

Indice

Introduzione	1
1 IRS1 e le sue fosforilazioni	9
1.1 La biochimica	9
1.2 Il modello	14
2 Complesso IRS1-PI3K	19
2.1 La biochimica	19
1.2 Il modello	14
3 Fosforilazioni a PIP₃	27
3.1 La biochimica	27
3.2 Il modello	29

4	Da PIP₃ alla fosforilazione di Akt	35
4.1	La biochimica	35
4.2	Il modello	37
5	Feedback e cammino di sintesi proteica	43
5.1	La biochimica	43
5.2	Il modello	46
6	Modello, variabili di stato ed equazioni	53
7	Conclusioni	63
	Bibliografia	67

Introduzione

L'insulina è una molecola che svolge importanti azioni di controllo nel metabolismo del glucosio. Malfunzionamenti di tale sistema di controllo sono legati allo sviluppo della patologia diabetica. Il diabete infatti è una delle patologie con maggiore incidenza nel mondo moderno, a causa da una parte della crescente diffusione di abitudini poco sane che inducono a numerosi effetti negativi sulla salute, e dall'altra dell'aumento della longevità della popolazione: la crescente diffusione di tale patologia sta rendendo il diabete un vero e proprio problema sociale.

Alla luce dell'emergenza appena descritta, sono sempre più necessari studi che approfondiscano le conoscenze in materia, in maniera da ricercare nuovi metodi più efficaci nella cura della patologia.

Per ottenere maggiori successi, tuttavia, è necessario conoscere più a fondo i meccanismi molecolari implicati nella secrezione ed azione dell'insulina, processi che coinvolgono una fitta rete di reazioni. Tali reazioni tuttavia non riguardano solo il metabolismo del glucosio, ma influenzano anche aspetti importanti della vita cellulare, come la sintesi proteica e la proliferazione e differenziazione cellulare.

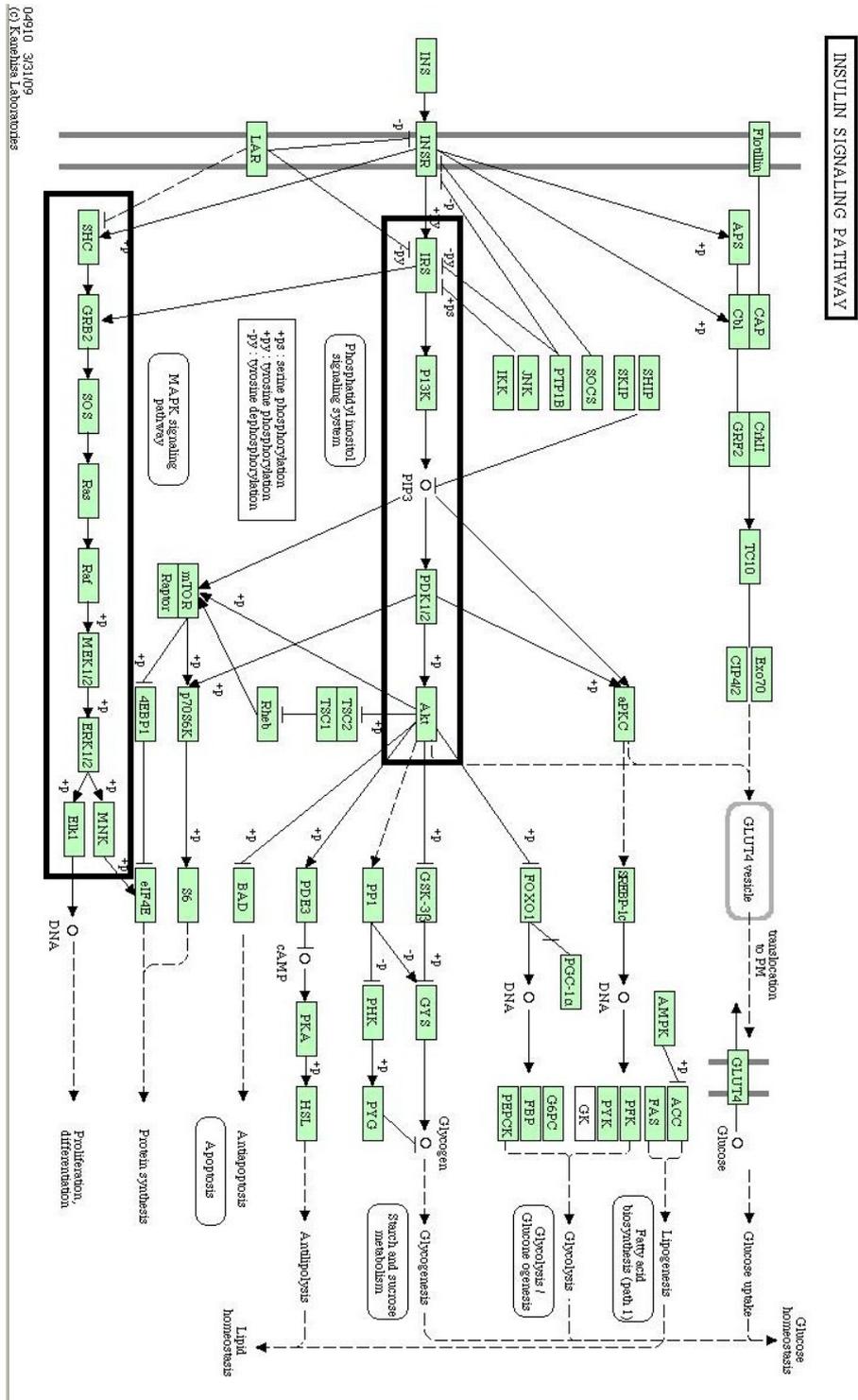


Figura 1: pathway completo del signaling dell'insulina

Come si vede nell'immagine appena riportata, che ripropone la rete generica del signaling dell'insulina, la molecola presiede al controllo di moltissimi eventi e provoca una cascata di reazioni notevole: la natura di queste tuttavia è perlopiù ancora oggetto di notevoli controversie.

Dal punto di vista modellistico, questo intricato sistema è stato studiato solo parzialmente (in questo contesto si ricorda principalmente il lavoro di Sedaghat, Sherman e Quon), mentre uno studio quantitativo più attento risulterebbe di grande interesse: alcuni processi infatti, evidenziati nel sistema appena visto e riproposti in figura nella pagina seguente, sembrano essere legati da particolari interazioni.

L'obiettivo di questa tesi è mettere a punto un modello complessivo di uno dei pathway evidenziati che integri le conoscenze biochimiche allo stato dell'arte, in vista del progetto di un esperimento che fornisca una base di dati adeguata per un'analisi quantitativa del sistema.

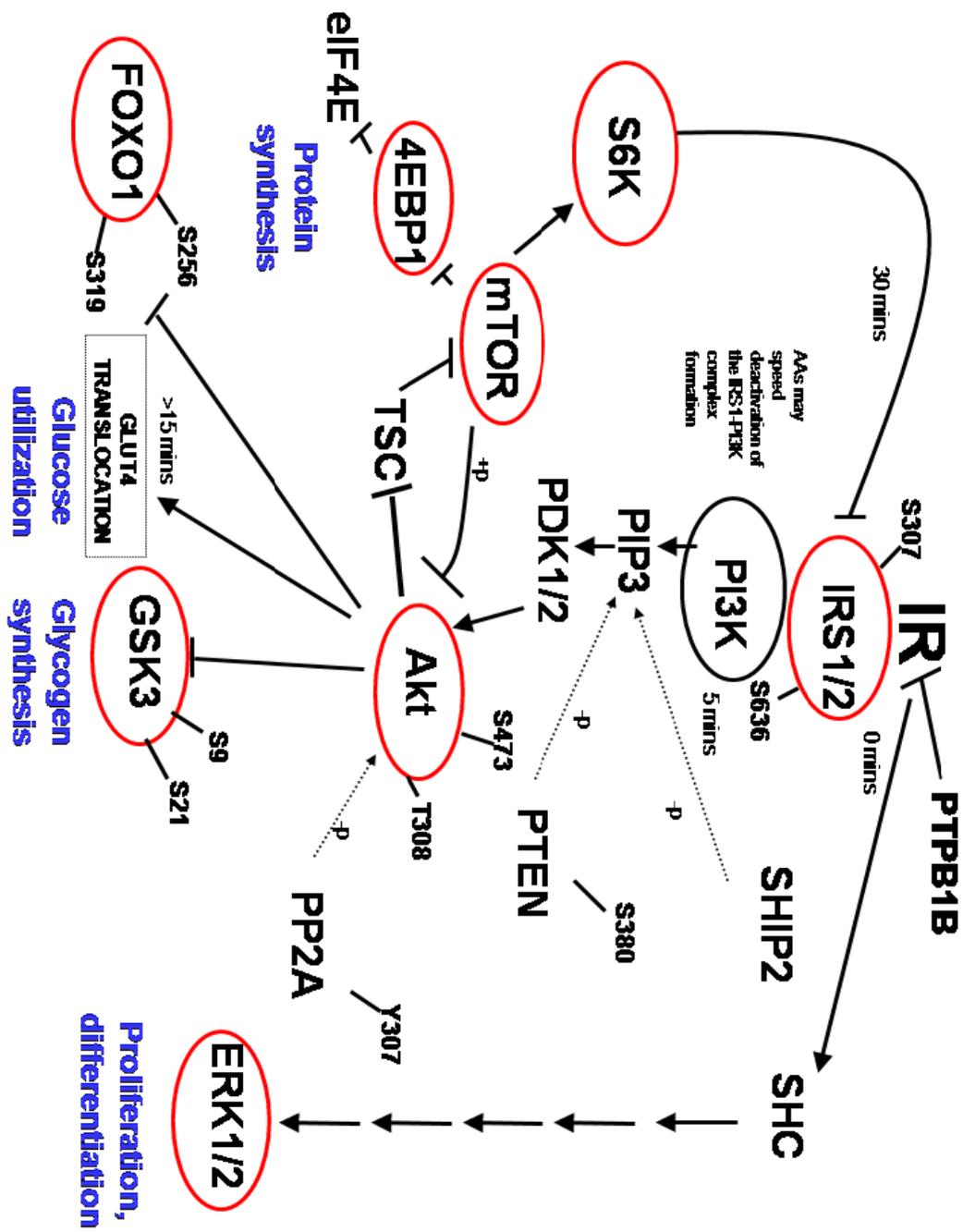


Figura 2: parte evidenziata della rete di reazioni di interesse

In questo lavoro in particolar modo verrà preso in considerazione il pathway implicato nell'utilizzo del glucosio, focalizzando l'attenzione anche sulle molteplici funzioni di alcune molecole, responsabili dell'interazione tra il pathway in esame e la rete di reazioni che conduce alla sintesi proteica.

Dopo una breve descrizione riguardante l'aspetto prettamente biochimico degli eventi, la rete verrà formalizzata attraverso un modello compartimentale completato dalle relative equazioni di bilancio di massa delle molecole: sarà così proposta una descrizione della cascata a partire da IRS1 fino ad arrivare ad Akt.

Per semplicità di esposizione, si riportano nelle figure 3 e 4 il modello complessivo: data l'evidente complessità del risultato, nell'esposizione di come si è giunti a tale modello, questo verrà suddiviso in sottosistemi più semplici, in maniera tale da apprezzarne più a fondo i processi alla base e le scelte modellistiche effettuate. Alcuni riferimenti risulteranno tuttavia pienamente comprensibili solo alla luce di una visione più ampia del lavoro svolto.

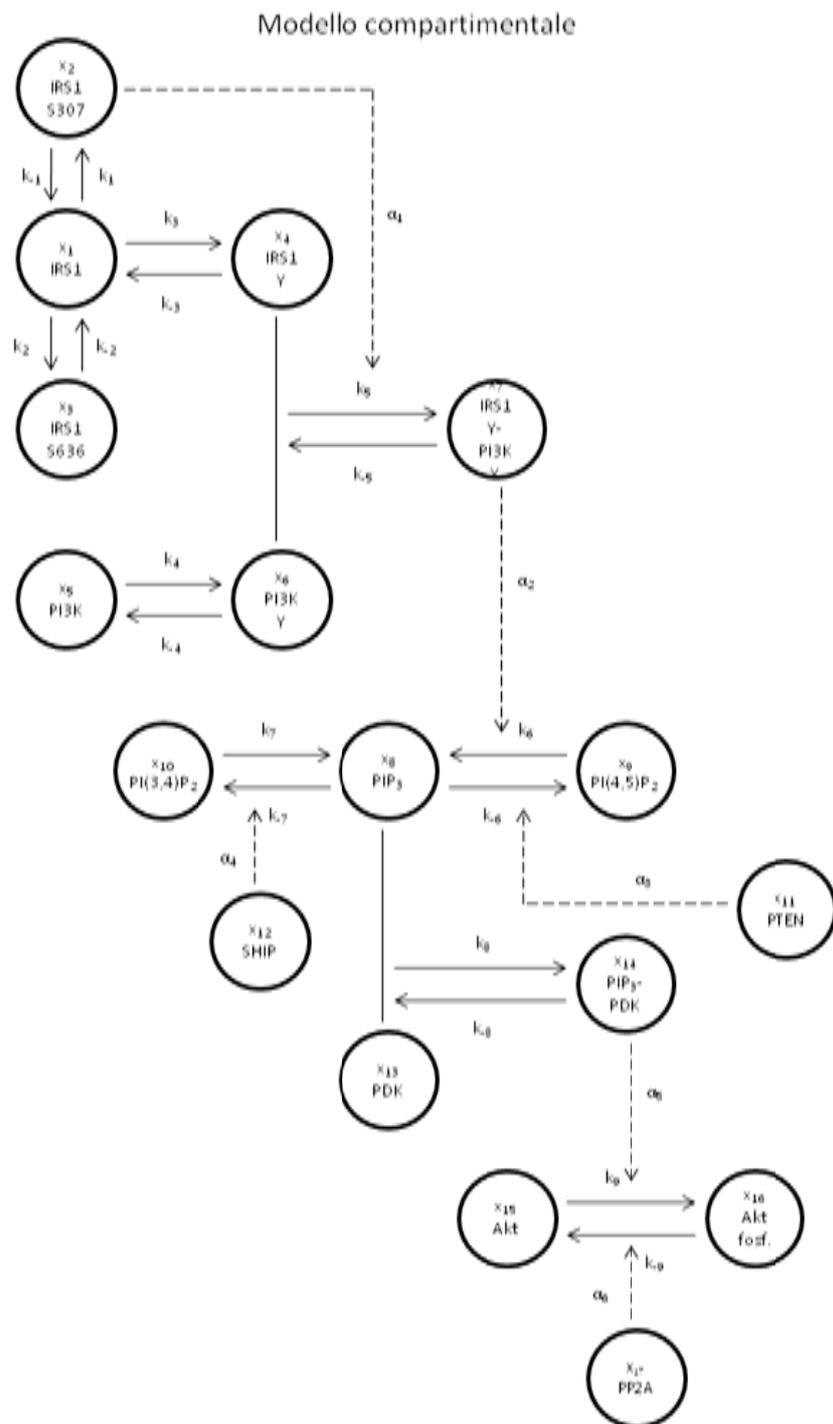


Figura 3: prima parte del modello, da IRS1 a Akt

Modello compartimentale

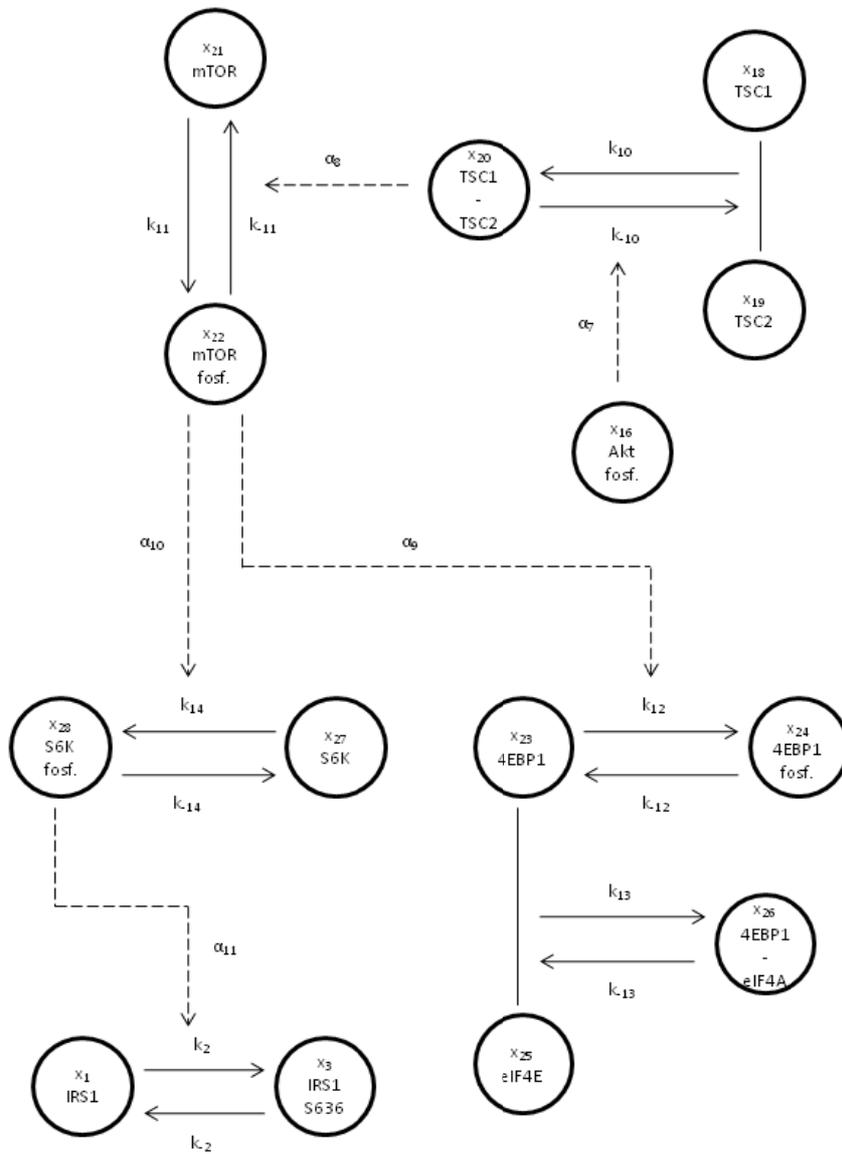


Figura 4: seconda parte del modello, feedback e sintesi proteica

Capitolo 1

IRS1 e le sue fosforilazioni

1.1 La biochimica

Sebbene il modello elaborato parta da IRS1, è opportuno almeno accennare in maniera discorsiva a quanto accade a partire dalla molecola d'insulina, in modo da completare dal punto di vista logico il pathway.

Il recettore dell'insulina (IR) appartiene alla famiglia dei recettori di membrana, componendosi dal punto di vista strutturale di una parte extracellulare (le due sub-unità α) e di una regione intracellulare (due sub-unità β), collegate da un dominio transmembrana: nello stato basale il recettore si trova nella sua forma inattiva, ma quando una molecola di insulina si lega a regioni specifiche delle sub-unità α avviene un rapido cambiamento nella conformazione tridimensionale del recettore, tale da attivarlo e da indurlo l'autofosforilazione. Una volta attivato il recettore dell'insulina è in grado di fosforilare, cioè di aggiungere un gruppo fosfato (PO_4), diverse proteine: funziona cioè come catalizzatore, e in particolar modo da chinasi.

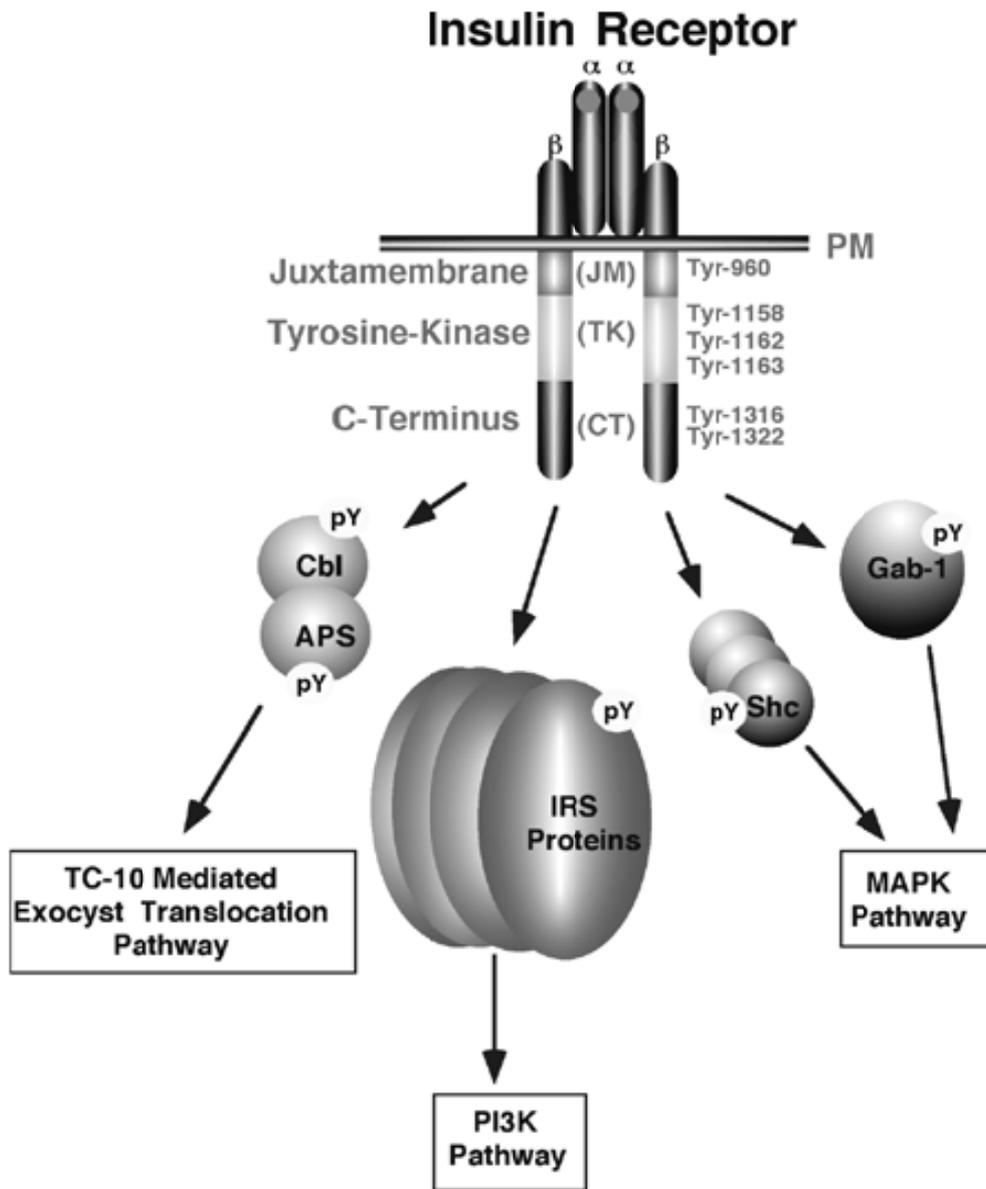


Figura 1.1.1: fosforilazioni indotte da IR attivato

L'immagine sottolinea bene come a seconda delle molecole che vengono fosforilate in questo istante prendano il via diversi cammini: il pathway modellizzato in questo lavoro, denominato PI3K/Akt, è quello che coinvolge IRS1.

IRS1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) è appunto la proteina chiave nell'attivazione della cascata di reazioni che determina la trasmissione del segnale insulinico finalizzata al metabolismo del glucosio.

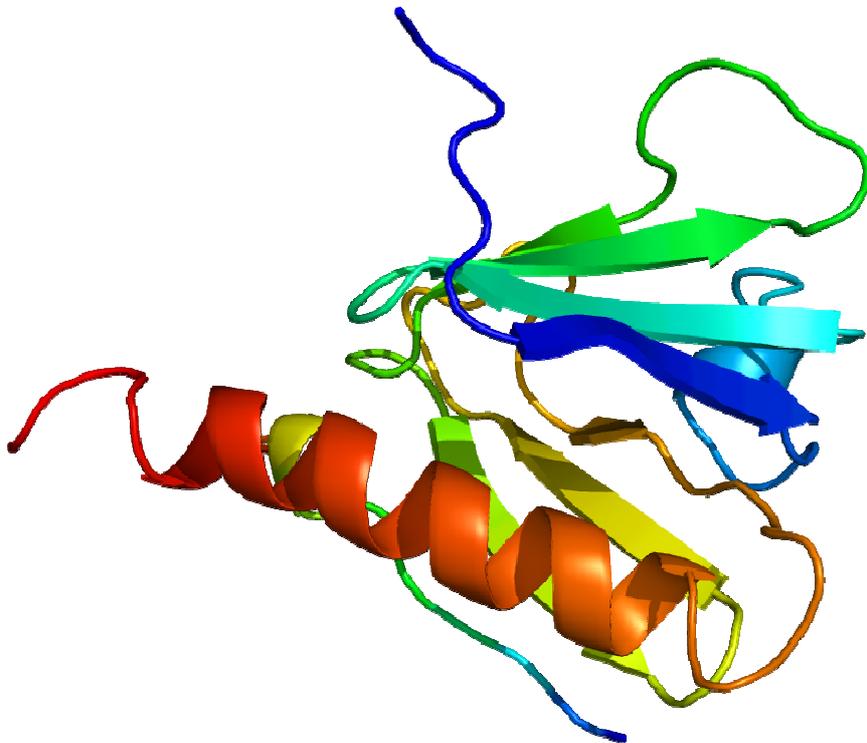


Figura 1.1.2: struttura 3D di IRS1 depositata alla Protein Data Bank

Nel pathway può essere soggetta a molteplici fosforilazioni, le quali, a seconda dei diversi residui amminoacidi su cui avvengono, producono effetti diversi: la fosforilazione necessaria alla propagazione della cascata di reazioni, catalizzata dalla forma attivata del recettore dell'insulina, è quella in tirosina.

Il riconoscimento e la localizzazione delle molecole di substrato più vicine al recettore attivato, e pertanto più facili da fosforilare, avvengono grazie alla presenza nella molecola stessa di una particolare sequenza (dominio) di circa 120 amminoacidi, denominata per la sua peculiarità dominio PH (*Pleckstrin Homology domain*). Una volta avvenuta la reazione, la nuova forma fosforilata in tirosina di IRS1 si complessa al recettore che ha agito come chinasi nella reazione appena descritta.

Tuttavia, come già annunciato, IRS1 non è soggetta unicamente alla fosforilazione in tirosina, sebbene sia questa la sua forma fosforilata di maggior rilievo, in quanto reagente che permette di sostenere la cascata. IRS1, come altre proteine IRS, contiene più di settanta potenziali siti di fosforilazione in serina, e se da una parte la fosforilazione in tirosina è richiesta per la risposta stimolata dal segnale insulinico, la fosforilazione in serina viene coinvolta nei meccanismi di controllo, in cui riveste un ruolo duplice di primaria importanza.

L'insulina infatti attiva diverse chinasi per indurre la fosforilazione di IRS1 in siti specifici della serina: tuttavia, a parità di tipo di residuo amminoacido, pare che siti diversi non determinino gli stessi effetti e funzioni, ma anzi sembrano addirittura condurre a risultati opposti.

Da una parte, la fosforilazione di alcuni siti inibisce la funzione della molecola, sottraendola alla reazione successiva della cascata: venendo quindi a mancare molecole utili ad incrementare o a mantenere il proseguimento del pathway, si stabilisce un meccanismo di controllo a feedback negativo stimolato dall'insulina stessa che induce a terminare la sua azione. I reali meccanismi per mezzo dei quali la fosforilazione in questi siti è in grado di provocare questa

risposta non sono ancora ben noti, ma è stata avanzata l'ipotesi che queste reazioni determinino una modifica nella conformazione tridimensionale di IRS1 tale da ridurre l'affinità per IR.

Dall'altra parte, invece, fosforilazioni in siti localizzati in determinate posizioni sembrano avere l'effetto opposto, venendo quindi ad aumentare l'effetto dell'insulina e il flusso di molecole attraverso il pathway: anche qui i dettagli di come ciò avvenga sono perlopiù poco noti se non addirittura sconosciuti, ma analogamente a prima alcune fonti hanno proposto che la diversità dell'effetto risieda nella disposizione di questi siti di fosforilazione, i quali, in virtù della loro vicinanza ai maggiori siti di legame coinvolti nella reazione successiva del pathway, sembrerebbero in grado di favorirla se fosforilati, agendo in particolare modo nel modulare l'interazione tra i reagenti coinvolti.

1.2 Il modello

Data l'evidente numerosità di siti di fosforilazione coinvolti, è stato necessario scegliere i più significativi, principalmente per soddisfare l'esigenza di distinguere e riassumere i diversi comportamenti della serina: la scelta per i compartimenti è ricaduta sul sito S307 per rappresentare le fosforilazioni responsabili del controllo positivo del pathway, mentre il sito S636 è stato scelto per rappresentare il meccanismo di inibizione. IRS1 fosforilato in tirosina invece è stato semplicemente rappresentato per mezzo di un unico compartimento

Per quanto riguarda le reazioni, le fosforilazioni sono state modellizzate per mezzo di semplici coefficienti frazionari di trasferimento costanti, fatta eccezione per la fosforilazione da IRS1 a IRS S636 che presenta una legge lineare dipendente da un compartimento che verrà esposto nella seconda parte del modello: tale scelta modellistica troverà spiegazione verso l'ultima parte del lavoro, riguardante il sottomodello di feedback.

Si sottolinea che l'azione di controllo di IRS1 S307 verrà rappresentata nel sottomodello successivo.

Di seguito si riportano lo schema del modello e le equazioni differenziali dei bilanci di massa delle molecole, completato dall'elenco delle variabili citate e delle reazioni.

Modello compartimentale

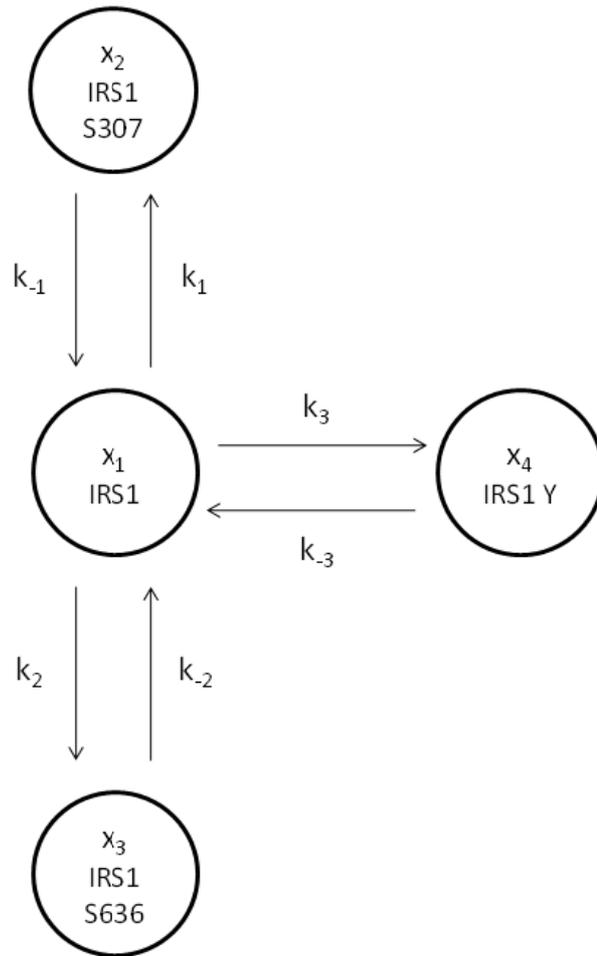


Figura 1.2.1: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_1 : IRS1
- x_2 : IRS1 fosforilato in serina 307
- x_3 : IRS1 fosforilato in serina 636
- x_4 : IRS1 fosforilato in tirosina
- x_{28} : S6K fosforilato

Reazioni

- k_1 : fosforilazione in serina 307
- k_2 : fosforilazione in serina 636
- k_3 : fosforilazione in tirosina
- k_j : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_1 = -(k_1 + k_2(x_{28}) + k_3)x_1 + k_{-1}x_2 + k_{-2}x_3 + k_{-3}x_4$$

$$\dot{x}_2 = k_1x_1 - k_{-1}x_2$$

$$\dot{x}_3 = k_2(x_{28})x_1 - k_{-2}x_3$$

$$\dot{x}_4 = -k_{-3}x_4 - k_5(x_2)x_4x_6 + k_3x_1 + k_{-5}x_7$$

$$k_2(x_{28}) = k_2 + \alpha_{11}x_{28}$$

$$k_5(x_2) = k_5 + \alpha_1x_2$$

Come si può notare, nelle equazioni compaiono termini non ancora elencati in questo capitolo: essi sono dovuti alle reazioni successive della cascata, e pertanto troveranno spiegazione nelle pagine seguenti.

Capitolo 2

Complesso IRS1-PI3K

2.1 La biochimica

Il pathway procede con IRS1 fosforilato in tirosina: questa particolare fosforilazione infatti attribuisce a IRS1 nuove proprietà, inducendolo a funzionare come scaffold per determinati segnali molecolari.

In altre parole, a valle della reazione la cascata prosegue grazie alla comparsa di siti di legame per proteine dotate di domini SH2 (*Src homology 2*), una sequenza peptidica comune a molte proteine coinvolte in meccanismi di trasduzione di segnali intracellulari.

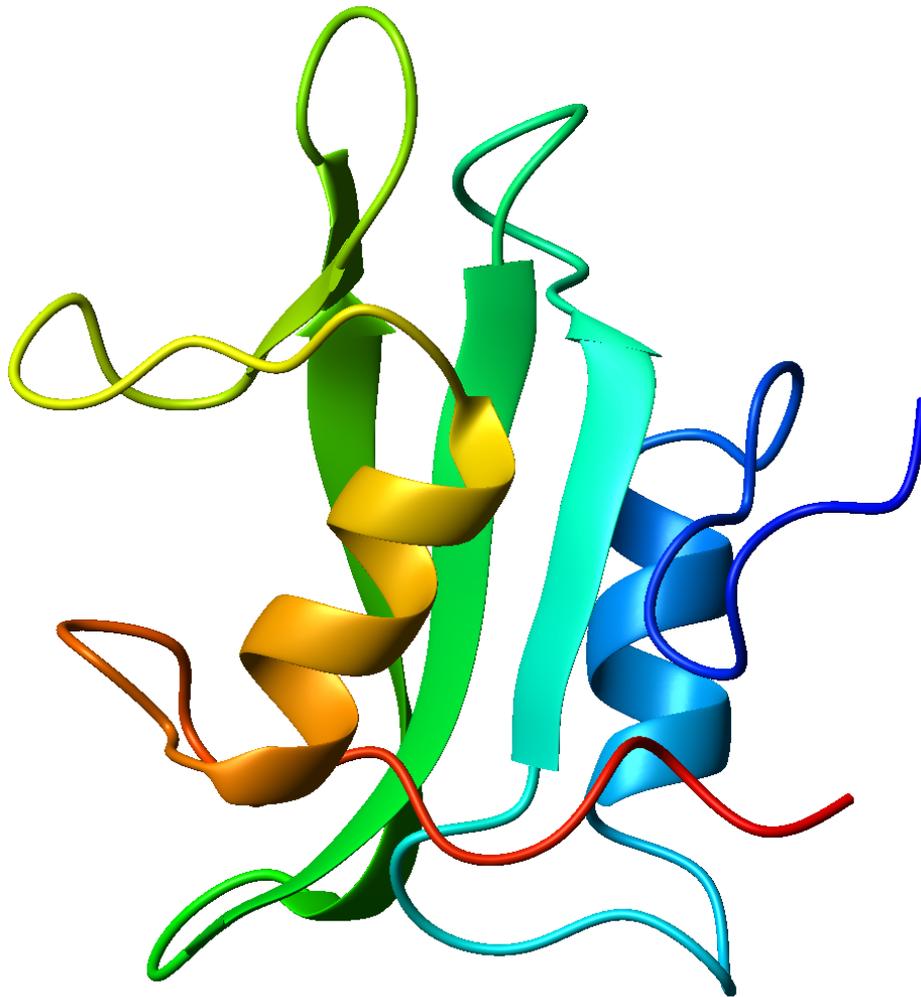


Figura 2.1.3: struttura del dominio SH2, composto da un foglietto beta (verde) affiancato da due alfa-eliche (arancione e blu)

La sequenza è utile a discriminare tra la moltitudine di segnali molecolari presenti all'interno della cellula, selezionando la molecola con cui interagire riconoscendone la fosforilazione dei residui di tirosina, ai quali si lega.

È questa la reazione che permette l'ulteriore propagazione della cascata: il legame tra le versioni fosforilate di IRS1 e PI3K genera infatti un complesso in grado di catalizzare la reazione successiva del pathway.

PI3K (*phosphatidylinositol 3-chinasi*) è un dimero, ossia una proteina composta da due catene polipeptidiche differenti, che in questo caso consistono in due sub-unità, una catalitica e l'altra regolatoria.

Quest'ultima regione, che possiede due domini SH2, mantiene la prima in uno stato basale di bassa attivazione in assenza di stimolo, tuttavia l'interazione diretta con i siti fosforilati in tirosina di IRS1 è in grado di sopprimere l'azione inibitoria appena descritta, lasciando la sub-unità catalitica libera di svolgere la funzione di chinasi nella reazione di fosforilazione successiva del cammino.

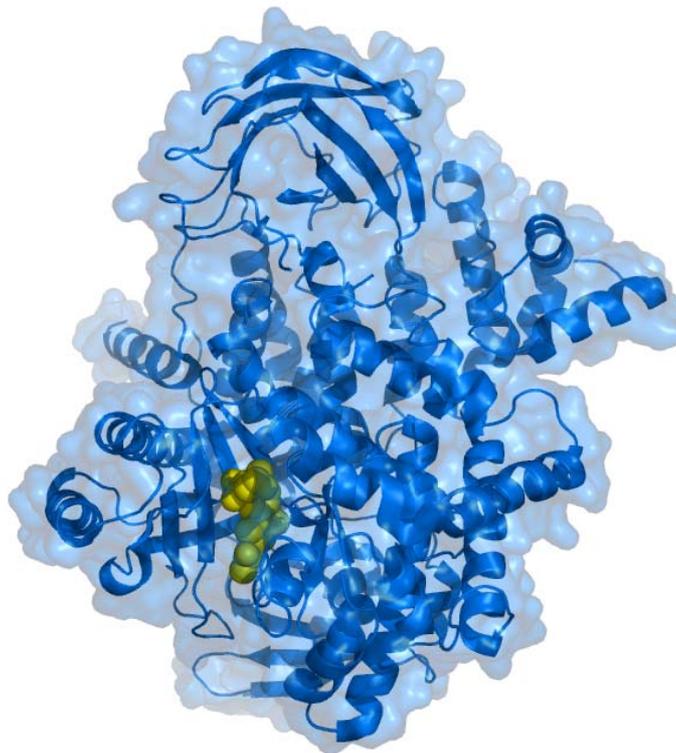


Figura 2.1.4: struttura tridimensionale di PI3K

Il pathway a monte non ha solo la funzione di sintesi dei reagenti utili a sostenere la cascata, ma esercita, come spiegato nel capitolo precedente, anche un duplice controllo: da una parte questo si esplica tramite un'azione diretta delle fosforilazioni in serina 307 di IRS1, le quali, modulando favorevolmente l'interazione tra la versione di IRS1 fosforilata in tirosina e i domini SH2 di PI3K, agiscono come controllo positivo.

Il controllo negativo esercitato da IRS1 S636 invece non compare esplicitamente, ma esplica la sua funzione sottraendo reagenti disponibili.

2.2 Il modello

Rispetto al capitolo precedente non si presenta più la problematica di dover distinguere tra siti di fosforilazione diversi e possiamo tranquillamente raggruppare le versioni fosforilate e non fosforilate in due compartimenti separati per molecola.

Analogamente a quanto fatto in precedenza, per queste fosforilazioni è stato proposto un modello costante per i relativi coefficienti frazionari di trasferimento, in quanto non presentano caratteristiche sostanzialmente diverse dalle reazioni analizzate nel capitolo precedente.

Il punto più critico della modellizzazione è invece rappresentato dalla reazione di complessazione, resa ulteriormente ostica dall'azione del controllo esercitata da IRS1 S307 sulla reazione diretta: supponendo che le molecole coinvolte non siano presenti in concentrazioni tali da vincolare la formazione del complesso, si suppone che la loro probabilità di complessazione sia direttamente proporzionale al prodotto tra le concentrazioni dei due reagenti, il che si traduce modellisticamente nell'aggiunta di un termine dato dal prodotto tra le variabili interessate per un coefficiente.

Modello compartimentale

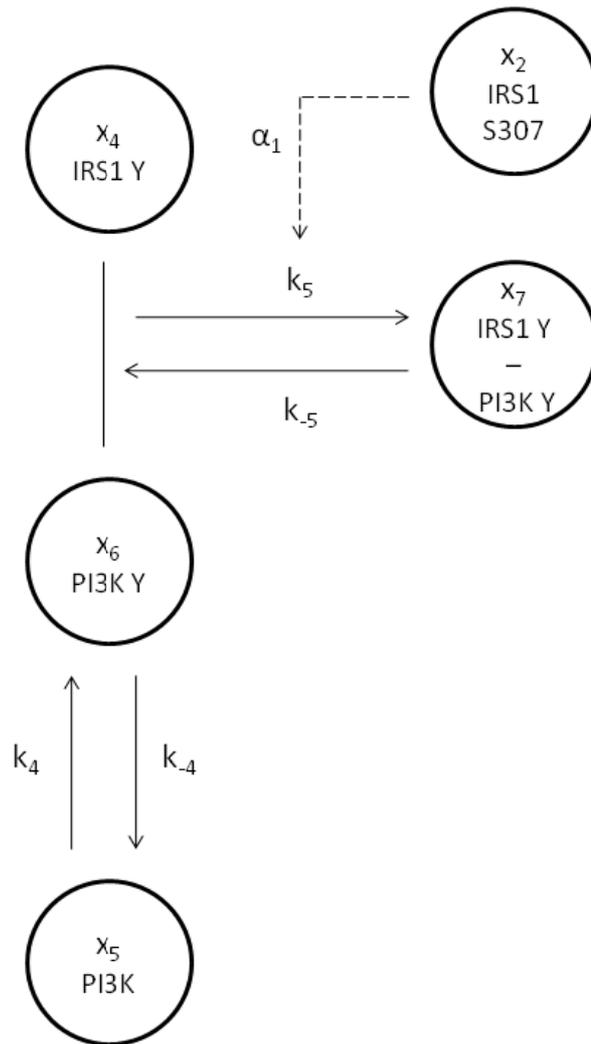


Figura 2.2.1: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_2 : IRS1 fosforilato in serina 307
- x_4 : IRS1 fosforilato in tirosina
- x_5 : PI3K
- x_6 : PI3K fosforilato in tirosina
- x_7 : complesso IRS1 fosforilato in tirosina- PI3K
fosforilato in tirosina

Reazioni

- k_4 : fosforilazione in tirosina
- k_5 : complessazione
- k_{-j} : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_4 = -k_{-3}x_4 - k_5(x_2)x_4x_6 + k_3x_1 + k_{-5}x_7$$

$$\dot{x}_5 = k_{-4}x_6 - k_4x_5$$

$$\dot{x}_6 = -k_{-4}x_6 - k_5(x_2)x_4x_6 + k_4x_5 + k_{-5}x_7$$

$$\dot{x}_7 = k_5(x_2)x_4x_6 - k_{-5}x_7$$

$$k_5(x_2) = k_5 + \alpha_1x_2$$

Ora ogni termine ha il suo significato, e anche le parti del modello del capitolo precedente, allora rimaste senza risposta, a questo punto trovano motivazione.

Nell'analisi introduttiva del modello è stata volontariamente tralasciata la descrizione della modellizzazione del controllo, per poterla meglio apprezzare dopo averne osservato l'espressione matematica: essendo ancora poco chiaro come agisca questo controllo, è stato intanto proposto un semplice modello lineare: nel caso evidenze sperimentali denotino un'inadeguatezza di questa modellizzazione, ne verrà elaborata un'altra, più aderente all'andamento reale del meccanismo di controllo.

All'interno delle equazioni il controllo viene inserito semplicemente come termine moltiplicativo non costante, andando a modulare in questo caso il prodotto tra IRS1 Y e PI3K Y.

Capitolo 3

Fosforilazioni a PIP₃

3.1 La biochimica

Riepilogando i risultati del capitolo precedente, la cascata a questo punto ha prodotto il complesso formato da IRS1 e PI3K fosforilati in tirosina. Questo legame induce ad annullare l'inibizione esercitata dalla sub-unità regolatoria di PI3K sulla sua sub-unità catalitica: PI3K grazie al complesso viene attivato e può esercitare la sua funzione di chinasi, e la cascata ora si è dotata di una molecola in grado di catalizzare la reazione successiva e sostenere il cammino.

La reazione che viene catalizzata è la fosforilazione che converte PI(4,5)P₂ (*Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*) in PIP₃ (*Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate*).

PI(4,5)P₂ è un fosfolipide minore che compone la membrana cellulare, dove funge da substrato per numerose proteine coinvolte in processi di signaling.

La chinasi del complesso PI3K-IRS aggiunge un gruppo fosfato a PI(4,5)P₂, convertendolo in PIP₃, molecola che poi effettivamente avrà un ruolo importante nella propagazione dell'ultima parte della cascata.

Se però l'insulina favorisce questo cammino, la variazione nella concentrazione di PIP_3 non è influenzata unicamente da questa reazione, in quanto un ulteriore contributo viene dato dalla fosforilazione di $PI(3,4)P_2$ (*Phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate*), altro fosfolipide minore componente della membrana cellulare: le due reazioni sono analoghe, differiscono solo per la posizione in cui il gruppo fosfato viene aggiunto, tuttavia mentre la prima, come già detto, viene esplicitamente favorita nel pathway grazie alla presenza della chinasi specifica, quest'ultima sembra non venire catalizzata da alcuna molecola coinvolta nella rete di reazioni in analisi.

Per quanto riguarda le reazioni inverse, invece, entrambe le defosforilazioni vengono catalizzate da molecole specifiche: PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) per defosforilare PIP_3 a $PI(4,5)P_2$, mentre SHIP converte PIP_3 a $PI(3,4)P_2$: entrambe le molecole pertanto agiscono come una regolazione negativa del signaling, in quanto la loro presenza abbassa i livelli di PIP_3 , e sottraendo substrato alla reazione successiva del pathway ostacolano la propagazione della cascata.

3.2 Il modello

Le scelte modellistiche operate sono coerenti con quanto fatto nei sottomodelli precedenti: al complesso IRS1-PI3K fosforilati, a $PI(3,4)P_2$, $PI(4,5)P_2$, PIP_3 , SHIP e PTEN sono stati assegnati compartimenti separati.

Per l'unica fosforilazione non catalizzata da molecole presenti nel pathway è stato proposto un modello costante, mentre in presenza di reazioni catalizzate i relativi coefficienti frazionari di trasferimento sono stati modellizzati con una dipendenza lineare dal compartimento di controllo.

In questa parte del modello non sono state riscontrate particolari difficoltà, in quanto le reazioni presenti non presentano novità rispetto ai sottomodelli trattati in precedenza.

La non linearità del modello è in questo caso dovuta unicamente alla presenza di controlli, e non a reazioni di complessazione.

Modello compartimentale

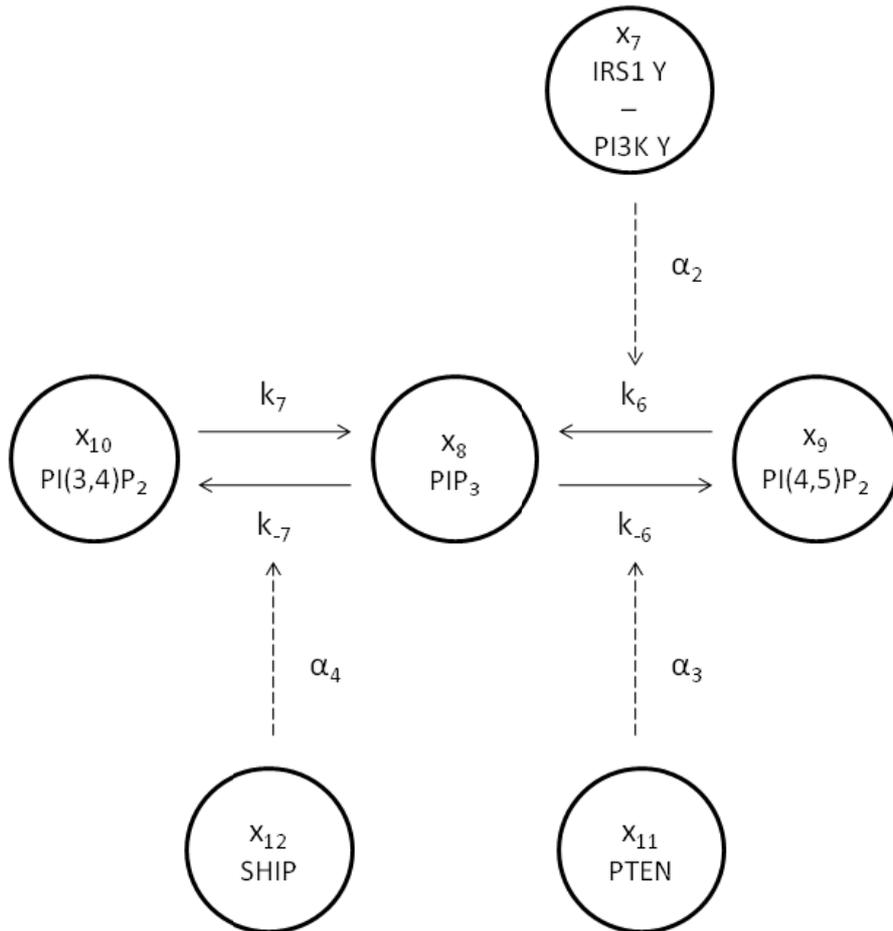


Figura 3.2.1: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_7 : complesso IRS1 fosforilato in tirosina-PI3K fosforilato in tirosina
- x_8 : PIP_3
- x_9 : $PI(4,5)P_2$
- x_{10} : $PI(3,4)P_2$
- x_{11} : PTEN
- x_{12} : SHIP

Reazioni

- k_6 : fosforilazione
- k_7 : fosforilazione
- k_j : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_7 = k_5(x_2)x_4x_6 - k_{-5}x_7$$

$$\begin{aligned}\dot{x}_8 = & k_6(x_7)x_9 + k_7x_{10} - (k_{-6}(x_{11}) + k_{-7}(x_{12}))x_8 \\ & - k_8x_8x_{13} + k_{-8}x_{14}\end{aligned}$$

$$\dot{x}_9 = k_{-6}(x_{11})x_8 - k_6(x_7)x_9$$

$$\dot{x}_{10} = k_{-7}(x_{12})x_8 - k_7x_{10}$$

$$k_5(x_2) = k_5 + \alpha_1x_2$$

$$k_6(x_7) = k_6 + \alpha_2x_7$$

$$k_{-6}(x_{11}) = k_{-6} + \alpha_3x_{11}$$

$$k_{-7}(x_{12}) = k_{-7} + \alpha_4x_{12}$$

La presenza di termini nonlineari non riscontrati finora e non riconducibili ad azioni di controllo fa intuire che nelle reazioni successive si avrà a che fare con complessazioni, o comunque non con semplici fosforilazioni.

Si nota che per le variabili x_{11} e x_{12} del modello (PTEN e SHIP) non sono state fornite le equazioni differenziali relative ai bilanci di massa: queste variabili infatti vengono trattate come ingressi forzanti del modello, e pertanto il loro andamento temporale non può essere predetto dalle equazioni, come può avvenire per altre molecole del pathway, ma deve essere fornito esplicitamente.

Capitolo 4

Da PIP_3 alla fosforilazione di Akt

4.1 La biochimica

Il pathway diretto che presiede al metabolismo del glucosio in questo capitolo giunge al termine.

È stato mostrato come la cascata abbia prodotto l'ennesimo substrato, PIP_3 , dalla fosforilazione di $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ e $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, sebbene solo quest'ultima sia esplicitamente favorita dal pathway a monte: PIP_3 a questo punto interagisce con PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*) mediante complessazione.

Il meccanismo che permette tale reazione è il legame del dominio PH di PDK ai siti fosforilati di PIP_3 : questo induce, oltre ad una migrazione verso la membrana citoplasmatica, una modifica nella conformazione morfologica della prima molecola, accoppiata all'acquisizione di nuove funzionalità. All'interno del complesso pertanto PDK viene attivato, e può svolgere la sua attività come chinasi, catalizzando la fosforilazione della reazione successiva.

L'ultima reazione porta alla sintesi dell'ultimo segnale molecolare del pathway, cioè Akt fosforilato.

Akt (noto anche come PKB, *Protein Kinase B*) è, nella sua forma attiva, una chinasi: catalizza un gran numero di fosforilazioni, ed è coinvolta nella mediazione di numerosi aspetti del signaling insulinico, non soltanto limitandosi alla regolazione del metabolismo del glucosio, attraverso il controllo del trasporto e della sintesi di questa molecola, ma anche influenzando la sintesi proteica e la crescita cellulare.

La fosforilazione che permette di attivare Akt e di renderlo un punto di snodo cruciale per la differenziazione delle diverse funzioni dell'insulina come molecola di signaling è favorita da tutta la cascata di reazioni spiegata finora.

Se però da una parte la reazione di fosforilazione è catalizzata dal complesso PIP₃-PDK, che agisce come un controllo positivo della rete, favorendo la propagazione del segnale, dall'altra esiste una molecola, PP2A, che catalizza la reazione contraria.

PP2A (*Protein Phosphatase 2 A*) è una proteina strutturalmente composta da due differenti catene polipeptidiche, che funzionalmente agisce come fosfatasi in diverse reazioni, tra le quali figura anche la defosforilazione di Akt.

In altre parole, sebbene con l'ausilio di una sola molecola, in questo punto cruciale la rete è in grado di esercitare un controllo più fine grazie all'esistenza di un'azione catalitica anche sulla reazione inversa, che può controbilanciare e in questa maniera modulare il controllo positivo.

4.2 Il modello

In questo gruppo di reazioni non sembrano essere disponibili conoscenze più approfondite sul tipo di fosforilazione in atto, pertanto accanto ai compartimenti destinati singolarmente a PIP_3 , PDK, al loro complesso PIP_3 -PDK e a PP2A, le reazioni riguardanti Akt sono state rese semplicemente utilizzando due compartimenti separati, uno per la forma inattiva di Akt e l'altro per la sua forma attiva, indicata con una generica versione fosforilata.

Sia fosforilazione che reazione inversa in questo caso compaiono catalizzate da molecole presenti nel pathway, e pertanto come fatto in precedenza i relativi coefficienti frazionari di trasferimento sono stati modellizzati attraverso una legge lineare che esplicita la dipendenza dai compartimenti di controllo.

Il sottomodello presenta non linearità per un duplice motivo: da una parte per i controlli appena citati, dall'altra per la presenza della reazione di complessazione tra PIP_3 e PDK, resa ancora una volta, sempre nelle ipotesi esposte nei precedenti capitoli, con l'aggiunta di un termine dato dal prodotto tra le variabili interessate per un coefficiente. Di seguito si riportano come d'abitudine il diagramma del modello, con relativo elenco delle variabili con cui vengono indicate le molecole coinvolte, reazioni e bilanci di massa.

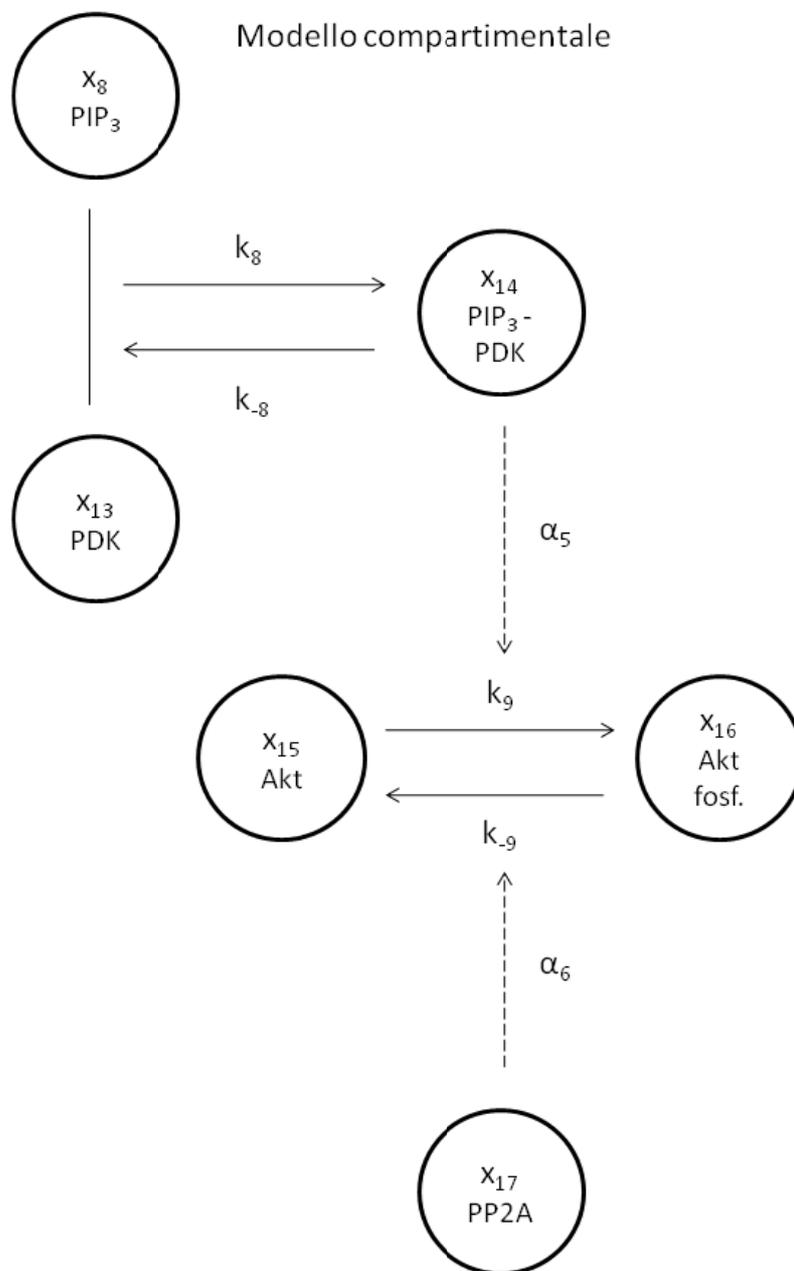


Figura 4.2.1: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_8 : PIP_3
- x_{13} : PDK
- x_{14} : complesso PIP_3 - PDK
- x_{15} : Akt
- x_{16} : Akt fosforilato
- x_{17} : PP2A

Reazioni

- k_8 : complessazione
- k_9 : fosforilazione
- k_{-j} : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_8 = k_6(x_7)x_9 + k_7x_{10} - (k_{-6}(x_{11}) + k_{-7}(x_{12}))x_8 - k_8x_8x_{13} + k_{-8}x_{14}$$

$$\dot{x}_{13} = k_{-8}x_{14} - k_8x_8x_{13}$$

$$\dot{x}_{14} = k_8x_8x_{13} - k_{-8}x_{14}$$

$$\dot{x}_{15} = k_{-9}(x_{17})x_{16} - k_9(x_{14})x_{15}$$

$$\dot{x}_{16} = k_9(x_{14})x_{15} - k_{-9}(x_{17})x_{16}$$

$$k_9(x_{14}) = k_9 + \alpha_5x_{14}$$

$$k_{-9}(x_{17}) = k_{-9} + \alpha_6x_{17}$$

I termini presenti nelle equazioni ma non nell'elenco delle variabili sono riferiti alle reazioni esposte nei capitoli precedenti.

Ancora una volta possiamo notare la presenza di molecole che vengono definite da una variabile, ma per le quali non viene fornita l'equazione differenziale del bilancio di massa: qui si tratta in particolare di una sola molecola, cioè PP2A.

Siamo nuovamente in presenza di un compartimento che si comporta da funzione forzante per il modello, il cui andamento temporale dovrà essere fornito esplicitamente dall'esterno. Dovrà essere pertanto trattato come un ingresso del sistema.

Capitolo 5

Feedback e cammino di sintesi proteica

5.1 La biochimica

Prima di procedere all'esposizione dell'ultimo capitolo riguardante il nuovo modello formulato, bisogna premettere che questo gruppo di reazioni è oggetto di molteplici opinioni discordi allo stato dell'arte: si preferisce pertanto affrontarlo globalmente, esponendo quando possibile le diverse ipotesi avanzate sui meccanismi di funzionamento.

TSC1 e TSC2 (*Tuberous sclerosis protein 1* e *Tuberous sclerosis protein 2*) sono proteine che tendono ad avere ruolo attivo nel pathway di feedback una volta complessate, creando un legame sia fisico che funzionale; ricoprono un ruolo di notevole importanza come punto di collegamento tra la cascata di reazioni deputata alla regolazione del metabolismo del glucosio e la parte di signaling dell'insulina che presiede alla sintesi proteica, come risulterà evidente in seguito. È opinione diffusa che il loro complesso agisca ostacolando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di mTOR (*mammalian target of rapamycin*), altri sostengono invece che la funzione in discussione sia quella di catalizzatore della defosforilazione: nel modello formulato verrà dato credito a quest'ultima versione, e il complesso verrà rappresentato come fosfatasi nei confronti della forma di mTOR fosforilata.

Il primo punto di contatto tra regolazione del metabolismo del glucosio e signaling dell'insulina preposto al controllo della sintesi proteica è rappresentato dall'azione che la forma fosforilata di Akt esercita sulla formazione del complesso: la fosforilazione di TSC2 da parte di Akt infatti destabilizza la molecola, impedendole di legarsi a TSC1 e di creare un complesso attivo. A breve si vedrà quindi come in corrispondenza di questo evento, di fatto indotto all'attivazione di Akt in seguito alla cascata vista nei capitoli precedenti, si verifichi anche l'attivazione della sintesi proteica, per mezzo di una sequenza di inibizioni successive: Akt pertanto, attraverso le sue molteplici funzioni, permette di accoppiare i due meccanismi.

Come già detto in precedenza, l'attivazione di mTOR è legata alla sua fosforilazione (alcuni parlano in particolare di fosforilazione in serina 2448, ma dato che anche questo rappresenta un punto controverso allo stato dell'arte si è preferito non scendere in dettagli): dalla forma attivata di mTOR si dipartono due differenti vie di controllo, finalizzate ad ottenere come effetto finale, come già discusso, l'attivazione della sintesi proteica da una parte, e l'inibizione della cascata del pathway descritto nei capitoli precedenti (azione di feedback negativo) dall'altra.

Seguendo la prima via, mTOR fosforilato agisce come chinasi nei confronti di 4EBP1, molecola che, a differenza delle precedenti, allo stato basale si trova in forma attiva: mTOR pertanto favorisce l'inattivazione di 4EBP1, e ciò favorisce la propagazione dello stimolo alla sintesi proteica.

4EBP1 infatti, in assenza di stimolo, tende a complessare eIF4E (*eukaryote initiation factor 4E*), ultima proteina coinvolta nel pathway in esame e molecola direttamente responsabile dell'attivazione della sintesi proteica, in particolar modo fungendo da stimolo per l'inizio della fase di traduzione.

Nel complesso eIF4E viene inattivata: ciò significa che lo stimolo insulinico, catalizzando la fosforilazione di 4EBP1 e la sua inattivazione, lo rende indisponibile alla formazione del complesso, e mancando substrato utile alla reazione il risultato finale è un decremento della reazione di complessazione, che determina una maggiore presenza di eIF4E libero e attivo. La cascata di signaling insulinico in conclusione, come già anticipato e ora dimostrato, favorisce la sintesi proteica attraverso un incremento di eIF4E disponibile a stimolarla rispetto allo stato basale.

Per quanto riguarda le reazioni nell'anello di feedback, mTOR rientra in questo cammino sempre come chinasi, questa volta però nella reazione che da S6K porta a S6K fosforilato (anche qui non sono disponibili maggiori informazioni sui particolari siti di fosforilazione).

Questa proteina una volta fosforilata vede attivata la sua funzione di chinasi, che in questo caso ha come obiettivo la catalizzazione della fosforilazione in serina 636: l'azione di feedback è quindi imputabile al fatto che, tra tutte, questa chinasi favorisce la fosforilazione nei siti specifici responsabili dell'inibizione della cascata diretta del pathway, come già esposto in maggior dettaglio nei primi capitoli, andando a favorire ancora una volta il decremento di reagenti utili al sostegno della cascata, e in particolar modo, in questo punto cruciale, alla sua partenza.

5.2 Il modello

IL sottomodello presentato in questa sezione risulta più ostico a causa del gran numero di reazioni coinvolte, ma se analizzato più nel dettaglio si può notare che le singole parti riguardano sempre reazioni di complessazione e fosforilazione, eventualmente complicate dalla presenza di controlli da parte di altri compartimenti, per cui ci si è comportati coerentemente con le scelte modellistiche fatte in precedenza.

A causa delle informazioni carenti e, se presenti, contrastanti, si è dovuto operare una scelta e dar credito ad alcune ipotesi piuttosto che ad altre riguardo alle reazioni coinvolte: la modifica del modello pertanto può avvenire solo con l'apporto di nuove e più approfondite conoscenze in ambito biochimico, preferibilmente validate da dati sperimentali.

La non linearità del modello è dovuta in questo caso sia alla presenza di controlli, sia di reazioni di complessazione, modellizzate come in precedenza sempre ammettendo la correttezza delle ipotesi formulate per giustificare le formulazioni matematiche proposte.

Per completezza si ricorda che in assenza di controlli le fosforilazioni sono state espresse con coefficienti costanti e le complessazioni attraverso il prodotto delle variabili coinvolte modulato da un coefficiente. I coefficienti in caso di controllo da parte di compartimenti esterni sono sempre stati resi con leggi lineari.

Modello compartimentale

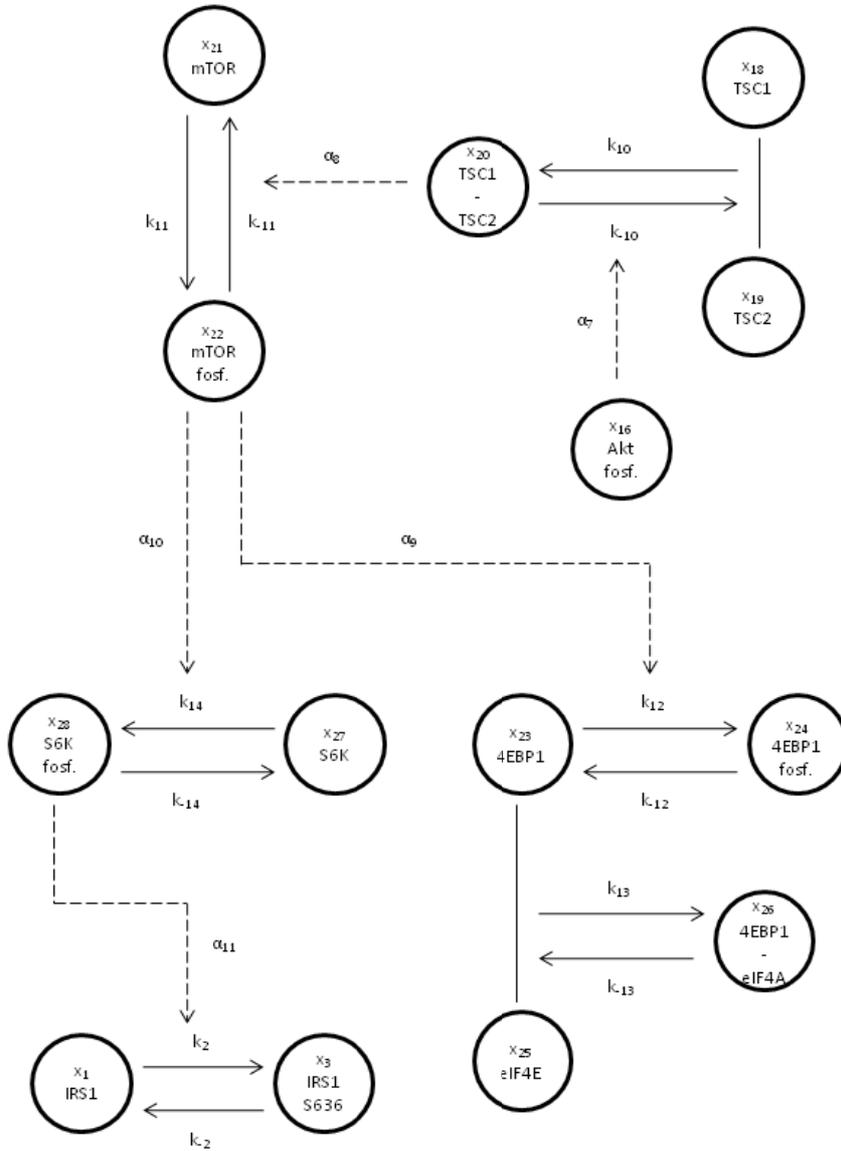


Figura 5.2.1: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_1 : IRS1
- x_3 : IRS1 S636
- x_{16} : Akt fosforilato
- x_{18} : TSC1
- x_{19} : TSC2
- x_{20} : complesso TSC1- TSC2
- x_{21} : mTOR
- x_{22} : mTOR fosforilato
- x_{23} : 4EBP1
- x_{24} : 4EBP1 fosforilato
- x_{25} : eIF4E
- x_{26} : complesso 4EBP1- eIF4E
- x_{27} : S6K
- x_{28} : S6K fosforilato

Reazioni

- k_2 : fosforilazione
- k_{10} : complessazione
- k_{11} : fosforilazione
- k_{12} : fosforilazione
- k_{13} : complessazione
- k_{14} : fosforilazione

- k_{-j} : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_1 = -(k_1 + k_2(x_{28}) + k_3)x_1 + k_{-1}x_2 + k_{-2}x_3 + k_{-3}x_4$$

$$\dot{x}_3 = k_2(x_{28})x_1 - k_{-2}x_3$$

$$\dot{x}_{16} = k_9(x_{14})x_{15} - k_{-9}(x_{17})x_{16}$$

$$\dot{x}_{18} = k_{-10}(x_{16})x_{20} - k_{10}x_{18}x_{19}$$

$$\dot{x}_{19} = k_{-10}(x_{16})x_{20} - k_{10}x_{18}x_{19}$$

$$\dot{x}_{20} = k_{10}x_{18}x_{19} - k_{-10}(x_{16})x_{20}$$

$$\dot{x}_{21} = k_{-11}(x_{20})x_{22} - k_{11}x_{21}$$

$$\dot{x}_{22} = k_{11}x_{21} - k_{-11}(x_{20})x_{22}$$

$$\begin{aligned} \dot{x}_{23} = & k_{-12}x_{24} - k_{12}(x_{22})x_{23} - (k_{-6}(x_{11}) + k_{-7}(x_{12}))x_8 \\ & - k_{13}x_{23}x_{25} + k_{-13}x_{26} \end{aligned}$$

$$\dot{x}_{24} = k_{12}(x_{22})x_{23} - k_{-12}x_{24}$$

$$\dot{x}_{25} = k_{-13}x_{26} - k_{13}x_{23}x_{25}$$

$$\dot{x}_{26} = k_{13}x_{23}x_{25} - k_{-13}x_{26}$$

$$\dot{x}_{27} = k_{-14}x_{28} - k_{14}(x_{22})x_{27}$$

$$\dot{x}_{28} = k_{14}(x_{22})x_{27} - k_{-14}x_{28}$$

$$k_2(x_{28}) = k_2 + \alpha_{11}x_{28}$$

$$k_{-10}(x_{16}) = k_{-10} + \alpha_7x_{16}$$

$$k_{11}(x_{20}) = k_{11} + \alpha_8x_{20}$$

$$k_{12}(x_{22}) = k_{12} + \alpha_9x_{22}$$

$$k_{14}(x_{22}) = k_{14} + \alpha_{10}x_{22}$$

Al termine del lavoro ogni variabile ed ogni reazione ormai sono stati descritti e ogni scelta modellistica motivata.

Si nota, a differenza di alcuni sottomodelli precedenti, l'assenza di ingressi forzanti al sistema, essendo stata fornita l'equazione del bilancio di massa per ciascuna delle variabili.

Capitolo 6

Modello, variabili di stato ed equazioni

Al fine di fornire una visione più omogenea e completa del lavoro svolto, si ripropone ora l'intero modello, completo di tutta la lista delle variabili, delle reazioni e dei controlli.

Si riportano anche i principali riferimenti utilizzati per giustificare la natura delle reazioni coinvolte nell'intero pathway, anche se si ricorda nuovamente che in realtà attualmente non c'è molta chiarezza nemmeno tra le conoscenze biochimiche, pertanto verranno citati gli articoli che riportano le ipotesi considerate più plausibili e che pertanto sono state considerate valide.

Per avere una visione più chiara e valutare anche le altre opinioni si possono consultare gli articoli riportati nella bibliografia.

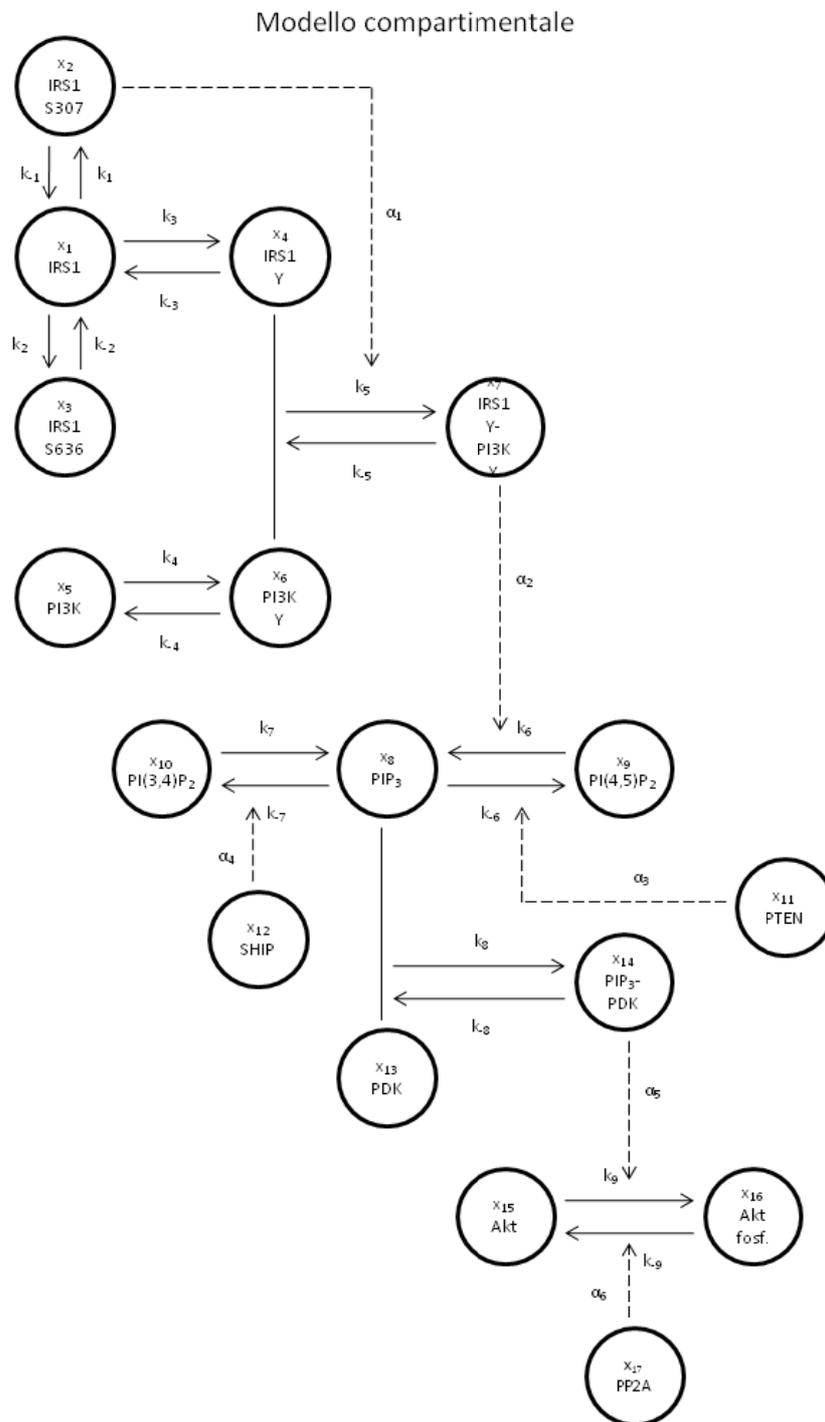


Figura 6.5: prima parte del modello, da IRS1 a Akt

Modello compartimentale

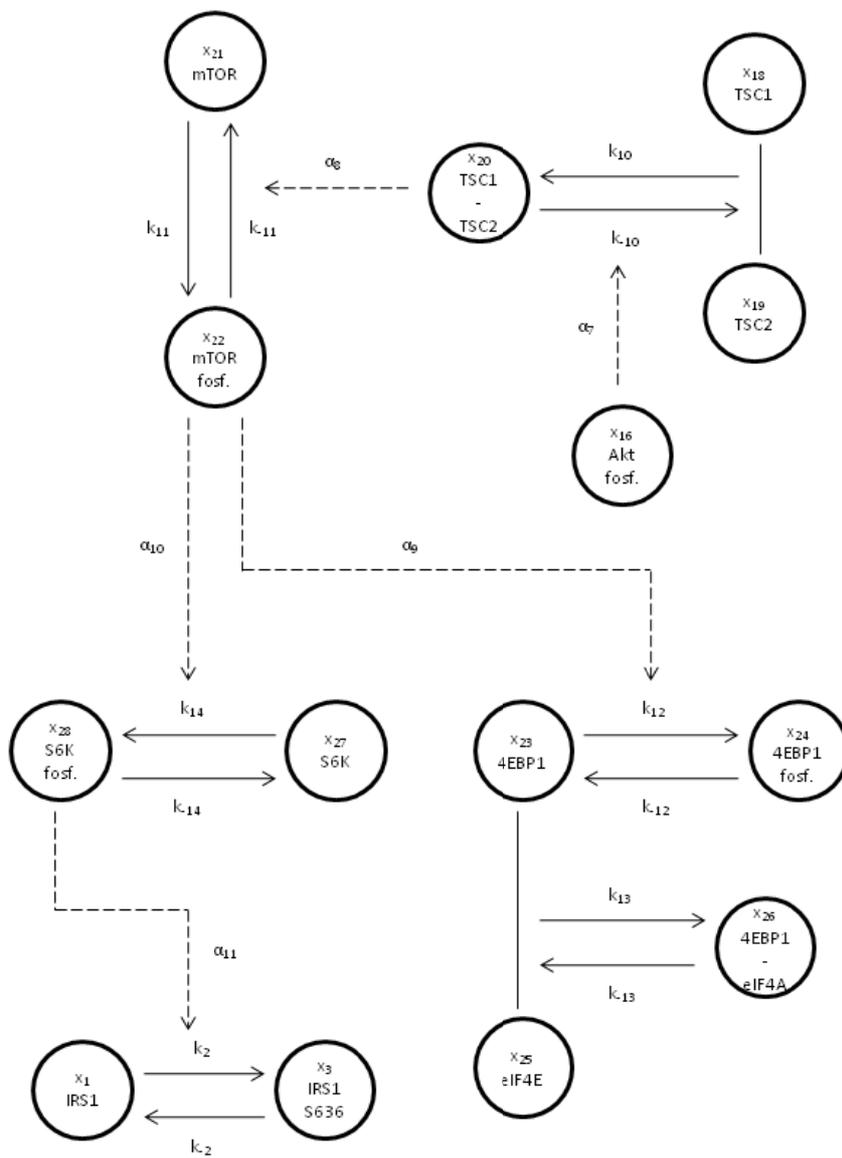


Figura 6.2: schema del sottomodulo compartimentale

Variabili

- x_1 : IRS1
- x_2 : IRS1 fosforilato in serina 307
- x_3 : IRS1 fosforilato in serina 636
- x_4 : IRS1 fosforilato in tirosina
- x_5 : PI3K
- x_6 : PI3K fosforilato in tirosina
- x_7 : complesso IRS1 fosforilato in tirosina- PI3K
fosforilato in tirosina
- x_8 : PIP₃
- x_9 : PI(4,5)P₂
- x_{10} : PI(3,4)P₂
- x_{11} : PTEN
- x_{12} : SHIP

- x_{13} : PDK
- x_{14} : complesso PIP_3 - PDK
- x_{15} : Akt
- x_{16} : Akt fosforilato
- x_{17} : PP2A
- x_{18} : TSC1
- x_{19} : TSC2
- x_{20} : complesso TSC1- TSC2
- x_{21} : mTOR
- x_{22} : mTOR fosforilato
- x_{23} : 4EBP1
- x_{24} : 4EBP1 fosforilato
- x_{25} : eIF4E
- x_{26} : complesso 4EBP1- eIF4E
- x_{27} : S6K
- x_{28} : S6K fosforilato

Reazioni

- k_1 : fosforilazione in serina 307
- k_2 : fosforilazione in serina 636
- k_3 : fosforilazione in tirosina
- k_4 : fosforilazione in tirosina
- k_5 : complessazione
- k_6 : fosforilazione
- k_7 : fosforilazione
- k_8 : complessazione
- k_9 : fosforilazione
- k_{10} : complessazione
- k_{11} : fosforilazione
- k_{12} : fosforilazione
- k_{13} : complessazione
- k_{14} : fosforilazione

➤ k_{-j} : reazione inversa

Equazioni

$$\dot{x}_1 = -(k_1 + k_2(x_{28}) + k_3)x_1 + k_{-1}x_2 + k_{-2}x_3 + k_{-3}x_4$$

$$\dot{x}_2 = k_1x_1 - k_{-1}x_2$$

$$\dot{x}_3 = k_2(x_{28})x_1 - k_{-2}x_3$$

$$\dot{x}_4 = -k_{-3}x_4 - k_5(x_2)x_4x_6 + k_3x_1 + k_{-5}x_7$$

$$\dot{x}_5 = k_{-4}x_6 - k_4x_5$$

$$\dot{x}_6 = -k_{-4}x_6 - k_5(x_2)x_4x_6 + k_4x_5 + k_{-5}x_7$$

$$\dot{x}_7 = k_5(x_2)x_4x_6 - k_{-5}x_7$$

$$\begin{aligned}\dot{x}_8 &= k_6(x_7)x_9 + k_7x_{10} - (k_{-6}(x_{11}) + k_{-7}(x_{12}))x_8 \\ &\quad - k_8x_8x_{13} + k_{-8}x_{14}\end{aligned}$$

$$\dot{x}_9 = k_{-6}(x_{11})x_8 - k_6(x_7)x_9$$

$$\dot{x}_{10} = k_{-7}(x_{12})x_8 - k_7x_{10}$$

$$\dot{x}_{13} = k_{-8}x_{14} - k_8x_8x_{13}$$

$$\dot{x}_{14} = k_8x_8x_{13} - k_{-8}x_{14}$$

$$\begin{aligned}
x_{15}^{\dot{}} &= k_{-9}(x_{17})x_{16} - k_9(x_{14})x_{15} \\
x_{16}^{\dot{}} &= k_9(x_{14})x_{15} - k_{-9}(x_{17})x_{16} \\
x_{18}^{\dot{}} &= k_{-10}(x_{16})x_{20} - k_{10}x_{18}x_{19} \\
x_{19}^{\dot{}} &= k_{-10}(x_{16})x_{20} - k_{10}x_{18}x_{19} \\
x_{20}^{\dot{}} &= k_{10}x_{18}x_{19} - k_{-10}(x_{16})x_{20} \\
x_{21}^{\dot{}} &= k_{-11}(x_{20})x_{22} - k_{11}x_{21} \\
x_{22}^{\dot{}} &= k_{11}x_{21} - k_{-11}(x_{20})x_{22} \\
x_{23}^{\dot{}} &= k_{-12}x_{24} - k_{12}(x_{22})x_{23} - (k_{-6}(x_{11}) + k_{-7}(x_{12}))x_8 \\
&\quad - k_{13}x_{23}x_{25} + k_{-13}x_{26} \\
x_{24}^{\dot{}} &= k_{12}(x_{22})x_{23} - k_{-12}x_{24} \\
x_{25}^{\dot{}} &= k_{-13}x_{26} - k_{13}x_{23}x_{25} \\
x_{26}^{\dot{}} &= k_{13}x_{23}x_{25} - k_{-13}x_{26} \\
x_{27}^{\dot{}} &= k_{-14}x_{28} - k_{14}(x_{22})x_{27} \\
x_{28}^{\dot{}} &= k_{14}(x_{22})x_{27} - k_{-14}x_{28}
\end{aligned}$$

$$k_2(x_{28}) = k_2 + \alpha_{11}x_{28}$$

$$k_5(x_2) = k_5 + \alpha_1x_2$$

$$k_6(x_7) = k_6 + \alpha_2x_7$$

$$k_{-6}(x_{11}) = k_{-6} + \alpha_3x_{11}$$

$$k_{-7}(x_{12}) = k_{-7} + \alpha_4x_{12}$$

$$k_9(x_{14}) = k_9 + \alpha_5x_{14}$$

$$k_{-9}(x_{17}) = k_{-9} + \alpha_6x_{17}$$

$$k_{-10}(x_{16}) = k_{-10} + \alpha_7x_{16}$$

$$k_{11}(x_{20}) = k_{11} + \alpha_8x_{20}$$

$$k_{12}(x_{22}) = k_{12} + \alpha_9x_{22}$$

$$k_{14}(x_{22}) = k_{14} + \alpha_{10}x_{22}$$

Per i riferimenti sono stati usati principalmente i seguenti articoli, tuttavia bisogna specificare che molte reazioni sono state definite integrando informazioni da molti altri articoli, e grazie alla collaborazione di biologi:

- ✓ *Philippe Gual, Yannick Le Marchand-Brustel, Jean-François Tanti.*
Positive and negative regulation of insulin signaling through IR1 phosphorylation : equazioni 1, 2, 3.

- ✓ *Ahmad R. Sedaghat, Arthur Sherman, Michael J. Quon.* A mathematical model of metabolic insulin signaling pathways : equazioni 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.
- ✓ *Derek LeRoith, Simeon Taylor, Jerrold Olefsky.* Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text, 3rd edition : equazioni 8, 13, 14, 15, 16.
- ✓ *Ming Wu, Xuerui Yang, Christina Chan.* A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach : equazioni 15, 16.
- ✓ *Ken Inoki, Yong Li, Tianquan Zhu, Jun Wu, Kun-Lian Guan.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresser mTOR signaling : equazioni da 18 a 28.
- ✓ *Edward J. McManus, Dario R. Alessi.* TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation : equazioni da 18 a 28

Capitolo 7

Conclusioni

Al termine di questo lavoro di tesi è stata formalizzata una parte importante della rete del signaling dell'insulina. Tuttavia come è già stato fatto notare in precedenza, il modello elaborato presenta dei limiti dovuti principalmente alla carenza di informazioni precise e alla presenza di opinioni discordi riguardo alla natura delle reazioni: pertanto, oltre alla questione della correttezza delle scelte modellistiche operate per le diverse reazioni, si pone anche il problema della validità a livello biochimico delle ipotesi formulate per queste ultime.

In questo lavoro, in caso di incertezze, si è scelto di dare credito alle versioni più frequentemente sostenute, tuttavia esistendo anche altre opinioni non possiamo dare per scontato che le assunzioni fatte siano effettivamente vere; pertanto, in vista della sessione sperimentale, potrebbe essere utile proporre più modelli per uno stesso pathway, differenziandoli in base alle ipotesi esistenti sulla biochimica delle reazioni.

Altra difficoltà sempre inerente all'interfacciarsi col mondo della biochimica è stata il diverso approccio alla questione da parte di questo mondo rispetto a quello ingegneristico-modellistico: la difficoltà nel reperire informazioni precise è stata influenzata anche da questo, in quanto molto spesso l'azione delle

molecole veniva presentata a livello di effetto globale su punti del pathway di importanza maggiore rispetto a quella dei punti esatti della rete in cui venivano coinvolte nelle reazioni: per risolvere tali questioni è stato necessario ricorrere al confronto di numerose informazioni e, quando possibile, alla consulenza dei biologi.

Già nell'introduzione è stato accennato che a livello modellistico non sono presenti molti lavori e che l'unico relativo alla sottorete del signaling insulinico analizzata è il lavoro di Sedaghat, Sherman e Quon, sebbene questi affrontino solo un sottoinsieme ristretto delle reazioni di interesse; è servito più che altro come punto di partenza da cui poter sviluppare in maniera autonoma un nuovo e più accurato ed esteso modello. I valori numerici disponibili in letteratura per i parametri pertanto sono molto pochi, e riguardano soprattutto la reazione di fosforilazione di IRS1 (Quon parla soltanto di una generica fosforilazione che sostiene la cascata, con $k = 4.16 \text{ min}^{-1}$, e per la reazione inversa $k = 1.40 \text{ min}^{-1}$), la complessazione di IRS1 e PI3K ($k = 7.06 \cdot 10^{11} \text{ min}^{-1}$, per la reazione inversa $k = 10 \text{ min}^{-1}$), le fosforilazioni di PIP₃ (da PI(3,4)P₂: $k = 2.96 \text{ min}^{-1}$, da PI(4,5)P₂ a k viene assegnata una legge dipendente da vari parametri, in sintesi lineare nel compartimento di controllo del complesso IRS1-PI3K, mentre in entrambi i casi le defosforilazioni dipendono dall'attività relativa delle specifiche fosfatasi), ed infine la fosforilazione di Akt (per la reazione inversa $k = 6.93 \text{ min}^{-1}$, mentre per la diretta viene proposta una dipendenza lineare da PIP₃).

Il lavoro pertanto pone le basi per un sicuro proseguimento, in cui grazie all'identificazione del modello per mezzo di dati sperimentali si potrà ottenere un'analisi quantitativa del sistema.

Per gli esperimenti, che dovranno essere concordati in modo da soddisfare il requisito di identificabilità a priori, verrà utilizzata una nuova strumentazione per la misura della concentrazione proteica.



Figura 7.1: un'immagine dello strumento

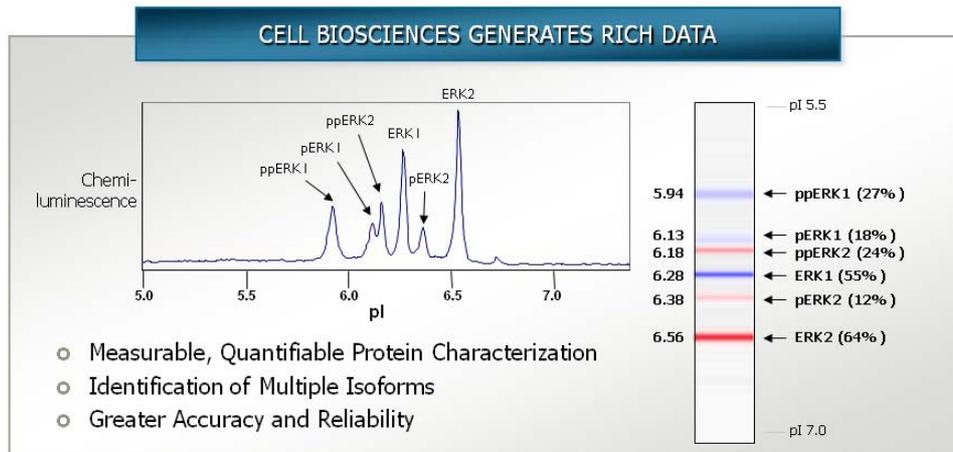


Figura 7.6: esempio di output

Identificando il modello in diverse situazioni sperimentali si andranno a valutare le variazioni dei parametri in corrispondenza a diversi stimoli di insulina per soggetti normali o diabetici, valutando quindi come variano quantitativamente i flussi del pathway nei diversi casi. Dopo aver modellizzato anche l'altro cammino di interesse della rete di signaling, a sua volta identificato come quello formalizzato in questo lavoro, si potranno apprezzare anche le diverse interazioni tra i cammini nelle diverse situazioni.

Bibliografia

[1]*Philippe Gual, Yannick Le Marchand-Brustel, Jean-François Tanti.* Positive and negative regulation of insulin signaling through IR1 phosphorylation

[2]*Ahmad R. Sedaghat, Arthur Sherman, Michael J. Quon.* A mathematical model of metabolic insulin signaling pathways

[3]*Derek LeRoith, Simeon Taylor, Jerrold Olefsky.* Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text, 3rd edition

[4]*Ming Wu, Xuerui Yang, Christina Chan.* A dynamic analysis of IRS-PKR signaling in liver cells: a discrete modeling approach

[5]*Ken Inoki, Yong Li, Tianquan Zhu, Jun Wu, Kun-Lian Guan.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling

[6]*Edward J. McManus, Dario R. Alessi.* TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation

[7] *Leila Khamzina, Alain Veilleux, Sébastien Bergeron, André Marette Guan*. Increased activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin Resistance

[8] *Michael J. Quon*. Advances in kinetic analysis of insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipose cells

[9] *Sumanas Wanant, Michael J. Quon*. Insulin receptor binding kinetics: modeling and simulation studies

[10] *Michael J. Quon, L. Arthur Campfield*. A mathematical model and computer simulation study of insulin receptor regulation

[11] *Michael J. Quon, L. Arthur Campfield*. A mathematical model and computer simulation study of insulin sensitive glucose transporter regulation

[12] *Mary-Elizabeth Patti, C. Ronald Kahn*. The insulin receptor-A critical link in glucose homeostasis and insulin action

[13] *Masahiro Aoki, Erik Blazek, Peter K. Vogt*. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3K and Akt

[14]*O. Jameel Shah, Zhiyong Wang, Tony Hunter.* Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies

[15]*Diane C. Fingar, Celeste J. Richardson, Andrew R. Tee, Lynn Cheatham, Christina Tsou, John Blenis.* mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4EBP1/eukaryotic translation initiation factor 4E

[16]*Kenta Hara, Kazuyoshi Yonezawa, Mark T. Kozlowski, Tadanori Sugimoto, Khurshid Andrabi, Qin-Ping Weng, Masato Kasuga, Ikuo Nishimoto, Joseph Avruch.* Regulation of eIF-4EBP1 phosphorylation by mTOR

[17]*Frédéric Tremblay, André Marette.* Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase pathway

[18]*C.G. Proud.* Regulation of protein synthesis by insulin