

TAVANE DAVID CAMBIAGHI

**ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DE PPAR $\beta$   
DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia Humana.

São Paulo

2009

TAVANE DAVID CAMBIAGHI

**ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DE PPAR $\beta$   
DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia Humana.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

São Paulo

2009

## RESUMO

Cambiaghi TD. Estudo do controle traducional de PPAR $\beta$  durante o processo de diferenciação de macrófagos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta (PPAR $\beta$ ) é um receptor nuclear que atua como fator de transcrição e está envolvido em diferentes processos celulares tais como: apoptose, proliferação e diferenciação. A diferenciação das células THP-1 em macrófagos, induzida por PMA, é associada ao aumento da expressão de PPAR $\beta$ . A UTR 5' de PPAR $\beta$  regula negativamente sua síntese, porém, o mecanismo molecular envolvido não foi esclarecido. No presente estudo, o estado traducional das células THP-1 diferenciadas por PMA foi investigado em associação à superprodução de PPAR $\beta$ . A presença de uORFs no transcrito de PPAR $\beta$ , contendo códons de iniciação compatíveis com seqüências de Kosak, poderia ser a causa do efeito inibitório da UTR 5'. Porém, a superprodução de PPAR $\beta$  nas células THP-1 diferenciadas por PMA aparentemente não está relacionada ao controle traducional convencional mediado pela fosforilação de eIF2 $\alpha$ . A incorporação reduzida de L-[U-14C]leucina revelou que a superprodução de PPAR $\beta$  ocorre durante inibição global da tradução, confirmada pela redução dos polissomos. Além disso, desfosforilação rápida e consistente de 4E-BP1 foi observada após tratamento com PMA. 4E-BP1 desfosforilado causa inibição da iniciação da tradução e favorece a tradução de mRNAs que contém IRES. De fato, a estrutura da UTR 5' de PPAR $\beta$  apresenta características de transcritos que formam IRES. Assim, a produção de PPAR $\beta$  pode ser regulada por IRES e a superprodução de PPAR $\beta$  ocorre concomitantemente com a inibição da tradução dependente de *cap*.

Palavras-chave: PPAR $\beta$ ; Diferenciação celular; Células THP-1; Controle traducional; IRES; uORFs; 5'-UTR; 4E-BP.

## ABSTRACT

Cambiaghi TD. Translation control of PPAR $\beta$  during macrophage differentiation [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  (PPAR $\beta$ ) is a nuclear receptor that acts as a transcription factor involved in a wide range of cellular processes such as apoptosis, proliferation and differentiation. The differentiation of THP-1 cells in macrophages, induced by PMA, is associated with overexpression of PPAR $\beta$ . Previous studies have shown that the 5'-UTR of the PPAR $\beta$  negatively regulates its expression, however, the molecular mechanism involved remains unclear. In this study, the translational status of PMA-differentiated THP-1 cells was investigated in association with overexpression of PPAR $\beta$ . Putative positive Kosak initiation codons are present in PPAR $\beta$  uORFs and could be the cause of the inhibitory effect of its 5'-UTR. However, the overproduction of PPAR $\beta$  in PMA-differentiated THP-1 cells is, apparently, not related to non conventional translation induced by eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Polysome profile analysis revealed that the over production of PPAR $\beta$  coincides with a decrease in the global content of polysomes. The impairment in protein synthesis was confirmed by the decrease in incorporation of L-[U-14C]leucine in to proteins. We detected a fast and consistent dephosphorylation of 4E-BP by PMA treatment. The increase in dephosphorylated 4E-BP levels is associated with inhibition of eIF4E cap-dependent translation initiation and favors the translation of mRNAs that contain IRES. In fact, the PPAR $\beta$  5'-UTR structure has some characteristics that resemble described IRES. Therefore, PPAR $\beta$  is preferentially translated when global protein synthesis is inhibited and its production may be controlled by IRES.

Key words: PPAR $\beta$ ; cell differentiation; THP-1 cells; translational control; IRES; uORFs; 5'-UTR; 4E-BP.

# *INTRODUÇÃO*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, PPARs, são fatores de transcrição que fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares, caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e pela regulação do metabolismo. Os PPARs foram originalmente identificados em 1990 e foram assim designados em virtude de serem receptores ativados por compostos que induzem proliferação de peroxissomas [Issemann and Green, 1990].

Peroxisomas são organelas pequenas com formato oval ou espiral, circundadas por uma única membrana. Estão presentes em todas as células de mamíferos, com exceção dos eritrócitos. Os peroxissomas apresentam enzimas que oxidam D-aminoácidos, ácido úrico e vários 2-hidroxi-ácidos utilizando oxigênio molecular com a formação de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado é convertido em água e oxigênio pela catalase, também presente nesta organela. Os peroxissomas também apresentam enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, particularmente na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (AG) de cadeia longa e na elongação de cadeias de ácidos graxos [Schoonjans et al., 1996b] [Schoonjans et al., 1996a].

A proliferação de peroxissomas é uma resposta celular a uma variedade de compostos químicos e a certas condições fisiopatológicas que envolvem mudanças drásticas na morfologia celular e atividade das enzimas dos peroxissomas [Lock et al., 1989]. Compostos de diversos grupos químicos podem desencadear proliferação de peroxissomas como: drogas hipolipemiantes (derivados do ácido fíbrico – clofibrato, fenofibrato e benzafibrato), Wy14643, herbicidas, antagonistas de leucotrienos e fármacos antiinflamatórios não esteroidais [Jump and Clarke, 1999].

A superfamília PPAR é composta de três isotipos:  $\alpha$ , NR1C1 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 1);  $\beta/\delta$ , NR1C2 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 2) e  $\gamma$ , NR1C3 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 3) que desempenham função importante no reconhecimento e metabolismo de lipídeos biologicamente ativos. Estes isotipos são codificados por genes específicos e apresentam padrão distinto de expressão [Bishop-Bailey, 2000;

Desvergne and Wahli, 1999; Kersten et al., 2000; Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b).

## **1.2 Padrão de expressão e funções celulares dos PPARs**

Quanto ao papel biológico, os membros da família PPAR desempenham função chave no metabolismo de lipídeos. Todavia, as isoformas apresentam funções específicas nos diferentes tipos celulares nos quais são encontrados.

Em humanos, o PPAR $\alpha$  é principalmente expresso no fígado, coração, rins (tecidos caracterizados por alta taxa de oxidação de ácidos graxos), além do intestino e pâncreas [Auboeuf et al., 1997; Sher et al., 1993]. O PPAR $\alpha$  é expresso também em células do sistema imunológico e vasculares [Keech et al., 2005; Plutzky, 2004]. Assim, sua ativação afeta a expressão de aproximadamente 80-100 genes, que regulam a oxidação de ácidos graxos, o metabolismo lipídico e o processo inflamatório [Duez et al., 2001; Kliewer et al., 2001; Lefebvre et al., 2006; Plutzky, 2003; Plutzky, 2004]. Além disso, agonistas deste receptor melhoram lesões arteroscleróticas e quadros de dislipidemia [Ahmed et al., 2007; Knight et al., 2003; Linton and Fazio, 2000].

PPAR $\gamma$  é classicamente caracterizado por sua expressão e função no tecido adiposo, aonde foi primeiramente identificado. É também expresso no músculo esquelético, fígado, coração e intestino [Mukherjee et al., 1997]. Como PPAR $\alpha$ , também tem sido identificado em células dos sistemas vascular e imunológico [Marx et al., 1998a; Marx et al., 1998b; Ricote et al., 1998]. A isoforma  $\gamma$  deste receptor está envolvida em diversos processos, tais como: diferenciação de adipócitos, estoque de lipídeos e homeostasia da glicose [Evans et al., 2004]. Polimorfismos que diminuem a atividade de PPAR $\gamma$  estão associados com resistência à insulina, diabetes tipo 2 e hipertensão, sugerindo um papel importante nestes processos [Barroso et al., 1999; Garg, 2004]. Além disso, apresenta efeitos antiinflamatórios e agonistas de PPAR $\gamma$  apresentam efeitos anti-ateroscleróticos [Kota et al., 2005]. Por outro lado, as propriedades de diferenciação celular e apoptose apresentadas por PPAR $\gamma$  são benéficas para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (mama, cólon, próstata, pancreático, biliar, pituitário e gástrico) [Bull, 2003; Heaney, 2003; Koeffler, 2003; Leibowitz and Kantoff, 2003; Tsujie et al., 2003].

A expressão ubíqua de PPAR $\beta$  sugere seu envolvimento em funções celulares básicas, tais como: síntese e renovação de membrana lipídica. Porém, é encontrada em altas quantidades no tecido adiposo, músculo esquelético, cérebro e pele [Berger and Moller, 2002; Braissant et al., 1996; Muoio et al., 2002]. Também acredita-se que possui função importante na proliferação e diferenciação celulares [Barish et al., 2006; Escher et al., 2001; Wang et al., 2003]. Apesar de pouco se saber sobre a principal função do PPAR $\beta$ , acredita-se que está envolvido na implantação e decidualização de embriões [Kersten et al., 2000], além do transporte reverso de colesterol [Oliver et al., 2001], maturação de oligodendrócitos [Peters et al., 2000; Saluja et al., 2001], metabolismo de lipídeos [Barak et al., 2002; Wang et al., 2003], desenvolvimento da placenta [Barak et al., 2002], proliferação de células hepáticas estreladas e pré-adipócitos [Hansen et al., 2001; Hellemans et al., 2003] e reabsorção óssea por osteoclastos [Mano et al., 2000]. O PPAR $\beta$  regula processos inflamatórios, como a inflamação aterogênica [Lee et al., 2003], e cicatrização de feridas [Kuenzli and Saurat, 2003]. Também está envolvido em processos cancerígenos, como o câncer de cólon. Porém, permanece contraditória a ação de PPAR $\beta$  como atenuador ou indutor na formação de tumores [Barak et al., 2002; Harman et al., 2004; He et al., 1999]. Além disso, efeitos benéficos de agonistas deste receptor têm sido encontrados na hiperlipidemia, obesidade, efluxo de colesterol e gasto de energia pelos músculos [Dressel et al., 2003; Tanaka et al., 2003].

### **1.3 Mecanismo de ativação transcricional por PPARs**

Estruturalmente, os PPARs são receptores nucleares que apresentam uma única cadeia polipeptídica organizada em quatro domínios: A/B, C ou domínio de ligação ao DNA (DBD), D e E/F ou domínio de ligação ao ligante (LBD) (**Figura 1**). O domínio N-terminal ou A/B é pouco conservado entre as três isoformas dos PPARs e apresenta função de ativação 1 (AF-1) que é transcricionalmente ativa na ausência de ligantes [Blanquart et al., 2003; Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b]. O estado de fosforilação deste domínio contribui para a modulação da atividade dos PPARs [Adams et al., 1997; Camp and Tafuri, 1997; Shalev et al., 1996; Zhang et al., 1996]. A região central apresenta domínio altamente conservado

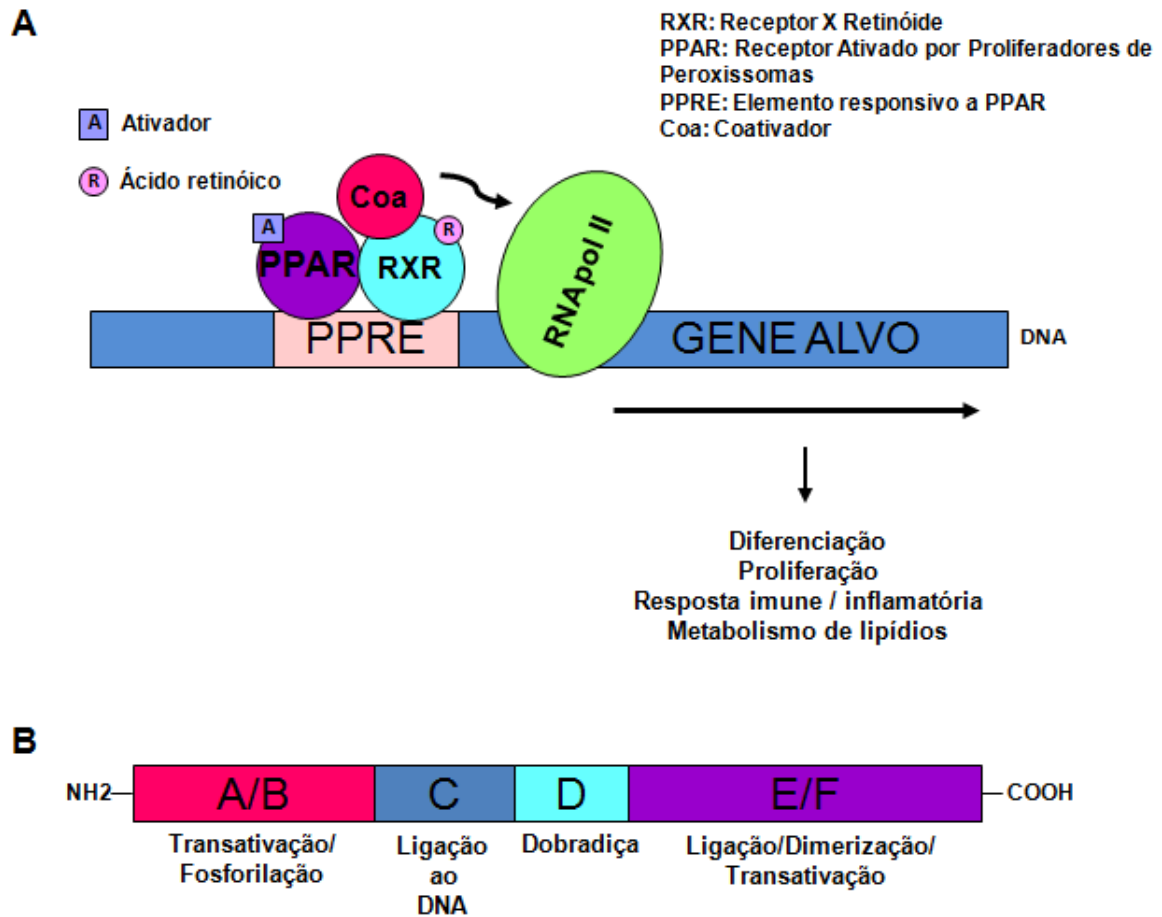


(domínio C), que representa o local de ligação ao DNA (DBD). Este domínio apresenta dois complexos “dedos de zinco” que são formados por arranjos protéicos constituídos de uma  $\alpha$ -hélice e uma folha  $\beta$ -pregueada mantidas unidas por um íon  $Zn^{2+}$ . Além disso, possui função de ativação 2 (AF-2) que está contida no domínio LBD, que é transcricionalmente ativa na presença de ligantes [Blanquart et al., 2003]. O domínio D ou região da dobradiça permite alterações conformacionais na molécula. Esta estrutura confere ao receptor um padrão estável de dobramento para que este se ajuste na fenda maior da dupla hélice do DNA e forme, desta forma, associações estáveis com as regiões regulatórias para controlarem a transcrição [Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b].

As isoformas dos PPARs são farmacologicamente distintas, apresentando ativação diferencial, apesar do alto grau de conservação dos domínios ligantes [Keller et al., 1993; Yu et al., 1995]. Estes, por sua vez, podem ser naturais como os ácidos graxos e derivados, ou sintéticos, como fármacos antiinflamatórios, hipolipidemiantes e anti-diabéticos.

Entre o grupo dos ligantes sintéticos, os fibratos (Wy14643, clofibrato, fenofibrato e outros), que são fármacos hipolipidemiantes, ativam preferencialmente o PPAR $\alpha$  [Forman et al., 1997; Kliewer et al., 1994; Krey et al., 1997; Yu et al., 1995]. Compostos anti-diabéticos da classe das tiazolidinedionas (troglitazona, ciglitazona, rosiglitazona, pioglitazona), por sua vez, ativam preferencialmente o PPAR $\gamma$  [Lehmann et al., 1995]. Um dos ligantes para PPAR $\beta$  é o composto químico L165041 (derivado do ácido fenoxiacético) e GW501516, altamente seletivo para este receptor [Berger et al., 1999; Oliver et al., 2001].

A ativação dos PPARs por ácidos graxos foi primeiramente descrita em 1992, com a utilização de um receptor quimérico em ensaios de transativação. O receptor era composto pelo domínio de ligação ao ligante de PPAR e pelo domínio de ligação ao DNA do receptor de glicocorticóides. Esta descoberta foi o primeiro indício de que os ácidos graxos podem ser moléculas sinalizadoras que controlam a atividade de receptores nucleares e, conseqüentemente, a expressão gênica [Gottlicher et al., 1992].



**Figura 1. Mecanismo de ativação e organização dos domínios dos PPARs - (A)** Os PPARs formam heterodímeros com os receptores X retinóides, são ativados por ligantes e modulam a transcrição por se ligarem em seqüências específicas (elementos responsivos aos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas - PPREs) na região promotora de genes alvos. **(B)** O domínio N-terminal A/B contém a porção de ativação transcricional independente de ligante (AF-1). O domínio C contém dois motivos “dedos de zinco” que ligam o PPRE na região regulatória dos genes responsivos ao PPAR. O domínio D ou região da dobradiça permite mudanças conformacionais na molécula. O domínio E/F representa um domínio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2).

A via pela qual os PPARs regulam a transcrição gênica envolve sua ativação inicial pela ligação a um ligante, através da qual ocorre mudança conformacional, que facilita a formação de um outro complexo heterodimérico com o receptor nuclear ativado pelo ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Esta mudança conformacional facilita a ligação de moléculas acessórias que são determinantes críticos para a ativação transcricional [Chen et al., 2006; DiRenzo et al., 1997]. Estas incluem proteínas co-repressoras, que são liberadas após a ativação de PPAR, e coativadoras, que são recrutadas para o PPAR ativado, desempenhando papel importante na atividade desses receptores. Como exemplos de moléculas co-repressoras destes receptores encontram-se as proteínas: co-repressora do receptor nuclear (NCoR) e mediadora

de silenciamento para o receptor de hormônio tireoidiano e retinóide (SMRT) e como coativadoras da transcrição: coativadora do receptor esteróide 1 (SRC-1) e proteína ligante de PPAR (PBP) [Michalik and Wahli, 1999].

Assim, o heterodímero (PPAR-RXR) se liga ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE). Os PPREs são seqüências específicas repetidas de hexanucleotídeos, separadas por uma base e localizadas nas regiões promotoras e intrônicas dos genes alvos [Desvergne and Wahli, 1999; Gearing et al., 1993].

O PPRE foi primeiramente identificado no promotor do gene que codifica a enzima acil-CoA oxidase que está envolvida na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos [Tugwood et al., 1992]. A seqüência consenso do PPRE é 5'-AACTAGGNCAAAGGTCA-3', na qual os PPARs ocupam a metade do sítio de ligação da extremidade 5' e os RXRs a outra metade da extremidade 3' [A et al., 1997].

#### **1.4 PPAR $\beta$ e macrófagos**

Os macrófagos são originários das células mielóides da medula óssea. A célula matriz é precursora de monócitos que, ao serem recrutados, atingem a circulação, podendo se alojar em diferentes tecidos, diferenciando-se em macrófagos residentes.

Durante o processo inflamatório, há aumento da migração de monócitos para o foco da lesão. Ocorre então ativação, processo no qual os monócitos passam a realizar funções complexas como quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas celulares e capacidade de morte tumoral. A ativação envolve a interação de citocinas com receptores presentes na membrana dos macrófagos. Esta interação desencadeia uma série de eventos moleculares intracelulares, que incluem hidrólise de fosfatidilinositol, formação de diacilglicerol, alterações nas concentrações citossólicas de cálcio, ativação de proteína quinase C, fosforilação de proteínas e alterações na transcrição gênica [Adams and Hamilton, 1984].

Os macrófagos possuem atividade secretora elevada, incluindo mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas,

hormônios, além de substâncias envolvidas na regulação da função e crescimento de outras células.

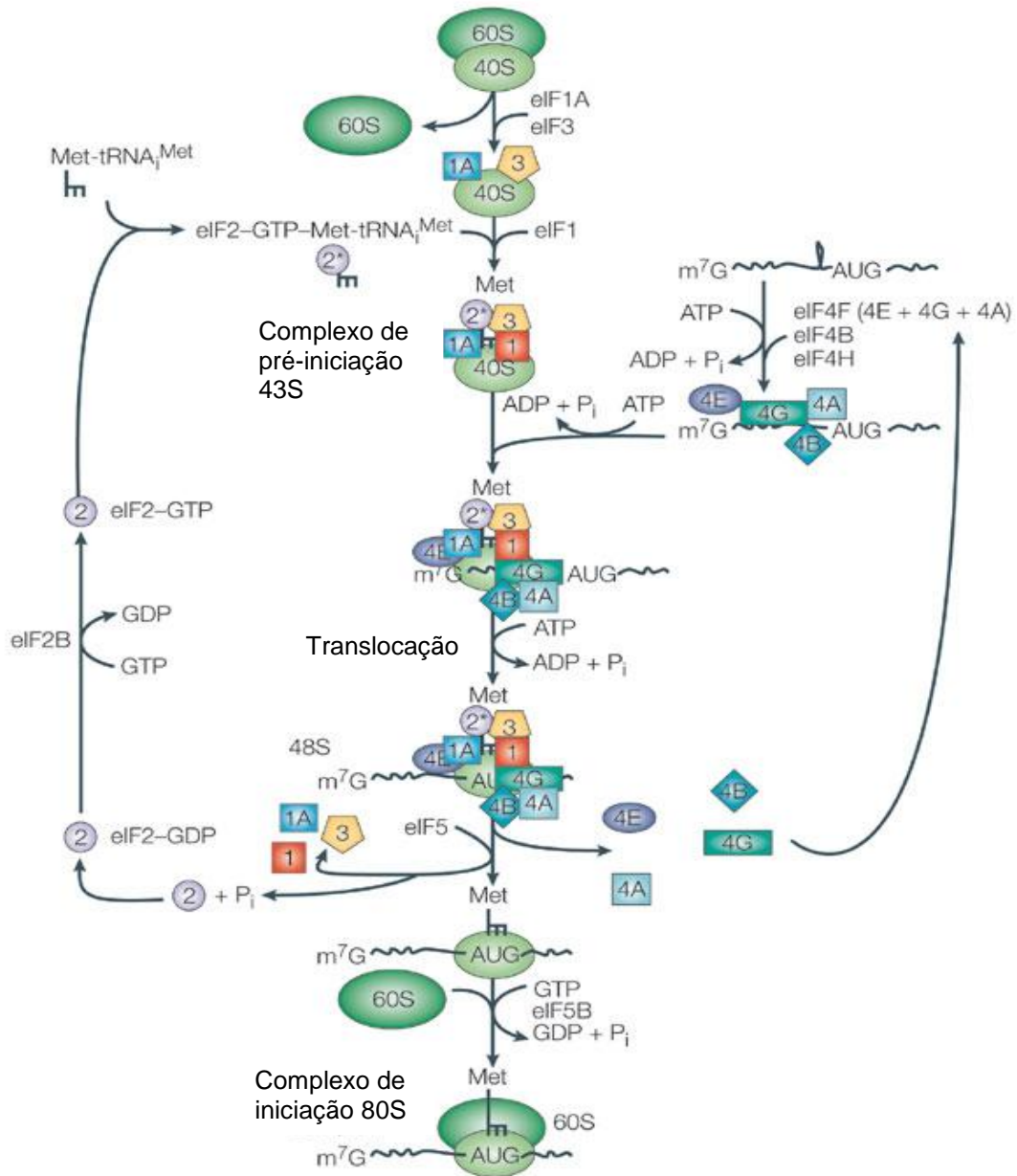
O PPAR $\beta$  é expresso em células mielóides e sua expressão é induzida durante a diferenciação de macrófagos humanos, além de promover acúmulo de lipídeos nestas células [Vosper et al., 2001]. As células THP-1, linhagem celular derivada de monócitos humanos, são amplamente usadas como modelo para o estudo da diferenciação de macrófagos. Estas células crescem em suspensão e podem ser induzidas à diferenciação na presença de um ativador da proteína quinase C, o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) [Tsuchiya et al., 1982]. Após este tratamento, as células THP-1 passam a aderir à placa de cultura. Foi demonstrado que este processo é acompanhado por aumento na produção e atividade de PPAR $\beta$ . Assim, o PPAR $\beta$  modula o estado de diferenciação das células THP-1 tratadas com PMA [Vosper et al., 2003].

## 1.5 Início da tradução em eucariotos

A tradução é dividida em 3 fases: iniciação, alongação e terminação. Estas fases estão sujeitas a mecanismos regulatórios específicos, entretanto, a iniciação é o passo limitante da tradução em muitas circunstâncias [Mathews et al., 2000].

O processo de síntese protéica em eucariotos envolve o reconhecimento e o recrutamento de mRNAs por uma maquinaria de iniciação da tradução, que compreende as subunidades ribossomais 40S e 60S e diversas proteínas regulatórias. Este processo é mediado por proteínas que são conhecidas como fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) (**Figura 2**).

A formação do complexo de pré-iniciação 43S ocorre a partir da disponibilidade de um conjunto de subunidades ribossomais dissociadas, que é mantido com a ajuda dos fatores eIF3 e eIF1A. A subunidade 40S, que se associa a estes dois fatores, é então ligada posteriormente ao complexo ternário – constituído por eIF2, tRNA carregando a metionina inicial e GTP - para formar o complexo de pré-iniciação 43S. A formação do complexo ternário é regulada por eIF2B [Hershey and Merrick, 2000].



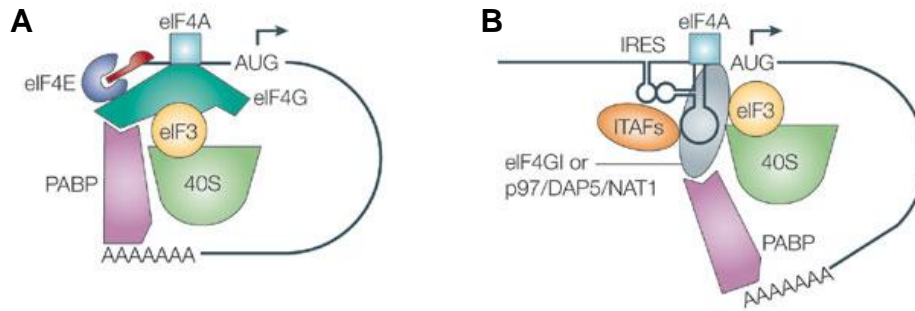
**Figura 2. Início da tradução em eucariotos** - O processo de iniciação da tradução envolve proteínas conhecidas como eIFs (fatores de iniciação eucarióticos). Os fatores eIF1A e eIF3 auxiliam na manutenção das subunidades ribossômicas (40S e 60S) dissociadas. Ambos os fatores se associam com a subunidade 40S, que então se associa ao complexo ternário (eIF2, tRNA carregando a metionina inicial (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) e GTP) para formar o complexo de pré-iniciação 43S. eIF2B atua regulando a formação do complexo ternário. O reconhecimento do capacete de 7 metil guanosina (m<sup>7</sup>G *cap*) pelo complexo 43S é mediado por eIF4E, uma proteína ligante de *cap*. Esta faz parte do complexo eIF4F, que é composto por eIF4E, eIF4A (uma helicase de RNA) e eIF4G (uma proteína estrutural). eIF4B e eIF4H ativam eIF4A. eIF3 e eIF4G participam na ligação do complexo 43S ao mRNA. Após ligação da subunidade 40S ao mRNA, ocorrerá a translocação deste até o códon de iniciação AUG. Após a formação do complexo 48S, ocorre liberação dos fatores (mediada por eIF5) e posterior reciclagem. A seguir, ocorrerá a associação da subunidade 60S e formação do complexo de iniciação 80S. eIF5B é requerido para a união da subunidade 60S ao mRNA. Figura modificada a partir de Holcik & Sonenberg [Holcik and Sonenberg, 2005].

O reconhecimento da extremidade 5' do mRNA pela estrutura do capacete de 7-metil guanosina (*cap*) é mediado pela proteína ligante de *cap*, eIF4E, que faz parte de um complexo ligante de *cap*, eIF4F. Este complexo, que é responsável pela seleção de mRNAs para tradução, consiste de eIF4E, eIF4A (uma helicase de RNA) e eIF4G (uma proteína estrutural). Os fatores eIF4B e eIF4H promovem a atividade helicase de eIF4A. A ligação do complexo de pré-iniciação 43S ao mRNA é assistida pela interação entre eIF3 e eIF4G. eIF3 é então recrutado à subunidade ribossomal 40S. Assim, a subunidade 40S é ligada ao mRNA e, em seguida, começa a translocar por este mRNA na direção 5' - 3' até localizar o códon de iniciação (muito freqüentemente um AUG), que é, então, associado à subunidade ribossomal 60S para formar o complexo de iniciação 80S. Os fatores que participam nesta etapa da tradução são liberados após a formação do complexo de iniciação 48S e são reciclados para um novo ciclo de iniciação. A liberação dos eIFs é assistida por eIF5, que facilita a hidrólise de GTP carregado por eIF2, e assim, a dissociação do complexo 48S. eIF5B é requerido para a junção da subunidade 60S à 40S, em cada passo da elongação polipeptídica do início da tradução [Hershey and Merrick, 2000; Merrick, 2004].

### 1.5.1 Início da tradução mediada por IRES

Uma proporção considerável de mRNAs celulares, 3 – 5%, foi mostrada ser traduzida por um mecanismo independente de *cap* [Johannes et al., 1999]. É provável que muitos destes transcritos possuam um sítio interno de entrada de ribossomos (IRES) em sua UTR 5'. A tradução mediada por IRES é o único mecanismo traducional independente de *cap* reconhecido [Johannes et al., 1999; Johannes and Sarnow, 1998]. Os IRES recrutam ribossomos diretamente, ignorando o requerimento da estrutura do *cap* 5' do mRNA e o fator de iniciação eIF4E (**Figura 3**).

Os transcritos contendo IRES foram inicialmente descobertos em picornavírus, em que foi observado que ocorria iniciação da tradução dos RNAs virais que naturalmente não apresentam *cap* e, além disso, eram traduzidos ainda mais eficientemente [Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988].



**Figura 3. Iniciação da tradução dependente de IRES e dependente de *cap*** - **(A)** O fator eIF4E liga-se ao *cap*. A subunidade ribossomal 40S interage com o mRNA através da proteína eIF4G, que também se liga a eIF3. eIF4A é uma helicase de RNA envolvida na destabilização da estrutura secundária da região não traduzida 5' (UTR 5') do transcrito. A proteína ligante de poliA (PABP), circulariza o mRNA através de sua interação com a cauda de poliA e eIF4G. **(B)** Fatores atuantes *trans* de IRES (ITAFs) e fragmentos proteolíticos de eIF4G1 ou p97/DAP5/NAT1, um homólogo distinto de eIF4G, estimulam a tradução dependente de IRES. Figura modificada a partir de Holcik & Sonenberg [Holcik and Sonenberg, 2005].

RNAs celulares contendo IRES foram descritos em um número limitado, mas crescente, de mRNAs. Os IRES têm sido reportados muitas vezes em transcritos que possuem UTRs 5' longas com alto conteúdo de bases GC e estrutura secundária estável. Contudo, não há características discrimináveis distintas na UTR 5' que indiquem a presença de IRES. A detecção de IRES permanece grandemente empírica e conta com o uso de modelos de construções de mRNAs bicistrônicos [Hellen and Sarnow, 2001; Pelletier and Sonenberg, 1988].

Muitos mRNAs que contêm IRES codificam proteínas que desempenham funções importantes no crescimento, proliferação, diferenciação e regulação da apoptose celular. Estas funções podem ser devido ao fato destes processos requererem um controle diferenciado da expressão gênica. Estímulo da tradução mediada por IRES está associado ao declínio global da síntese protéica e intensificação da tradução seletiva de mRNAs específicos. Acredita-se que a regulação seletiva da tradução mediada por IRES seja importante para a regulação da sobrevivência e morte celular [Holcik et al., 2000].

O mecanismo molecular preciso da tradução mediada por IRES não está completamente esclarecido. Como mencionado anteriormente, IRES celulares são freqüentemente encontrados em UTRs 5' longas e estruturadas e são relativamente ineficientes no direcionamento da tradução sob condições que favorecem a tradução dependente de *cap*. Contudo, a tradução dependente de IRES é favorecida quando

a tradução dependente de *cap* está comprometida [Stoneley and Willis, 2004]. Isto ocorre porque a síntese protéica mediada por IRES é independente da presença ou integridade de alguns fatores gerais de iniciação, principalmente eIF4E [Hellen and Sarnow, 2001]. A tradução dependente de IRES pode requerer proteínas celulares auxiliares que são conhecidas como fatores *trans* atuantes de IRES (ITAFs) [Martinez-Salas et al., 2001]. O mecanismo de função das ITAFs não está totalmente esclarecido mas acredita-se que muitas ITAFs funcionem como chaperonas de RNA [Holcik and Sonenberg, 2005].

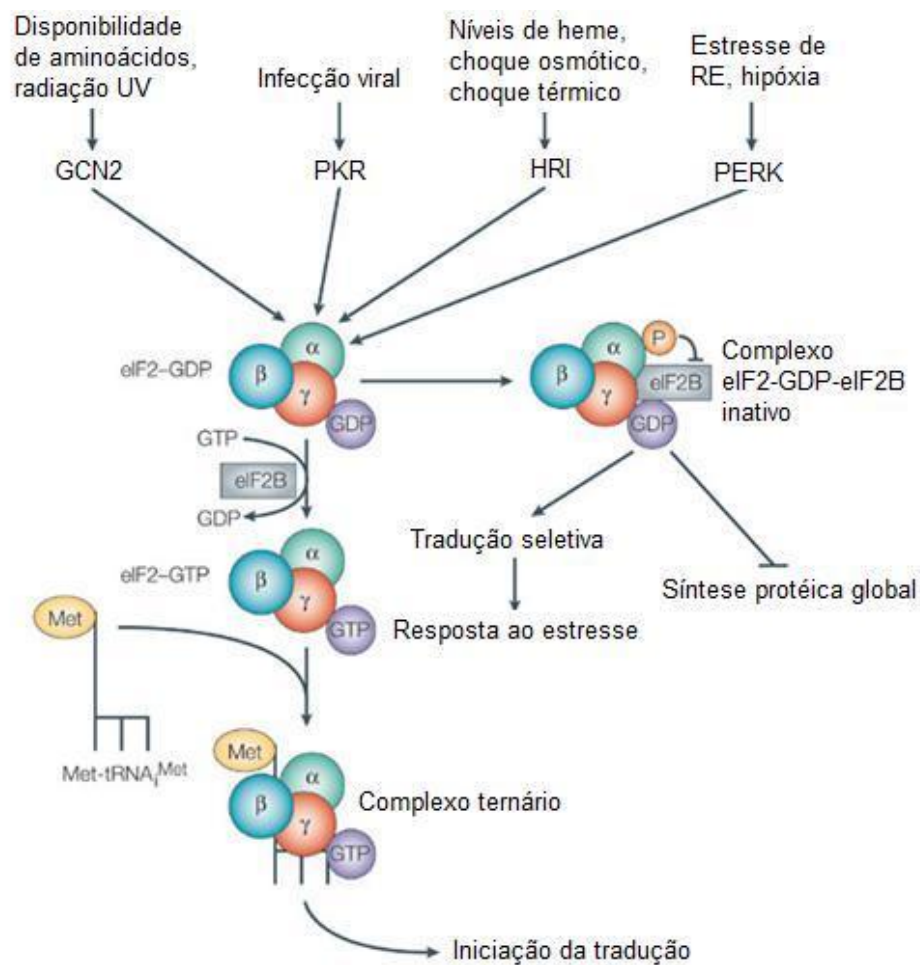
Possível conexão entre a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e tradução controlada por IRES foi proposta. A atividade de muitos transcritos que possuem IRES – tais como: transportador de aminoácidos catiônicos (CAT1) [Fernandez et al., 2002b], fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas-2 (PDGF2) e c-Myc [Gerlitz et al., 2002] – está aumentada durante o processo de diferenciação ou em diferentes tipos de estresses celulares que aumentam a fosforilação de eIF2 $\alpha$  e reduzem a síntese protéica global. Contudo, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  não se correlaciona com o aumento da atividade de outras IRES, tais como: proteína ligante de imunoglobulina (BIP)/proteína reguladora de glicose de 78 kDa (GRP78), proteína serina/treonina quinase de proto-oncogene (PIM1) ou inibidor da proteína de apoptose 2 humana (HIAP2) [Fernandez et al., 2002b; Warnakulasuriyarachchi et al., 2004]. O mecanismo sugerido de regulação traducional de IRES pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  não está claro, pois a fosforilação de eIF2 $\alpha$  inibe a formação do complexo ternário que é requerido para a iniciação em todos os mRNAs celulares. Desta forma, o aumento na fosforilação de eIF2 $\alpha$  pode reduzir ou estimular a tradução dependente de IRES e inibir aquela dependente de *cap*.

## 1.6 Disponibilidade do complexo ternário

A participação de GTP - eIF2 $\alpha$  na formação do complexo ternário é um passo limitante na interação do tRNA carregando a metionina inicial à subunidade ribossomal 40S. Diferentes tipos de estresses, tais como: hipóxia, infecção viral, falta de aminoácidos e choque térmico, reduzem a tradução global por desencadear a fosforilação da subunidade  $\alpha$  de eIF2 no resíduo de serina 51. Fosforilação esta que



inibe a troca de GDP por GTP, catalisada por eIF2B, prevenindo a formação do complexo ternário [CLEMENS, 2004; DEVER ET AL., 1992; HINNEBUSCH, 2000] (**Figura 4**). Como eIF2 $\alpha$  está presente em excesso em relação à eIF2B, mesmo pequenas mudanças na fosforilação de eIF2 $\alpha$  têm grande efeito na formação do complexo ternário e tradução. A fosforilação de eIF2 $\alpha$  reduz a tradução de maneira geral. Contudo, sua fosforilação aumenta a tradução de mRNAs específicos, que codificam proteínas de resposta ao estresse e de recuperação do processo de síntese protéica [HINNEBUSCH, 2000].



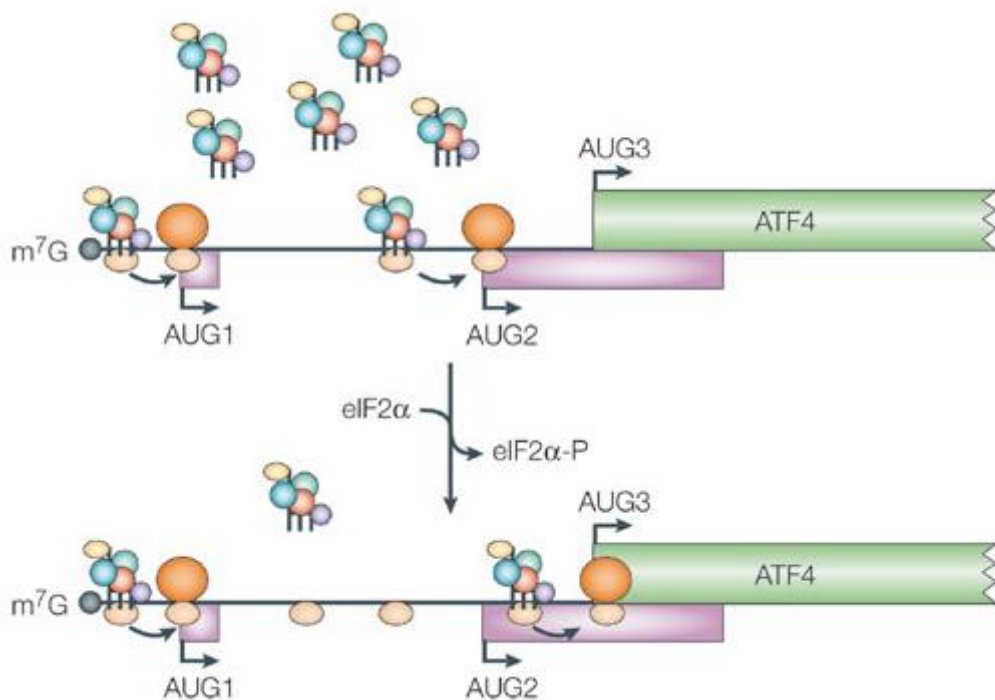
**Figura 4. Integração de respostas a diferentes tipos de estresse pela fosforilação do fator de iniciação eIF2 alfa** - Diferentes condições de estresses resultam na fosforilação da subunidade  $\alpha$  do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 $\alpha$ ), que é realizada por 4 diferentes quinases: HRI (*haem-regulated inhibitor kinase*), PKR (*protein kinase RNA*), PERK (*PKR-like endoplasmatic reticulum kinase*) e GCN2 (*general control non-derepressible-2*). eIF2 faz parte do complexo ternário, que é composto de eIF2, GTP e tRNA carregando a metionina inicial (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup>). Como GTP é hidrolisado durante o início da tradução, eIF2 ativo necessita ser reciclado a cada iniciação pela troca de GDP-GTP catalisada por eIF2B. A fosforilação de 2 $\alpha$  inibe a troca de GDP-GTP, que resulta na inibição global da tradução. A tradução de um subgrupo de mRNAs continua, portanto, para permitir que a célula se adapte à condições de estresse. ER, retículo endoplasmático; UV, ultravioleta. Figura modificada a partir de Holcik & Sonenberg [Holcik and Sonenberg, 2005].

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  é mediada por 4 proteínas quinases distintas: HRI (*haem-regulated inhibitor kinase*), PKR (*protein kinase RNA*), PERK (*PKR-like endoplasmatic reticulum kinase*) e GCN2 (*general control non-derepressible-2*), que integram diversos sinais de estresse em uma via comum. Estas quinases compartilham homologia em seus domínios catalíticos de quinase, mas seus domínios regulatórios são distintos e estão sujeitos a diferentes mecanismos indutores [Holcik and Sonenberg, 2005].

Em células de mamíferos, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  é importante na regulação da tradução seletiva durante o estresse de retículo endoplasmático (RE) e em resposta a proteínas com alteração conformacional [Kaufman, 2004]. O RE é o local de síntese e dobramento de proteínas que são direcionadas à secreção, membrana plasmática e organelas. Desta forma, o RE é sensível à perturbações na homeostasia celular que são desencadeadas por diferentes tipos de estresse, incluindo depleção de cálcio, falta de glicose ou hipóxia que resulta na indução de uma resposta a proteínas dobradas erroneamente [Ron, 2002]. A resposta celular a proteínas com conformação errônea é conhecida como UPR (*unfolded protein response*). A UPR é manifestada pela redução na síntese protéica global e ativação da síntese específica de proteínas de resposta ao estresse, tais como: fator de ativação de transcrição 4 (ATF4) e proteína regulada por glicose de 78 kDa (BIP/GRP78) [Kaufman, 2004]. Uma função importante da UPR é reduzir a demanda na maquinaria de conformação da proteína para proteger as células do estresse.

A ativação da UPR pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  é mediada pela quinase transmembrana de RE, PERK [Harding et al., 1999]. Geralmente, a ativação de PERK é bloqueada pela sua interação com a proteína chaperona BIP. Um aumento na conformação errônea das proteínas no RE causa dissociação de BIP e PERK, que permite a oligomerização de PERK e autofosforilação, seguida pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  [Bertolotti et al., 2000]. A fosforilação de eIF2 $\alpha$  por PERK atenua a tradução da maioria dos mRNAs. Entretanto, a tradução do mRNA de ATF4 é aumentada sob estas condições [Harding et al., 2000b]. Esta regulação positiva é crucial para a UPR, onde ATF4 ativa a transcrição de genes responsivos a UPR. Estes genes codificam proteínas que respondem ao estresse de RE para restabelecimento da homeostasia celular [Harding et al., 2000a; Harding et al., 2003]. A tradução do mRNA de ATF4 é regulada por um mecanismo conhecido por

tradução seletiva mediada por eIF2 $\alpha$  ou tradução mediada por janelas abertas de leitura na UTR 5' (uORFs). Assim, a UTR 5' de ATF4 contém 2 uORFs, sendo que uma delas se sobrepõe a ORF de ATF4, inibindo sua tradução. Quando o complexo ternário é abundante em decorrência do baixo grau de fosforilação de eIF2 $\alpha$ , os ribossomos iniciam na uORF1 e freqüentemente reiniciam na uORF2. Porém, como a uORF2 se sobrepõe a ORF de ATF4, a tradução da uORF2 suprime a produção de ATF4. Por outro lado, mediante situações de estresse, em que ocorre aumento dos níveis de fosforilação de eIF2 $\alpha$  e formação reduzida de complexo ternário, o ribossomo transpassa pela uORF2 e reinicia a tradução no códon de iniciação de ATF4 (**Figura 5**) [Lu et al., 2004; Vattem and Wek, 2004]. Portanto, em condições normais, estas uORFs exercem efeito inibitório sobre o gene ATF4, porém, sob situações de estresse, este gene tem sua síntese estimulada através do mecanismo de controle de tradução dependente de uORFs.



**Figura 5. Regulação da tradução de ATF4 mediada por uORFs** - A tradução do fator ativador da transcrição 4 (ATF4) é regulada por 2 janelas abertas de leitura na UTR 5' (uORFs). Em baixos níveis de fosforilação de eIF2 $\alpha$ , o complexo ternário é abundante e os ribossomos iniciam na uORF1 e freqüentemente reiniciam na uORF2. Como a uORF2 se sobrepõe a ORF de ATF4, a tradução da uORF2 suprime a tradução de ATF4. Mediante situações de estresse, ocorre aumento dos níveis de fosforilação de 2 $\alpha$  e conseqüente redução da formação de complexo ternário, o ribossomo transpassa pela uORF2 e inicia no códon de iniciação de ATF4 [Holcik and Sonenberg, 2005].

## 1.7 A disponibilidade de 4E-BP controla a troca entre tradução dependente de *cap* e dependente de IRES

O recrutamento de ribossomos ao mRNA é um passo limitante no início da tradução e alvo freqüente para o controle traducional [Hershey and Merrick, 2000]. Existem dois mecanismos distintos de acoplamento de ribossomos nas células de mamíferos: tradução dependente de *cap* e dependente de IRES.

O fator de início de tradução 4F (eIF4F) atua na ligação da subunidade ribossomal 40S à extremidade 5' do mRNA com *cap*. eIF4F é um complexo que contém 3 subunidades: eIF4E (subunidade ligante de *cap*), eIF4A (uma RNA helicase dependente de ATP / ATPase dependente de RNA) e eIF4G (atua como um esqueleto para a ligação de eIF4E e eIF4A). Além disso, eIF4G interage com a subunidade menor do ribossomo ligando o fator eIF3 e a proteína ligante de poli(A) (PABP), estabelecendo assim uma ligação crítica entre o mRNA e o ribossomo [Gingras et al., 1999; Hentze, 1997; Hershey and Merrick, 2000].

A formação do complexo eIF4F é dinâmica e totalmente regulada [Richter and Sonenberg, 2005]. Em particular, a disponibilidade de eIF4E para formação do complexo eIF4F é modulada por uma família de pequenas moléculas repressoras da tradução, as proteínas ligantes de eIF4E (4E-BPs) [Lin et al., 1994; Pause et al., 1994a]. Quando desfosforiladas, as proteínas 4E-BPs interagem fortemente com eIF4E, inibindo-o [Gingras et al., 2001b]. O grau de fosforilação das 4E-BPs é modulado por muitos estímulos extracelulares. Estímulos nutricionais e hormonais tendem a aumentar o grau de fosforilação das 4E-BPs ativando a tradução, enquanto que estresses nutricionais e ambientais levam a sua desfosforilação e conseqüente inibição da síntese protéica [Gingras et al., 2001b; Raught et al., 2000].

O início da tradução em muitos mRNAs que contêm IRES requer os mesmos eIFs essenciais para a tradução de mRNAs dependente de *cap*, exceto eIF4E [Anthony and Merrick, 1991; Pause et al., 1994b; Pestova et al., 1996]. Devido ao fato de eIF4E não ser requerido para a tradução dependente de IRES, tem se assumido que este fator não desempenha função na regulação da atividade de IRES. Sendo assim, em condições nas quais 4E-BP encontra-se desfosforilada, a tradução dependente de IRES é favorecida em relação à tradução dependente de

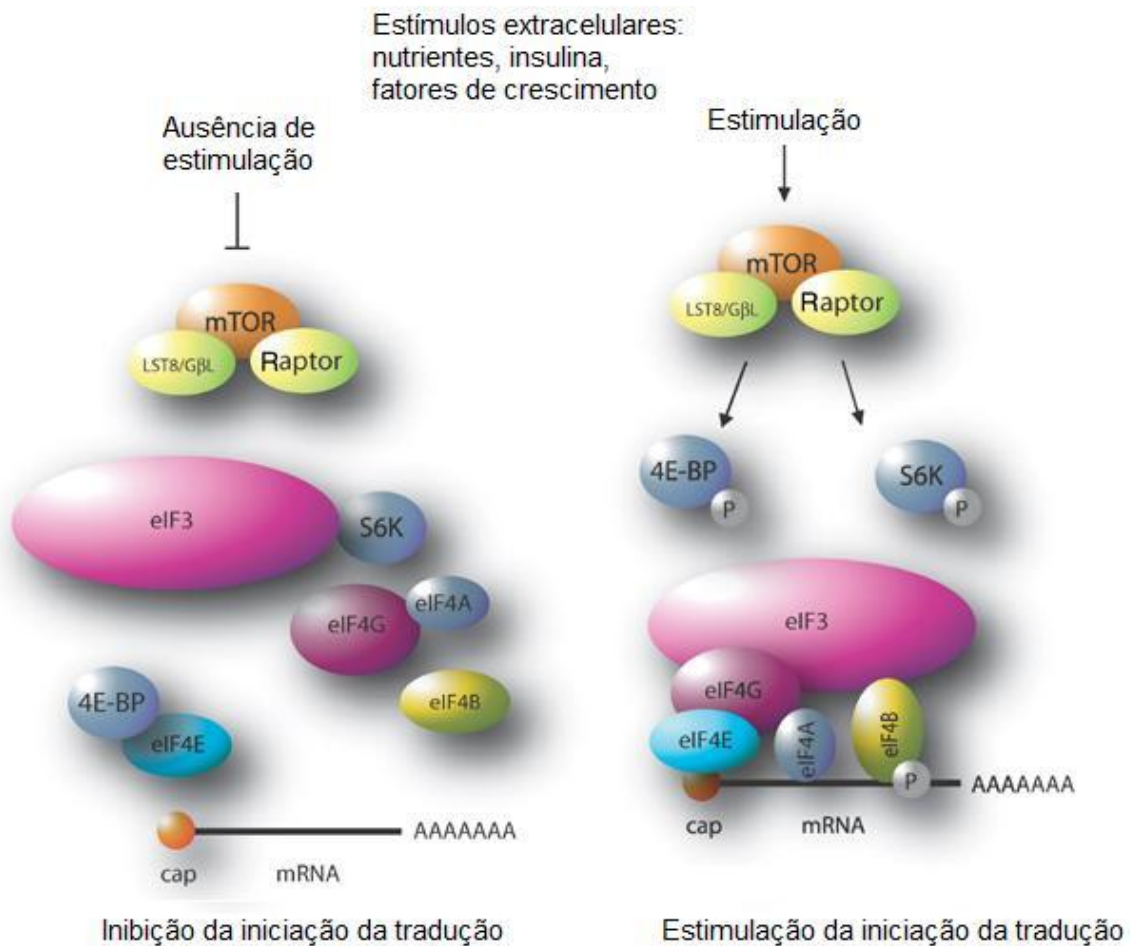
*cap*. Diferentemente, quando 4E-BP se encontra fosforilada a tradução de mRNAs dependente de *cap* ocorre normalmente [Svitkin et al., 2005].

## 1.8 Via PI3K/Akt/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é ativada por vários estímulos extracelulares, tais como: fatores de crescimento, mitógenos e hormônios. Um alvo importante a jusante desta via é a tradução de mRNAs dependente de *cap* [Hay and Sonenberg, 2004; Hennessy et al., 2005; Petroulakis et al., 2006; Stephens et al., 2005]. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) regula a síntese protéica através da fosforilação e inativação da proteína repressora da tradução, 4E-BP1, e através da fosforilação e ativação da quinase da proteína ribossomal S6, polipeptídeo 1 (S6K1) [Gingras et al., 2001a; Hay and Sonenberg, 2004; Jacinto and Hall, 2003; Kim and Sabatini, 2004; Kim et al., 2003; Ruggero and Pandolfi, 2003]. As 4E-BPs podem ser encontradas em 3 formas: não fosforilada e fosforilada, e neste último estágio, hipo ou hiperfosforiladas. Quando hiperfosforiladas, as 4E-BPs são liberadas de eIF4E, ativando preferencialmente e aumentando a tradução dependente de *cap*. Por outro lado, quando não fosforiladas, interagem fortemente com eIF4E, inibindo este tipo de tradução e ativando modos alternativos de síntese protéica, como a dependente de IRES.

Para controlar a atividade traducional e processos metabólicos adicionais, mTOR coordena sinais extracelulares, como os descritos acima, com a disponibilidade de aminoácidos e aporte energético intracelular [Hay and Sonenberg, 2004]. Na ausência destes estímulos, a proteína S6K1 se associa ao fator eIF3, inibindo-o [Mamane et al., 2006]. Após estimulação, o complexo mTOR/raptor é ativado para fosforilar S6K1 e 4E-BP1 (**Figura 6**) [Mamane et al., 2006]. A fosforilação de S6K1 no resíduo T389 promove sua dissociação de eIF3 e a torna alvo de fosforilação pela enzima quinase dependente de fosfoinosítídeo 1 (PDK1) no resíduo T229, causando sua ativação completa. Após total ativação, S6K1 fosforila eIF4B e S6. eIF4B fosforilado em S422 se associa a eIF3 [Holz et al., 2005; Shahbazian et al., 2006]. A interação de mTOR com eIF3 também estimula a associação entre eIF3 e eIF4G [Harris et al., 2006]. Estas interações moleculares

cooperam para aumentar a formação do complexo de iniciação de tradução e tradução dependente de *cap*.



**Figura 6. Ativação da iniciação da tradução por mTOR** - mTOR ao ser ativado por estímulos extracelulares, forma um complexo com as proteínas Raptor e proteína semelhante a subunidade  $\beta$  da proteína G (LST8/G $\beta$ L). Nesta condição, este é recrutado à eIF3 para fosforilar dois substratos principais: 4E-BPs e S6Ks. 4E-BP fosforilado é liberado de eIF4E. A fosforilação e ativação de S6K1 leva a sua dissociação de eIF3. S6K1 ativado fosforila eIF4B e S6. A fosforilação de eIF4B em T422 leva a sua associação com eIF3. mTOR também estimula a associação entre eIF3 e eIF4G. Todas estas alterações culminam em tradução dependente de *cap*. Por outro lado, na ausência de estímulos, S6K1 é associado com eIF3 e 4E-BP a eIF4E, inibindo a iniciação e a tradução dependente de *cap*. Figura modificada a partir de Mamane *et al.* [Mamane et al., 2006].

Ao se observar mais detalhadamente a via PI3K/AKT/mTOR e mais especificamente a proteína mTOR, visualiza-se a formação de dois complexos distintos: complexo TOR1 de mamíferos (mTORC1) e complexo TOR2 de mamíferos (mTORC2). Estes são distintos funcionalmente e estruturalmente e compartilham a mesma subunidade catalítica – mTOR.

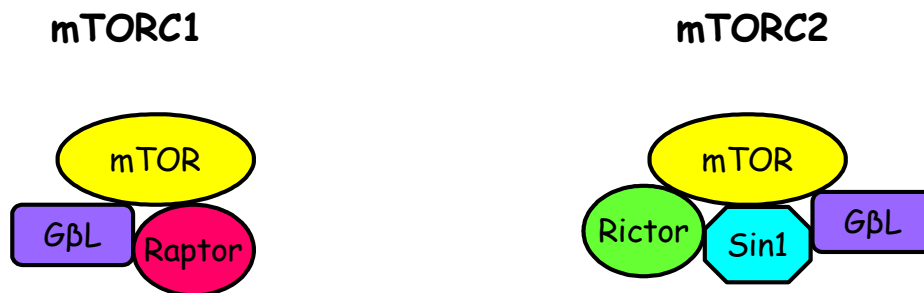
mTORC1 é o principal regulador da biogênese ribossomal e síntese protéica [Hay and Sonenberg, 2004]. mTORC1 regula estes processos através da fosforilação/inativação de 4E-BP1 e fosforilação/ativação de S6K1 [Hay and Sonenberg, 2004; Tee and Blenis, 2005]. O estado de fosforilação de ambas é comumente usado para avaliar a atividade de mTORC1 [Bhaskar and Hay, 2007]. Além disso, é um dos principais reguladores da autofagia, evento em que partes do citoplasma são englobadas em vacúolos e destruídas em lisossomos, em resposta à falta de nutrientes [Kamada et al., 2004; Lum et al., 2005]. Por outro lado, este complexo também atua no controle da transcrição de muitos genes, particularmente os envolvidos nas vias biossintéticas e metabólicas, tais como: vias envolvidas no controle do crescimento e tamanho celulares, estimulação da síntese e estabilidade protéicas e biogênese de ribossomos [Peng et al., 2002].

mTORC2, diferentemente de mTORC1, foi mostrado regular a organização do citoesqueleto de actina [Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004]. mTORC2 fosforila diretamente proteínas membro de uma classe conservada de quinases chamadas AGC (quinases para proteína quinase A, G e C). Para completa ativação, estas quinases são fosforiladas em resíduos de serina ou treonina dentro de uma região hidrofóbica (HM) no terminal carboxílico. Assim, a descoberta de mTORC2 subsequente levou a sua identificação como quinase HM para pelo menos duas quinases AGC, Akt e PKC $\alpha$  [Sarbassov et al., 2004; Sarbassov et al., 2005].

As subunidades que definem os mTORCs são: a proteína adaptadora de mTOR sensível a rapamicina (Raptor) em mTORC1 e a proteína parceira de mTOR insensível a rapamicina (Rictor) em mTORC2 (**Figura 7**). Raptor parece interagir com mTOR em múltiplos pontos de contato, sendo essencial para a atividade de mTORC1 e contém sítios de ancoragem para os seus substratos: 4E-BP1 e S6K1 [Fingar and Blenis, 2004; Harris and Lawrence, 2003; Hay, 2005; Wullschleger et al., 2006]. Por outro lado, ambos os complexos possuem G $\beta$ L, proteína semelhante a subunidade  $\beta$  da proteína G. A deleção desta proteína demonstrou que esta não é essencial para a atividade de mTORC1, porém, é requerida para a função de mTORC2 [Kim et al., 2003].

A integridade do complexo mTORC2 requer Rictor, SIN1 e G $\beta$ L e, portanto, a deficiência de qualquer subunidade é suficiente para bloquear a atividade quinase

HM de mTORC2 para Akt e PKC $\alpha$  [Guertin et al., 2006; Sarbassov et al., 2004]. Estas 3 subunidades são interdependentes quanto à interação com mTOR e essenciais para a função de mTORC2. Porém, para a atividade de mTORC1, é necessária a presença da proteína Raptor juntamente com mTOR (**Figura 7**) [Bhaskar and Hay, 2007].



**Figura 7. Proteínas que compõem os mTORCs** – As subunidades que definem os complexos TOR1 (mTORC1) e TOR2 (mTORC2) de mamíferos, são as proteínas Raptor em mTORC1 e rictor em mTORC2. Por outro lado, ambos os complexos possuem GβL, proteína semelhante a subunidade β da proteína G e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Além dessas proteínas é essencial a presença de Sin1 para a atividade de mTORC2.

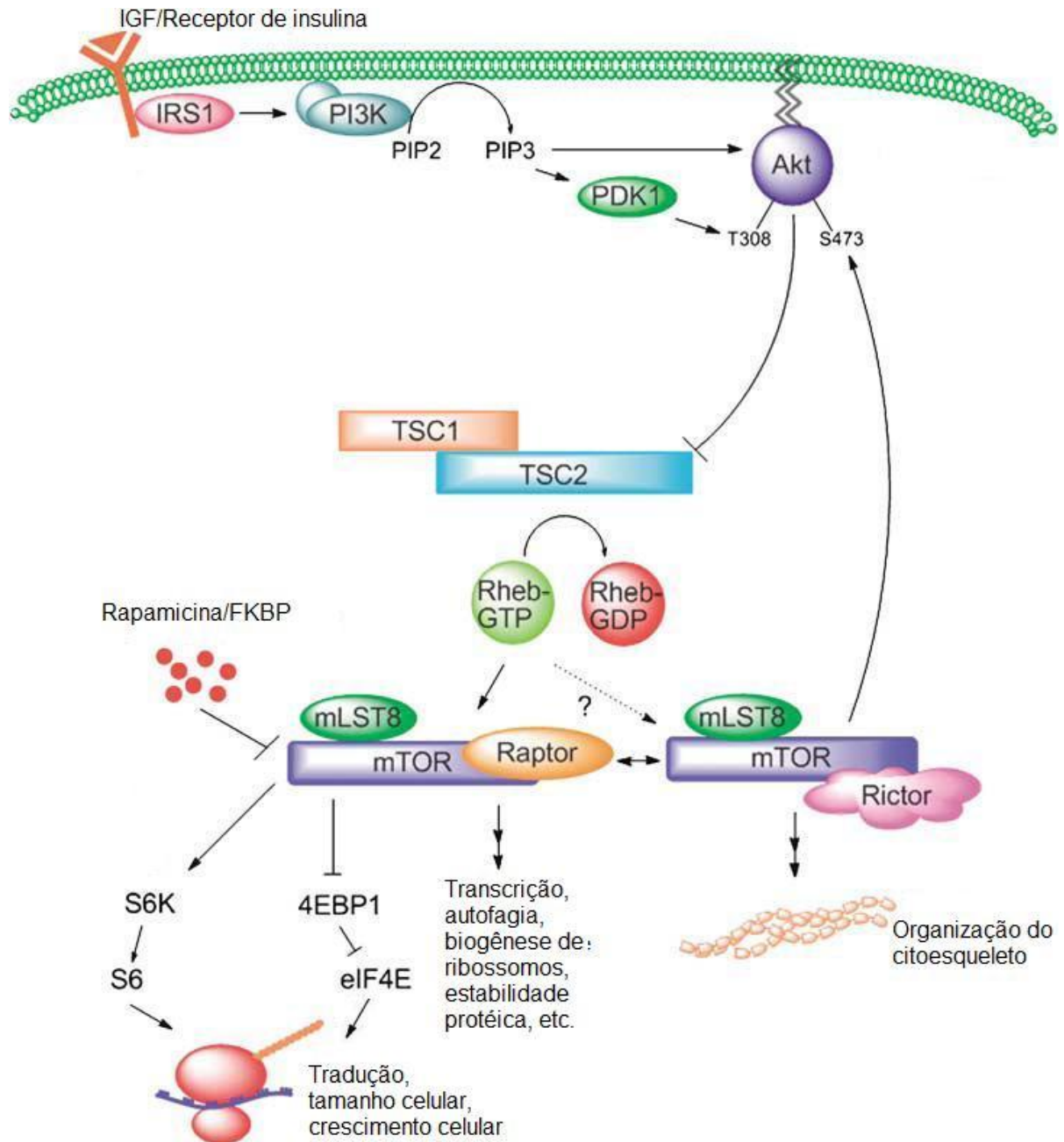
A via de mTOR responde a fatores de crescimento (tais como: insulina ou fatores de crescimento semelhantes à insulina) através da via PI3K. A ligação destes agentes aos seus receptores leva ao recrutamento e fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e recrutamento da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Esta se liga a IRS e converte fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) na membrana celular em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 recruta a quinase-1 dependente de 3-fosfoinosítídeo (PDK1) e Akt para a membrana resultando na fosforilação do resíduo T308 e ativação de Akt pela proteína PDK1 [Corradetti and Guan, 2006; Wullschleger et al., 2006]. Porém, para a completa ativação, Akt também precisa ser fosforilada em outro resíduo, S473, por mTORC2 (**Figura 8**) [Sarbassov et al., 2005].

As proteínas da esclerose tuberosa 1 (TSC1) e 2 (TSC2) formam um heterodímero que regula negativamente a sinalização de mTOR. TSC2 é fosforilada e inativada por Akt em resposta à insulina [Gao et al., 2002; Inoki et al., 2002; Potter et al., 2002]. TSC2 atua como uma GAP (proteína ativadora de GTPase) para a pequena GTPase homóloga de Ras enriquecida no cérebro (Rheb) [Li et al., 2004].

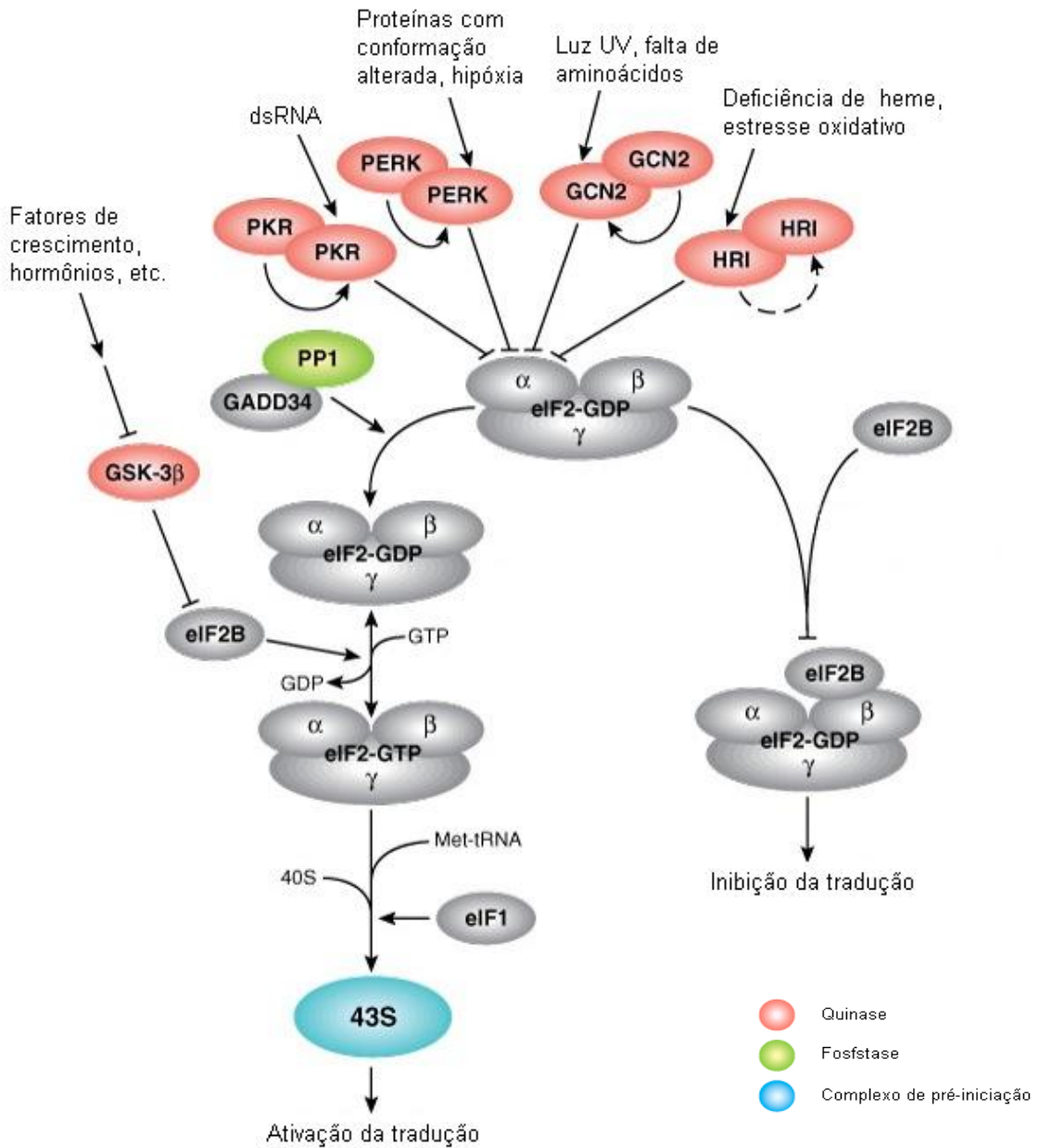


Esta se liga à mTOR, ativando-a em uma maneira dependente de GTP, o que induz mudança conformacional em mTORC1 e ativação e fosforilação dos alvos a jusante [Long et al., 2005]. Esta fosforilação causa inibição de 4E-BP e ativação de S6K e conseqüente, ativação da tradução e crescimento celular [Jefferies et al., 1994; Mamane et al., 2004]. Além disso, mTORC1 ativa outros processos como transcrição, autofagia, biogênese de ribossomos e estabilidade protéica. Por outro lado, este complexo pode ser inibido pela droga rapamicina. Esta droga forma um complexo com outra molécula, a proteína de 12 kDa ligante de FK506 (FKBP-12), que irá inibir diretamente e potencialmente mTORC1 [Brown et al., 1994; Chiu et al., 1994; Sabatini et al., 1994; Sabers et al., 1995]. Com relação a mTORC2, não é claro como Rheb-GTP afeta a atividade deste complexo e se o efeito de Rheb em mTORC2 é positivo ou negativo [Wullschleger et al., 2006]. Porém, a estimulação deste complexo está associada à organização do citoesqueleto [Kim et al., 2003; Sarbassov et al., 2004].

Outra proteína importante que pertence a via PI3-K/Akt/mTOR é glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Esta quinase foi descoberta há cerca de 20 anos como uma proteína quinase cuja função foi confinada ao metabolismo de glicogênio. Entretanto, sabe-se atualmente que esta proteína possui função-chave na regulação de diversas funções celulares, como, sinalização por insulina, fatores de crescimento e nutrientes. Além disso, participa do controle da divisão celular, apoptose, entre outras. Assim, quando a via PI3-K/Akt/mTOR é estimulada, por exemplo, com hormônios ou fatores de crescimento, ocorre ativação de Akt/PKB que, por sua vez, fosforila e inibe GSK3, fosforilação esta, que ocorre nas duas isoformas, GSK3 $\alpha$  e  $\beta$ , nos resíduos de serina 21 e 9, respectivamente [Cohen and Frame, 2001]. Esta inibição resulta na desfosforilação e conseqüente ativação dos seus substratos, incluindo glicogênio sintase e eIF2B. eIF2B ativado recicla eIF2-GDP por eIF2-GTP, possibilitando que este complexo seja envolvido em um novo ciclo de síntese protéica e assim, estimula a síntese de glicogênio e iniciação global da tradução, exercendo papel importante neste controle (**Figura 9**) [Proud and Denton, 1997; Welsh et al., 1998; Welsh and Proud, 1993].



**Figura 8. Via PI3K/Akt/mTOR** - Insulina ou fatores de crescimento semelhantes à insulina ativam IRS1 e PI3K. PIP3, produto lipídico de PI3K, recruta PDK1 e Akt para a membrana plasmática. Akt é fosforilada por PDK1 e mTORC2 para sua completa ativação e, conseqüentemente, fosforila alvos que promovem crescimento e sobrevivência celular, incluindo o complexo TSC1/TSC2. Por fosforilar TSC2, Akt inativa a atividade GAP das TSC2s para a pequena proteína G Rheb. Rheb-GTP é um potente ativador do complexo mTORC1. mTORC1 fosforila muitos alvos, incluindo proteínas de controle de tradução tais como, 4E-BP1 e S6K. Figura modificada a partir de Corradetti e Guan [Corradetti and Guan, 2006].



**Figura 9. Papel de GSK3 na via de síntese proteica** - Mediante situações de estresse, eIF2 $\alpha$  é fosforilado pela ativação de diferentes quinases (PKR, PERK, GCN2 e HRI). A fosforilação de eIF2 $\alpha$  causa bloqueio geral da tradução pela estabilização do complexo eIF2 - GDP - eIF2B, que impede a formação de eIF2 - GTP. Para que ocorra outro ciclo de iniciação, GDP deve ser substituído por GTP, reação catalisada por eIF2B, e o complexo eIF2 - GTP - Met-tRNA<sup>met</sup> se ligará a subunidade ribossomal 40S, formando o complexo de pré-iniciação 43S. O fator eIF2B também pode sofrer inibição por fosforilação pela ação de GSK3. Fatores de crescimento e hormônios induzem a fosforilação de GSK3, inibindo-a, e assim, causam ativação da tradução. A proteína induzida por dano de DNA (GADD34) se associa com a proteína fosfatase 1 (PP1) para desfosforilação de eIF2. Figura modificada a partir de [www.cellsignal.com/pathways/translational-control.jsp](http://www.cellsignal.com/pathways/translational-control.jsp).

## 1.9 Controle traducional de PPAR $\beta$

Até o presente momento, uma das poucas informações conhecidas a respeito de alguma forma de controle traducional de PPAR $\beta$  é que a remoção da UTR 5' de seu transcrito intensifica sua produção [Larsen et al., 2002]. Apesar do mecanismo molecular deste controle não estar elucidado, sabe-se que as uORFs presentes na UTR 5' de PPAR $\beta$  poderiam atenuar a eficiência traducional deste gene. Neste estudo, também foi avaliada a possibilidade de uma regulação traducional mediada por IRES, baseada na utilização de vetores bicistrônicos. Entretanto, os resultados obtidos foram inconclusivos devido ao fato da UTR 5' deste gene apresentar atividade promotora incomum [Larsen et al., 2002]. Desta forma, outros experimentos são necessários para determinar o mecanismo de controle traducional de PPAR $\beta$ .

*CONCLUSÃO*

## 6 CONCLUSÃO

O aumento da produção de PPAR $\beta$  mediante tratamento das células THP-1 com PMA é seguido por intensa desfosforilação de 4E-BP. Este processo é conhecido por inibir globalmente o início da tradução dependente de *cap*, devido ao fato de que 4E-BP desfosforilada se liga a eIF4E inibindo-o. mRNAs que contêm IRES são preferencialmente traduzidos em condições nas quais o eIF4E ativo não se encontra disponível. Neste contexto, o transcrito de PPAR $\beta$  contém características estruturais importantes tais como: estrutura secundária estável, alto conteúdo de GC e uma longa UTR 5', que são compatíveis com mRNAs que formam IRES. A inibição geral da tradução demonstrada neste modelo ocorre no momento em que a produção de PPAR $\beta$  é estimulada, indicativo de que essas alterações traducionais não interferem com a tradução do transcrito de PPAR $\beta$ , indício de regulação traducional (observar modelo proposto na **Figura 33**). Esta estimulação foi acompanhada por aumento do conteúdo do transcrito de PPAR $\beta$  o que indica a ocorrência de modulação transcricional associada à regulação da tradução. Na condição em que as células são tratadas com PMA observa-se também aumento da produção de mTOR acompanhada da fosforilação de S6K e estimulação da via mTORC2, que leva à fosforilação de GSK3 $\beta$  (envolvida na reciclagem de eIF2 $\alpha$ ) e PKC (envolvida no processo de diferenciação). Por outro lado, na condição em que as células THP-1 não são tratadas e permanecem indiferenciadas, a tradução de PPAR $\beta$  dependente de *cap* pode estar sendo inibida pelas uORFs, visto que podem exercer efeito inibitório sobre sua produção. Ambos os mecanismos de controle traducional, mediado por IRES ou uORFs, são estimulados quando a subunidade  $\alpha$  de eIF2 encontra-se fosforilada. Com base nos resultados obtidos pode-se constatar que a produção do transcrito de PPAR $\beta$  durante o processo de diferenciação das células THP-1 é possivelmente regulada pelo mecanismo traducional dependente de IRES.

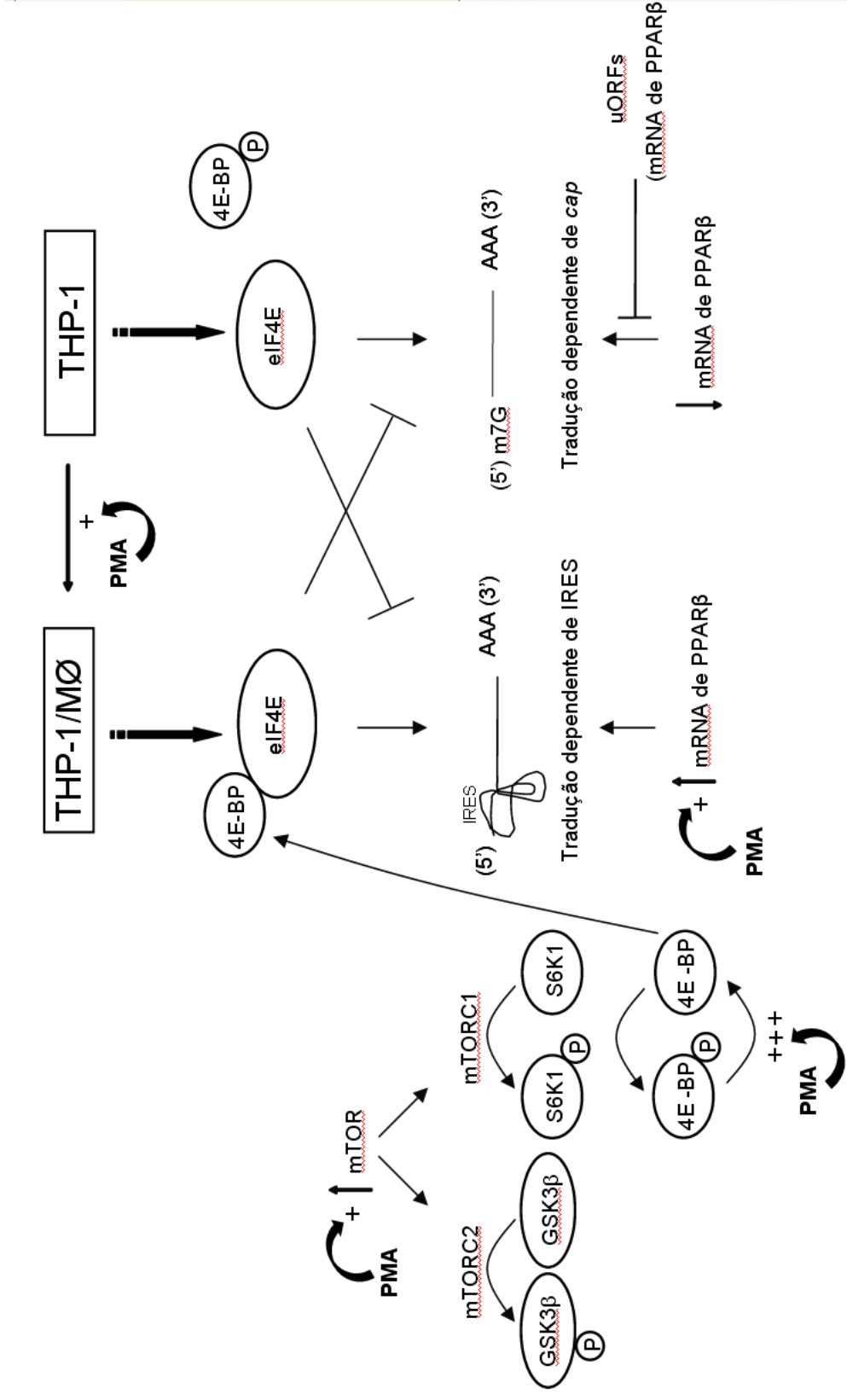


Figura 33. Modelo Proposto – Provável regulação translacional do transcrito de PPAR $\beta$  durante diferenciação das células THP-1.

*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997): Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272:20108-17.

Adams DO, Hamilton TA (1984): The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 2:283-318.

Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997): Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272:5128-32.

Aeder SE, Martin PM, Soh JW, Hussaini IM (2004): PKC-eta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene* 23:9062-9.

Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, Kanda T, Orasanu G, Sharlach M, Zandbergen F, Plutzky J (2007): PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262:184-98.  
Anthony DD, Merrick WC (1991): Eukaryotic initiation factor (eIF)-4F. Implications for a role in internal initiation of translation. *J Biol Chem* 266:10218-26.

Asseffa A, Dickson LA, Mohla S, Bremner TA (1993): Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells display increased levels of MHC class I and class II mRNA and interferon-gamma-inducible tumoricidal activity. *Oncol Res* 5:11-8.

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H (1997): Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46:1319-27.

Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006): Searching for IRES. *Rna* 12:1755-85.

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM (2002): Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:303-8.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006): PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116:590-7.

---

\* **De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S (1999): Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-3.

Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, Biswas C, Cullinan CA, Hayes NS, Li Y, Tanen M, Ventre J, Wu MS, Berger GD, Mosley R, Marquis R, Santini C, Sahoo SP, Tolman RL, Smith RG, Moller DE (1999): Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem* 274:6718-25.

Berger J, Moller DE (2002): The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409-35.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326-32.

Bhaskar PT, Hay N (2007): The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12:487-502.

Bishop-Bailey D (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129:823-34.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003): Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:267-73.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-66.

Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756-8.

Bull AW (2003): The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon cancer and inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* 127:1121-3.

Camp HS, Tafuri SR (1997): Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:10811-6.

Chen J, Kinyamu HK, Archer TK (2006): Changes in attitude, changes in latitude: nuclear receptors remodeling chromatin to regulate transcription. *Mol Endocrinol* 20:1-13.

Chiu MI, Katz H, Berlin V (1994): RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12574-8.  
Clemens MJ (2004): Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 23:3180-8.

Cohen P, Frame S (2001): The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769-76.

Corradetti MN, Guan KL (2006): Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25:6347-60.

Desvergne B, Wahli W (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-88.

Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG (1992): Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68:585-96.

DiRenzo J, Soderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S, Horlein A, Rosenfeld MG, Glass CK (1997): Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* 17:2166-76.

Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE (2003): The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 17:2477-93.

Duez H, Fruchart JC, Staels B (2001): PPARS in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J Cardiovasc Risk* 8:187-94.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2001): Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142:4195-202.

Evans RM, Barish GD, Wang YX (2004): PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10:355-61.

Fernandez J, Yaman I, Merrick WC, Koromilas A, Wek RC, Sood R, Hensold J, Hatzoglou M (2002a): Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J Biol Chem* 277:2050-8.

Fernandez J, Yaman I, Sarnow P, Snider MD, Hatzoglou M (2002b): Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem* 277:19198-205.

Fingar DC, Blenis J (2004): Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23:3151-71.

Forman BM, Chen J, Evans RM (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4312-7.

Frame S, Cohen P (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.

Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT (2002): The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 165:259-69.

Fulks RM, Li JB, Goldberg AL (1975): Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem* 250:290-8.

Gaba A, Wang Z, Krishnamoorthy T, Hinnebusch AG, Sachs MS (2001): Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *Embo J* 20:6453-63.

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D (2002): Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:699-704.

Garg A (2004): Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med* 350:1220-34.

Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA (1993): Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1440-4.

Gerlitz G, Jagus R, Elroy-Stein O (2002): Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* 269:2810-9.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N (2001a): Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15:2852-64.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999): eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-63.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001b): Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15:807-26.

Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA (1992): Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4653-7.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM (2006): Ablation in mice of the mTORC components

raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Dev Cell* 11:859-71.

Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K (2001): Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR $\delta$ )-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* 276:3175-82.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000a): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-108.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000b): Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897-904.

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271-4.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619-33.

Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med* 10:481-3.

Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC, Jr. (2006): mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *Embo J* 25:1659-68.

Harris TE, Lawrence JC, Jr. (2003): TOR signaling. *Sci STKE* 2003:re15.

Hay N (2005): The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8:179-83.

Hay N, Sonenberg N (2004): Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-45.

He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999): PPAR $\delta$  is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99:335-45.

Heaney AP (2003): Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator activating receptor-gamma. *Pituitary* 6:153-9.

Hellems K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, De Jong J, Heirman C, Quartier E, Schuit F, Wahli W, Geerts A (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 124:184-201.

Hellen CU, Sarnow P (2001): Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15:1593-612.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005): Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:988-1004.

Hentze MW (1997): eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* 275:500-1.

Herbert TP, Kilhams GR, Batty IH, Proud CG (2000): Distinct signalling pathways mediate insulin and phorbol ester-stimulated eukaryotic initiation factor 4F assembly and protein synthesis in HEK 293 cells. *J Biol Chem* 275:11249-56.

Hershey JWB, Merrick WC (2000): "Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis." New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hinnebusch AG (1984): Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6442-6.

Hinnebusch AG (1993): Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol Microbiol* 10:215-23.

Hinnebusch AG (2000): "Translational control of gene expression." New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Holcik M, Sonenberg N (2005): Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318-27.

Holcik M, Sonenberg N, Korneluk RG (2000): Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* 16:469-73.

Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J (2005): mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123:569-80.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002): TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:648-57.

Issemann I, Green S (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-50.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B (2006): SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127:125-37.

Jacinto E, Hall MN (2003): Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:117-26.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122-8.

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988): A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62:2636-43.

Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G (1994): Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-5.

Johannes G, Carter MS, Eisen MB, Brown PO, Sarnow P (1999): Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13118-23.

Johannes G, Sarnow P (1998): Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *Rna* 4:1500-13.

Jump DB, Clarke SD (1999): Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 19:63-90.

Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y (2004): Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:73-84.

Kaufman RJ (2004): Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 29:152-8.

Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesaniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M (2005): Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 366:1849-61.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W (1993): Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2160-4.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000): Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421-4.

Kim DH, Sabatini DM (2004): Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:259-70.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003): GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11:895-904.

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994): Differential expression and activation of a family of

murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7355-9.

Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56:239-63.

Knight BL, Patel DD, Humphreys SM, Wiggins D, Gibbons GF (2003): Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res* 44:2049-58.

Koeffler HP (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 9:1-9.

Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD (2005): An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51:85-94.

Kozak M (1981): Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 9:5233-52.

Kozak M (1982): How do eukaryotic ribosomes recognize the unique AUG initiator codon in messenger RNA? *Biochem Soc Symp* 47:113-28.

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997): Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11:779-91.

Kuenzli S, Saurat JH (2003): Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol* 149:229-36.

Larsen LK, Amri EZ, Mandrup S, Pacot C, Kristiansen K (2002): Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochem J* 366:767-75.

Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK (2003): Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302:453-7.

Lee Y, Kim HK, Park HE, Park MH, Joe YA (2002): Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 237:69-76.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2006): Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116:571-80.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliwer SA (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-6.



Leibowitz SB, Kantoff PW (2003): Differentiating agents and the treatment of prostate cancer: Vitamin D3 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Semin Oncol* 30:698-708.

Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL (2004): TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29:32-8.

Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC, Jr. (1994): PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266:653-6.

Linton MF, Fazio S (2000): Re-emergence of fibrates in the management of dyslipidemia and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep* 2:29-35.

Liu WS, Heckman CA (1998): The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 10:529-42.

Lock EA, Mitchell AM, Elcombe CR (1989): Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:145-63.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005): Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 15:702-13.

Lovett PS, Rogers EJ (1996): Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol Rev* 60:366-85.

Lu PD, Harding HP, Ron D (2004): Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167:27-33.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005): Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:439-48.

Ma D, Yu H, Lin D, Sun Y, Liu L, Liu Y, Dai B, Chen W, Cao J (2009): S6K1 is involved in polyploidization through its phosphorylation at Thr421/Ser424. *J Cell Physiol* 219:31-44.

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006): mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25:6416-22.

Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N (2004): eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 23:3172-9.

Mano H, Kimura C, Fujisawa Y, Kameda T, Watanabe-Mano M, Kaneko H, Kaneda T, Hakeda Y, Kumegawa M (2000): Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in mature osteoclasts. *J Biol Chem* 275:8126-32.

Marr MT, 2nd, D'Alessio JA, Puig O, Tjian R (2007): IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback. *Genes Dev* 21:175-83.

Martinez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, Lopez de Quinto S (2001): Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* 82:973-84.

Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J (1998a): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:1097-103.

Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J (1998b): Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 153:17-23.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (2000): "Control of Gene Expression." New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Merrick WC (2004): Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* 332:1-11.

Michalik L, Wahli W (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10:564-70.

Mueller PP, Hinnebusch AG (1986): Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45:201-7.

Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. (1997): Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 272:8071-6.

Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE (2002): Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 277:26089-97.

Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliwer SA, Hansen BC, Willson TM (2001): A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5306-11.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., Sonenberg N (1994a): Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-7.

Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N (1994b): Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *Embo J* 13:1205-15.

Pelletier J, Sonenberg N (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-5.

Peng T, Golub TR, Sabatini DM (2002): The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* 22:5575-84.

Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1996): Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16:6859-69.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ (2000): Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol* 20:5119-28.

Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N (2006): mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer* 94:195-9.

Plutzky J (2003): The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 92:34J-41J.

Plutzky J (2004): Inflammation in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 5:255-9.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T (2002): Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4:658-65.

Proud CG, Denton RM (1997): Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J* 328 ( Pt 2):329-41.

Raught B, Gingras AC, Sonenberg N (2000): "Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes." 2000: Spring Harbor Laboratory Press.

Richter JD, Sonenberg N (2005): Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433:477-80.

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK (1998): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7614-9.

Ron D (2002): Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110:1383-8.

Ruggero D, Pandolfi PP (2003): Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3:179-92.

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH (1994): RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35-43.

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT (1995): Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 270:815-22.

Saluja I, Granneman JG, Skoff RP (2001): PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 33:191-204.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296-302.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-101.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996a): The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302:93-109.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996b): Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37:907-25.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N (2006): The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo J* 25:2781-91.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA (1996): The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137:4499-502.

Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ (1993): cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32:5598-604.

Stephens L, Williams R, Hawkins P (2005): Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 5:357-65.

Stoneley M, Willis AE (2004): Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23:3200-7.

Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2005): Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 25:10556-65.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J (2003): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15924-9.

Tee AR, Blenis J (2005): mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* 16:29-37.

Traore K, Trush MA, George M, Jr., Spannhake EW, Anderson W, Asseffa A (2005): Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res* 29:863-79.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K (1982): Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42:1530-6.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171-6.

Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Hiraoka N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M (2003): Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha pathway. *Exp Cell Res* 289:143-51.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S (1992): The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J* 11:433-9.

Vattem KM, Wek RC (2004): Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11269-74.

Vosper H, Khoudoli GA, Palmer CN (2003): The peroxisome proliferator activated receptor delta is required for the differentiation of THP-1 monocytic cells by phorbol ester. *Nucl Recept* 1:9.

Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN (2001): The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 276:44258-65.

Wang X, Proud CG (2006): The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 21:362-9.

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003): Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-70.

Warnakulasuriyarachchi D, Cerquozzi S, Cheung HH, Holcik M (2004): Translational induction of the inhibitor of apoptosis protein HIAP2 during endoplasmic reticulum stress attenuates cell death and is mediated via an inducible internal ribosome entry site element. *J Biol Chem* 279:17148-57.

Watatani Y, Ichikawa K, Nakanishi N, Fujimoto M, Takeda H, Kimura N, Hirose H, Takahashi S, Takahashi Y (2008): Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 283:2543-53.

Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG (1998): Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett* 421:125-30.

Welsh GI, Proud CG (1993): Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 294 ( Pt 3):625-9.

Williams DD, Pavitt GD, Proud CG (2001): Characterization of the initiation factor eIF2B and its regulation in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 276:3733-42.

Withers DJ, Ouwens DM, Nave BT, van der Zon GC, Alarcon CM, Cardenas ME, Heitman J, Maassen JA, Shepherd PR (1997): Expression, enzyme activity, and subcellular localization of mammalian target of rapamycin in insulin-responsive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241:704-9.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006): TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-84.

Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M (2003): The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113:519-31.

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA (1995): Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270:23975-83.

Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE (1996): Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271:31771-4.

Zhou Y, Chase BI, Whitmore M, Williams BR, Zhou A (2005): Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is downregulated by phorbol ester. *Febs J* 272:1568-76.