoucích k obezitě či cukrovce (Laplante and Sabatini, 2012).

10 Literatura

Alarcon, C.M., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (1999). Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular biology of the cell* *10*, 2531-2546.

Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O. (2002). Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes & development* *16*, 3158-3172.

Aronova, S., Wedaman, K., Aronov, P.A., Fontes, K., Ramos, K., Hammock, B.D., and Powers, T. (2008). Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell metabolism* *7*, 148-158.

Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A.B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M.N., and Emr, S.D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO journal* *23*, 3747-3757.

Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Molecular biology of the cell* *7*, 25-42.

Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* *402*, 689-692.

Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N. (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *The Journal of cell biology* *146*, 1227-1238.

Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* *10*, 868-880.

Berchtold, D., and Walther, T.C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular biology of the cell* *20*, 1565-1575.

Bertram, P.G., Choi, J.H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T.F., and Zheng, X.F. (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *The Journal of biological chemistry* *275*, 35727-35733.

Binda, M., Peli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., and De Virgilio, C. (2009). The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Molecular cell* *35*, 563-573.

Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Molecular cell* *46*, 105-110.

Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in biochemical sciences* *25*, 225-227.

Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., and Cyert, M.S. (2006). Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Molecular and cellular biology* *26*, 4729-4745.

Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Molecular and cellular biology* *13*, 6012-6023.

Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & development* *13*, 3271-3279.

Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L., and Nomura, M. (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Molecular biology of the cell* *15*, 946-956.

Cooper, T.G. (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS microbiology reviews* *26*, 223-238.

Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., and Hall, M.N. (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 6784-6789.

- Dames, S.A., Mulet, J.M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M.N., and Grzesiek, S. (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. *The Journal of biological chemistry* 280, 20558-20564.
- De Craene, J.O., Soetens, O., and Andre, B. (2001). The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *The Journal of biological chemistry* 276, 43939-43948.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25, 6392-6415.
- deHart, A.K., Schnell, J.D., Allen, D.A., and Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology* 156, 241-248.
- DiComo, C.J., and Arndt, K.T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & development* 10, 1904-1916.
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J.C., and Powers, T. (2004). Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1.Rtg3p-dependent target genes. *The Journal of biological chemistry* 279, 46527-46535.
- Dilova, I., Chen, C.Y., and Powers, T. (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current biology : CB* 12, 389-395.
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular cell* 19, 15-26.
- Duvel, K., Santhanam, A., Garrett, S., Schneper, L., and Broach, J.R. (2003). Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Molecular cell* 11, 1467-1478.
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., *et al.* (2008). The mammalian target of rapamycin

complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO journal* **27**, 1932-1943.

Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., and Kunz, J. (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Molecular biology of the cell* **16**, 1883-1900.

Gao, M., and Kaiser, C.A. (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nature cell biology* **8**, 657-667.

Gasch, A.P., and Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & integrative genomics* **2**, 181-192.

Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H., and Schuller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO journal* **21**, 135-144.

Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., and Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**, 410-424.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177-189.

Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14866-14870.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.

Helliwell, S.B., Howald, I., Barbet, N., and Hall, M.N. (1998a). TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**, 99-112.

Helliwell, S.B., Schmidt, A., Ohya, Y., and Hall, M.N. (1998b). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Current biology* : CB 8, 1211-1214.

Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M.N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular biology of the cell* 5, 105-118.

Hinnebusch, A.G. (1997). Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *The Journal of biological chemistry* 272, 21661-21664.

Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology* 59, 407-450.

Hosiner, D., Lempiainen, H., Reiter, W., Urban, J., Loewith, R., Ammerer, G., Schweyen, R., Shore, D., and Schuller, C. (2009). Arsenic toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* is a consequence of inhibition of the TORC1 kinase combined with a chronic stress response. *Molecular biology of the cell* 20, 1048-1057.

Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., and Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & development* 23, 1929-1943.

Huber, A., French, S.L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M.P., Tyers, M., Rougemont, J., Beyer, A.L., and Loewith, R. (2011). Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *The EMBO journal* 30, 3052-3064.

Chen, Y., and Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of cell science* 124, 161-170.

Cherkasova, V.A., and Hinnebusch, A.G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes & development* 17, 859-872.

Inoki, K., Corradetti, M.N., and Guan, K.L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature genetics* 37, 19-24.

Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2001). TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Molecular cell* *8*, 1017-1026.

Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R.A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Molecular and cellular biology* *17*, 1110-1117.

Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & development* *18*, 2491-2505.

Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Molecular and cellular biology* *30*, 908-921.

Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Molecular and cellular biology* *25*, 7239-7248.

Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., and Ohsumi, Y. (2010). Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and cellular biology* *30*, 1049-1058.

Kawai, S., Urban, J., Piccolis, M., Panchaud, N., De Virgilio, C., and Loewith, R. (2011). Mitochondrial genomic dysfunction causes dephosphorylation of Sch9 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* *10*, 1367-1369.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* *11*, 895-904.

Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* *10*, 935-945.

Komeili, A., Wedaman, K.P., O'Shea, E.K., and Powers, T. (2000). Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *The Journal of cell biology* *151*, 863-878.

Kong, M., Ditsworth, D., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2009). Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Molecular cell* 36, 51-60.

Kuepfer, L., Peter, M., Sauer, U., and Stelling, J. (2007). Ensemble modeling for analysis of cell signaling dynamics. *Nature biotechnology* 25, 1001-1006.

Kunz, J., Schneider, U., Howald, I., Schmidt, A., and Hall, M.N. (2000). HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *The Journal of biological chemistry* 275, 37011-37020.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Lee, J., Moir, R.D., and Willis, I.M. (2009). Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *The Journal of biological chemistry* 284, 12604-12608.

Lempiainen, H., and Shore, D. (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Current opinion in cell biology* 21, 855-863.

Lempiainen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., and Shore, D. (2009). Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Molecular cell* 33, 704-716.

Li, H., Tsang, C.K., Watkins, M., Bertram, P.G., and Zheng, X.F. (2006). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442, 1058-1061.

Liko, D., Conway, M.K., Grunwald, D.S., and Heideman, W. (2010). Stb3 plays a role in the glucose-induced transition from quiescence to growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 185, 797-810.

Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* 40, 159-185.

Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189, 1177-1201.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of

which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* *10*, 457-468.

Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O.N., and Dickson, R.C. (2008). The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *The Journal of biological chemistry* *283*, 10433-10444.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *290*, 1-18.

Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14315-14322.

Martin, D.E., Soulard, A., and Hall, M.N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* *119*, 969-979.

Mulet, J.M., Martin, D.E., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry* *281*, 33000-33007.

Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., and Marton, M.J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and cellular biology* *21*, 4347-4368.

Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Molecular cell* *12*, 1607-1613.

Perry, J., and Kleckner, N. (2003). The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* *112*, 151-155.

Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., 3rd, Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., and Powers, T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* *279*, 14752-14762.

- Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G.Z., and Nehlin, J.O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Molecular and cellular biology* *11*, 4876-4884.
- Rudra, D., Zhao, Y., and Warner, J.R. (2005). Central role of Ifh1p-Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *The EMBO journal* *24*, 533-542.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496-1501.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* *17*, 596-603.
- Sehgal, S.N., Baker, H., and Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* *28*, 727-732.
- Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M., and Nishimoto, T. (2001). Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *The Journal of biological chemistry* *276*, 7246-7257.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G., and Schreiber, S.L. (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Current biology : CB* *10*, 1574-1581.
- Shen, C., Lancaster, C.S., Shi, B., Guo, H., Thimmaiah, P., and Bjornsti, M.A. (2007). TOR signaling is a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* *27*, 7007-7017.
- Shin, C.S., Kim, S.Y., and Huh, W.K. (2009). TORC1 controls degradation of the transcription factor Stp1, a key effector of the SPS amino-acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* *122*, 2089-2099.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M.N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *The EMBO journal* *17*, 6924-6931.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* *251*, 283-287.

- Singh, J., and Tyers, M. (2009). A Rab escort protein integrates the secretion system with TOR signaling and ribosome biogenesis. *Genes & development* 23, 1944-1958.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 56, 1-32.
- Talarek, N., Cameroni, E., Jaquenoud, M., Luo, X., Bontron, S., Lippman, S., Devgan, G., Snyder, M., Broach, J.R., and De Virgilio, C. (2010). Initiation of the TORC1-regulated GO program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway. *Molecular cell* 38, 345-355.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* 26, 663-674.
- Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28, 721-726.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R., and De Virgilio, C. (2008). Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Molecular microbiology* 69, 277-285.
- Wanke, V., Pedruzzi, I., Cameroni, E., Dubouloz, F., and De Virgilio, C. (2005). Regulation of GO entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *The EMBO journal* 24, 4271-4278.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* 24, 437-440.
- Wedaman, K.P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., 3rd, McCaffery, J.M., and Powers, T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 14, 1204-1220.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 57, 383-401.

- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *The Journal of biological chemistry* *280*, 30697-30704.
- Wurmser, A.E., Sato, T.K., and Emr, S.D. (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *The Journal of cell biology* *151*, 551-562.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* *9*, 1102-1109.
- Yan, G., Shen, X., and Jiang, Y. (2006). Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *The EMBO journal* *25*, 3546-3555.
- Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell* *38*, 768-774.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M.C. (1998). Rapamycin induces the Go program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Molecular and cellular biology* *18*, 4463-4470.
- Zhang, N., Wu, J., and Oliver, S.G. (2009). Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast. *Microbiology* *155*, 1690-1698.
- Zheng, X.F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G.R., and Schreiber, S.L. (1995). TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* *82*, 121-130.
- Zheng, Y., and Jiang, Y. (2005). The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the tap42-phosphatase complexes. *Molecular biology of the cell* *16*, 2119-2127.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* *144*, 757-768.