

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Barbara Schmidtová

Regulace mTOR dráhy v meióze oocytu
Regulation of mTOR pathway in the oocyte meiosis

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Andrej Šušor, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Andreji Šušorovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za cenné rady. Děkuji také celé Laboratoři biochemie a molekulární biologie ÚŽFG AV ČR, rodině a přátelům za podporu a zázemí.

Prohlášení:

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

V Praze, 13.08.2020

Podpis:

Abstrakt:

Savčí cíl rapamycinu (mTOR) je serin-threoninová kináza, která se v posledním desetiletí stala významným tématem mnohých studií, které vedou k novým poznatkům o tom, jak buňka funguje. Podílí se na proteosyntéze, metabolismu, regulaci buněčného cyklu, proliferaci a odpovědi na přítomnost živin a růstových faktorů. Jsou popsána určitá onemocnění, která jsou způsobena mutacemi v mTOR genu, což vede k abnormální funkci této kinázy. Mezi tyto onemocnění patří rakovina či porucha plodnosti. Výzkum zaměřený na mTOR je přínosný i díky tomu, že se hledají farmaka, která by mohla ovlivňovat jeho funkci a tím poskytnout léčbu pro tato onemocnění. Mezi nejznámější patří inhibitor Rapamycin a jeho deriváty.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí poznatků v podobě literární rešerše o tom, jak může být mTOR regulován a o roli jeho substrátů při fungování buňky. Dalším cílem je přiblížit roli mTOR při vývoji oocyty, translaci a v lidském zdraví.

Klíčová slova: Oocyt, mTOR, translace, 4E-BP1, MPF, meióza, AKT

Abstract:

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) is serin-threonin kinase, which has become a major topic in many studies in the last decade, leading to new insights into how cell works. This kinase is involved in proteosynthesis, metabolism, cell cycle regulation, proliferation and responses to nutrients and growth factors. There are certain diseases caused by mutations in mTOR gene, which lead to abnormal function of this kinase. These diseases include cancer or fertility disorders. mTOR research is also beneficial due to the search for drugs that could rescue its function and thus provide treatment for these diseases. The best-known drug is inhibitor Rapamycin and its derivates.

The aim of this bachelor thesis is to summarize the knowledge about how mTOR can be regulated, the role of its substrates in cell function and to define the role of mTOR in oocyte development, translation and human health.

Keywords: Oocyte, mTOR, translation, 4E-BP1, MPF, meiosis, AKT

Obsah

Úvod.....	1
1. mTOR.....	2
1.1. Struktura mTOR.....	3
1.1.1. HEAT motivy.....	3
1.1.2. FAT a FATC doména.....	3
1.1.3. FRB doména	4
1.1.4. Kinázová doména	4
1.1.5. FIT doména.....	4
1.2. mTOR komplexy	5
1.2.1. mTOR komplex 1	5
1.2.2. mTOR komplex 2	6
2. Oogeneze.....	8
2.1. Vývoj oocyty	8
2.2. Folikulogeneze	9
2.3. Meiotické zrání oocyty.....	9
2.3.1. M-fázi podporující faktor (MPF).....	10
2.3.2. Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)	11
2.3.3. Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK)	11
2.4. Funkce mTOR v oogenezi.....	12
3. Regulace translace pomocí mTOR.....	13
3.1. Translace	13
3.1.1. 4E vázající protein (4E-BP).....	14
3.1.2. S6 kináza (S6K)	14
4. Regulace mTOR	16
4.1. Protein kináza B (AKT).....	16
4.1.1. Komplex tuberózní sklerózy (TSC)	18
4.1.2. Obohacený Ras homolog v mozku (Rheb)	18
4.1.3. 40 kDa prolin bohatý AKT substrát (PRAS40)	19
4.2. FK-506 vázající protein 38 (FKBP38)	19
4.3. S6 kináza 1 (S6K1)	20
5. Role mTOR v jiných drahách	21
Závěr.....	23
Seznam použité literatury	24

Úvod

Tato bakalářská práce je zaměřena na mTOR dráhu, její účast v různých buněčných procesech a její regulaci. První kapitola se zabývá charakteristikou mTOR, funkcí a využitím rapamycinu – hlavního inhibitoru mTOR a doménami mTOR, které jsou důležité pro jeho správné fungování. Mezi tyto domény patří HEAT motivy, FAT, FATC, FRB, kinázová a FATC doména. mTOR se vyskytuje ve dvou funkčních komplexech – mTOR-Raptor komplex a mTOR-Rictor komplex a každý z nich má specifické složení, které umožňuje jejich zapojení v určitých procesech.

Ve druhé kapitole je popsána oogeneze a meiotické zrání oocyty. Toto zrání je regulována různými molekulami, jako je například M-fázi podporující faktor, cyklický adenosinmonofosfát, nebo mitogenem aktivovaná kináza. Důležitou roli v tomto zrání a celkově oogenezi má i mTOR.

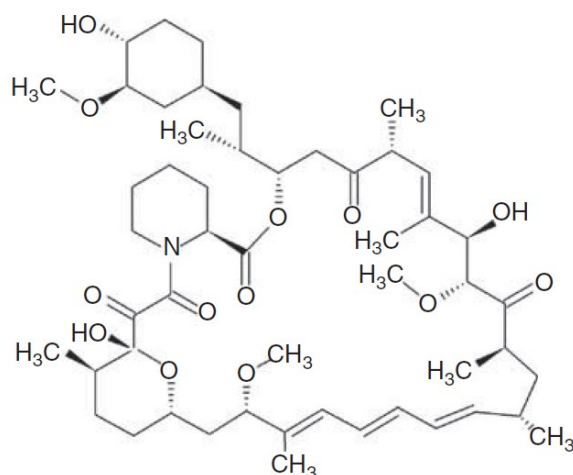
Třetí kapitola je zaměřena na regulaci translace pomocí mTOR, která probíhá primárně v iniciaci pomocí fosforylace 4E vázajícího proteinu a S6 kinázy. Tato regulace je důležitá pro regulaci genové exprese během oogeneze a embryogeneze.

V neposlední řadě se práce zabývá regulací mTOR. Mezi hlavní regulátory patří AKT a s ním spojené další aktivátory a inhibitory, jako je komplex tuberózní sklerózy, 40 kDa prolin bohatý AKT substrát a obohacený Ras homolog v mozku. Dalšími regulátory jsou FK-506 vázající protein 38 a S6 kináza, která se účastní i již zmíněné regulace translace. mTOR má také významnou roli v různých lidských onemocněních. Jeho zvýšená aktivita je příčinou mnoha typů rakovin a metabolických poruch. Naopak jeho snížená aktivita negativně ovlivňuje ženskou plodnost.

1. mTOR

Savčí cíl rapamycinu (mTOR, Mammalian Target of Rapamycin), též známý jako FRAP (FKBP12-rapamycin-associated Protein, FKBP12-rapamycin asociovaný protein), RAFT (Rapamycin and FKBP12 Target, Rapamycinový a FKBP12 cíl) nebo RAPT (Rapamycin Target, Rapamycinový cíl), je vysoce konzervovaná, 289 kDa velká serin-threoninová kináza z rodiny kináz asociovaných s fosfatidylinositolem (PIKK). V buňce ovlivňuje různé procesy, jako například translaci mRNA, ribozomální biosyntézu, autofáгии nebo metabolismus (shrnutí v Sarbassov, Ali, a Sabatini 2005).

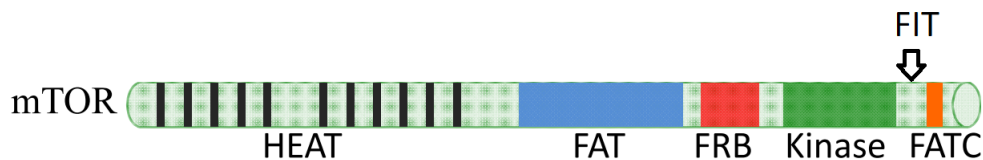
Mezi specifické inhibitory mTOR patří především rapamycin. Tato inhibice je možná díky jeho schopnosti navázat se na intracelulární receptor FK506-vázacího proteinu 12 (FKBP12). FKBP12-rapamycinový komplex poté interaguje přímo s FKBP12-rapamycin vázací doménou mTOR (FRB) (Zoncu et al., 2011). Rapamycin získal své pojmenování podle Rapa Nui, což je název pro Velikonoční ostrov, kde byl poprvé vyizolován z bakterie *Streptomyces hygroscopicus* (Vézina a Kudelski, 1975). Původně byl objeven jako antimykotikum, ale později se zjistilo, že má i imunosupresivní účinky, díky čemuž se začal využívat při transplantacích orgánů. Kromě těchto imunosupresivních účinků se využívá i v onkologii, má neuroprotektivní vlastnosti a podporuje dlouhověkost (shrnutí v Yoo et al., 2016).



Obrázek 1: Chemická struktura rapamycinu (Nikolai et al., 2015)

1.1. Struktura mTOR

mTOR je složen z různých domén. Všechny TOR proteiny mají na N-terminálním konci 20 tandemových opakování HEAT motivů. Poté směrem k C-terminálnímu konci následuje FAT, FRB, kinázová a FATC doména. Nedávná studie ukazuje, že mezi kinázovou a FATC doménou se ještě nachází FIT (PRD) doména (Mordes et al., 2008).



Obrázek 2: Struktura mTOR (převzato z AlQurashi et al., 2013, upraveno)

Do obrázku je doplněna nově objevená FIT doména, která se nachází mezi kinázovou a FATC doménou.

1.1.1. HEAT motivy

Název HEAT pochází z prvních písmen čtyř hlavních proteinů, které se tam vyskytují – Huntingtin, Elongační faktor 3 (EF3), Protein fosfatáza 2A a TOR1. HEAT motiv se skládá ze dvou alfa helixů, které zprostředkovávají interakce mezi proteiny (Andrade and Bork, 1995).

1.1.2. FAT a FATC doména

Název FAT je odvozen podle hlavních zástupců tří skupin, kteří tuto doménu sdílejí – FRAP, ATM a TRRAP. Je přítomna u všech členů rodiny PIKK, ale její funkce ještě není přesně prozkoumána. Zdá se, že by mohla sloužit jako strukturální lešení (scaffold), nebo jako protein vázající doména. FAT a FATC domény spolu zřejmě interagují, protože se vždy vyskytují pohromadě. FATC doména je příliš malá na to, aby se sama dokázala složit, ale zároveň je více konzervovaná než FAT doména. FATC doména je tím pádem více důležitá pro katalytickou funkci mTOR (Bosotti et al., 2000).

FATC (FAT C-terminální) doména se nachází ještě více na C-terminálním konci a obsahuje stejné skupiny jako FAT doména. V oxidované formě je složena z alfa helixů a disulfidicky vázané smyčky. Pokud dojde k redukci disulfidické vazby, tak se zvýší flexibilita v oblasti C-terminální smyčky. Redukce ale může ovlivnit i vazebnost FATC domény k jejím vazebným partnerům (Dames et al., 2005).

1.1.3. FRB doména

Na C-terminálním konci nalezneme FRB (FKBP12-rapamycin vázající) doménu o velikosti 11 kDa (Chen et al., 1995). Tato doména je, jak už název vypovídá, zodpovědná za vazbu rapamycinu na mTOR. Je složena ze čtyř helixů, které jsou spojeny krátkou smyčkou a dohromady vytvářejí čtyřhelixový svazek (Veverka et al., 2008). Funkční FRB doména je velmi důležitá pro kinázovou aktivitu mTOR (Vilella-Bach et al., 1999).

Ser2035, který se v doméně vyskytuje, je velmi důležitý pro navázání rapamycinu - pokud v tomto serinovém zbytku dojde k mutaci na nějakou jinou aminokyselinu delší než alanin, tak se výrazně sníží afinita FRB domény k FKBP12-rapamycinovému komplexu (Chen et al., 1995).

1.1.4. Kinázová doména

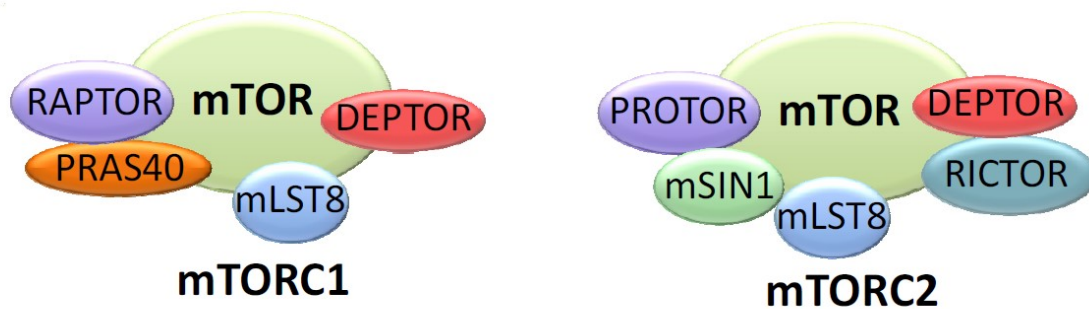
Mezi FRB a FIT doménou se nachází kinázová doména, se kterou interaguje savčí letální protein 8 se SEC13 (mLST8), což je podjednotka mTOR-Raptor komplexu (mTORC1) (viz kapitola 1.2.1) (Kim et al., 2003). Tato doména vykazuje vysokou sekvenční podobnost s kinázovými doménami u ostatních členů rodiny PIKK (Keith a Schreiber, 1995).

1.1.5. FIT doména

FIT (Found In TOR) neboli PRD doména (PIKK-regulatory domain, PIKK regulační doména) je nově identifikovaná struktura nacházející se mezi kinázovou a FATC doménou. Její délka se pohybuje od 16 až po 82 aminokyselin a nalezneme ji u všech členů rodiny PIKK. Na rozdíl od ostatních domén nacházejících se na C-terminálním konci není konzervována (Mordes et al., 2008).

1.2. mTOR komplexy

mTOR funguje jako dva odlišné multiproteinové komplexy – mTOR-Raptor komplex (mTORC1) a mTOR-Rictor komplex (mTORC2).



Obrázek 3: Složení mTORC1 a mTORC2 komplexů (AlQurashi et al., 2013)

1.2.1. mTOR komplex 1

První komplex je složen z mTOR, Raptoru a mLST8 (Mammalian lethal with SEC13 protein 8, savčí letální protein 8 se SEC13). Dále obsahuje dva negativní regulátory, kterými jsou PRAS40 (Proline-rich AKT substrate 40 kDa, 40 kDa prolin bohatý AKT substrát) a DEPTOR (DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein, DEP doména obsahující mTOR interagující protein). mTORC1 je citlivý na rapamycin a má významnou funkci v regulaci buněčného růstu a při proliferaci. Hraje roli i v anabolických procesech, jako je například syntéza lipidů de novo, biosyntéza organel, či proteosyntéza, kterou podporuje pomocí fosforylace S6K1 a 4E-BP1. Do těchto anabolických procesů patří i autofágie, která je regulována inhibicí a stimulací mTORC1 – při inhibici je autofágie započata a při stimulaci je tento proces zase redukován (shrnutí v Laplante a Sabatini, 2009).

Raptor je 150 kDa velký protein, který u eukaryot vykazuje vysoký stupeň konzervovanosti. Obsahuje N-terminální doménu, která má název RNC (Raptor N-terminal conserved). Za touto doménou se nacházejí tři opakování HEAT motivů a poté na C-terminální části následuje sedm opakování WD40 (motiv o délce 40 aminokyselin, často se vyskytuje v Trp-Asp dipeptidu, zkratky W-D). Studie ukazuje, že je Raptor v lidském těle exprimován stejně jako mTOR – nejvyšší exprese jejich mRNA je v kosterních svalech, mozku, ledvinách a placentě (Kim et al., 2002).

Savčí letální protein 8 se SEC13 (mLST8), též známý jako GβL, je přítomný u obou komplexů, v mTORC1 i v mTORC2. Váže se na kinázovou doménu mTOR a funguje jako pozitivní regulátor jeho funkce (Kim et al., 2003). Jeho přesná funkce zatím není zcela prozkoumána, ale bylo zjištěno, že je důležitý pro interakci rictoru s mTOR a pro signalizaci mTORC2 (Guertin et al., 2006).

40 kDa prolin bohatý AKT substrát (PRAS40) je s raptorem interagující protein a patří mezi substráty protein kinázy B/AKT. Funguje jako negativní regulátor mTORC1. Inhibuje buněčný růst, fosforylaci S6K1 a Rheb indukovanou aktivaci mTORC1 dráhy (Kovacina et al., 2003; Sancak et al., 2007).

DEP doména obsahující mTOR interagující protein (DEPTOR) je protein o velikosti 48 kDa, který interaguje s mTOR v C-terminální oblasti. Tato interakce je zprostředkována PDZ doménou DEPTORu. Nachází se v mTORC1 i v mTORC2 a negativně reguluje jejich aktivitu. Pokud DEPTOR není přítomen, vede to k aktivaci S6K1, AKT, SGK1 a kinázové aktivity obou komplexů a podpoře buněčného růstu a přežití (Peterson et al., 2009).

1.2.2. mTOR komplex 2

mTORC2 stejně jako mTORC1 obsahuje mTOR, DEPTOR a mLST8, ale místo Raptoru je zde Rictor (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR, Rapamycin nesenzitivní součást mTOR). Dále obsahuje mSin1 (Mammalian Stress-activated protein kinase-interacting protein 1, Savčí protein 1 interagují se stresem aktivovanou kinázou), Protor (Protein Observed with Rictor, Protein pozorovaný s Rictorem) a PRR5 (Proline-rich Protein, Protein bohatý na prolin). Jeho hlavní funkcí je regulace organizace aktinového cytoskeletu a fosforylace protein kinázy B/AKT na Ser473 (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005b). Původně se myslelo, že mTORC2 je necitlivý na rapamycin, ale zdá se, že chronické podávání rapamycinu ho může inhibovat. (Sarbassov et al., 2006).

Rictor je přibližně 200 kDa velký protein, který se váže na mTOR a není mezi eukaryoty konzervován. Rictor-mTOR komplex reguluje fosforylaci protein kinázy Cα (PKCα), která je zapojena v různých buněčných procesech, jako je například apoptóza, kontrola buněčného cyklu, nebo regulace tvaru buňky (Nakashima, 2002). mTOR společně s rictorem také regulují organizaci aktinového cytoskeletu, kde jako mediátor slouží právě PKCα (Sarbassov et al., 2004).

Savčí protein 1 interagující se stresem aktivovanou kinázou (mSin1) má důležitou úlohu při sestavování mTORC2 a při fosforylaci protein kinázy B/AKT. Jeho struktura obsahuje N-terminální konec, CRIM doménu uprostřed, Ras vázající doménu a PH doménu na C-terminálním konci (shrnuto v Ruan et al., 2019). Je funkčně příbuzný proteinu AVO1, který je u kvasinek součástí TORC2. Lidský Sin1 je ale unikátní, protože alternativní splicing dokáže generovat až 5 odlišných izoform tohoto proteinu (Schroder et al., 2004). Tyto izoformy se liší expresí a lokalizací v tkáních a buňkách. mSin1 α a mSin1 β jsou hlavní izoformy, které tvoří mTORC2. Tyto izoformy jsou delší než mSin1. mSin1 γ nemá PH doménu a nemůže být lokalizován na plazmatické membráně, ale je vyskytuje se u centrozomu a reguluje buněčné dělení. mTORC2 obsahující mSin1 γ je odolný vůči stimulaci inzulinem a má sníženou enzymatickou aktivitu. Další izoforma je mSin1 δ , která postrádá N-terminální konec a její funkce je zatím nejasná (Frias et al., 2006; Yuan et al., 2015).

Protor je přibližně 42 kDa velký protein, který interaguje s Rictorem. Vyskytuje se ve dvou izoformách – Protor 1 a Protor 2. Exprese Protor 1 je regulována pomocí Rictoru. Jeho funkce zatím není známa, jediné co bylo zjištěno je, že nehraje žádnou roli při sestavování ostatních podjednotek mTORC2 do komplexu (Pearce et al., 2007).

PRR5 interaguje s Rictorem, ale nemá žádný vliv na interakci Rictor-mTOR. Rictor je ale důležitý pro jeho stabilizaci či expresi. PRR5 nemá přímý vliv na fosforylaci AKT pomocí mTOR, ale pokud dojde k umlčení PRR5, tak se fosforylace AKT a S6K1 zeslabí, čímž se snižuje míra buněčné proliferace (Woo et al., 2007). Vypadá to, že má kromě role v buněčném růstu i roli v tumorigenezi. Gen, který PRR5 kóduje, je lokalizován v oblasti na chromosomu 22q13, která je deletována ve 20-30 % případech rakoviny tlustého střeva a konečníku a ve 40 % případech u rakoviny prsu (shrnuto v Castells et al., 1999). Zdá se, že PRR5 představuje potenciálního kandidáta na tumor supresorový gen, který by mohl být příčinou těchto rakovin (Johnstone et al., 2005).

2. Oogeneze

Oogeneze je zahájena tím, že se formují primordiální zárodečné buňky (PGCs, Primordial Germ Cells), které se poté mění na oogonie a ty následně na oocyty.

Dva měsíce po oplození vzroste počet zárodečných buněk na 600 000 a za 5 měsíců od oplození dosahuje vrcholu 6 800 000 (Baker, 1964). Při narození se jejich počet sníží, a to na 2 000 000, z čehož polovina podléhá programované buněčné smrti (atresii). U novorozence tedy zbyde kolem 1 000 000 normálních oocytů, ale do věku sedmi let dítěte se jich zachová pouze 300 000 (Baker, 1964; Hsueh et al., 1994). Dříve se předpokládalo, že počet zárodečných buněk při narození je konečný, ale nedávná kontroverzní studie od Johnson et al., 2004 dokazuje existenci zárodečných kmenových buněk i u dospělých samic, tedy že produkce oocytů probíhá i postnatálně. Kolem padesátého roku života dochází u žen k vyčerpání zásoby oocytů a následuje menopauza.

2.1. Vývoj oocytu

Primordiální zárodečné buňky mohou vstoupit do oogeneze i spermatogeneze (Adams and McLaren, 2002), jsou to totiž prekurzory gamet, díky kterým se genetická informace předává do dalších generací (Bendel-Stenzel et al., 1998). Primordiální zárodečné buňky jsou extragonadálního původu (Wassarman, 1999) a za místo jejich vzniku je označován proximální epiblast blízko extraembryonálního ektodermu (Lawson and Hage, 1994). Poprvé mohou být rozpoznány u osmidenního lidského embrya, kde jsou rozptýleny mezi kaudálním koncem primitivního proužku, kořenem alantoidního mezodermu a žloutkovým váčkem (Chiquoine, 1954).

Významnou roli ve specifikaci PGCs a jejich udržování na počátku vývoje hrají kostní morfogenetické proteiny (BMP, Bone Morphogenetic Proteins). Tyto proteiny mají vliv i na vznik PGCs – zdá se totiž, že PGCs vznikají v odpovědi na indukční signalizaci těchto proteinů. Nejdůležitější jsou tři typy – Bmp4, Bmp7 a Bmp8b. Pokud dojde k mutaci v některém z těchto proteinů, může to významně ovlivnit celý vývoj. Například mutace Bmp4 způsobuje nejzávažnější defekt, a to absolutní nepřítomnost PGCs. Mutace Bmp7 a Bmp8b způsobí pouze výrazné snížení populace PGCs (Kee et al., 2006).

PGCs migrují stěnou zadního střeva do dorzálního mesenteria a následně do genitálních lišt, ze kterých se poté vyvíjejí gonády (Fujimoto et al., 1977). Dodnes se diskutuje o tom, zda je

tato migrace způsobena améboidními pohyby, nebo zda jsou PGCs tlačeny kupředu okolní rostoucí tkání (Van Den Hurk et al., 2000). V gonádě se mísí se somatickými buňkami a u samic proliferují a stávají se z nich oogonie (u člověka tato fáze trvá několik měsíců, u myši několik dní) (Bachvarova, 1985). Oogonie následně vstupují do meiózy I a stávají se z nich primární oocyty. V profázi I projdou fázemi leptotene, zygotene, pachytene a následně jsou v diplotene zablokovány až do doby, než dojde k obnovení meiózy (Vanderhyden, 2002).

2.2. Folikulogeneze

Oocyty zablokované v profázi I jsou obklopeny vrstvou plochých buněk a tvoří útvar, který se dohromady nazývá primordiální folikul. Při narození je tedy v samičích vaječnicích vytvořena zásoba těchto primordiálních folikulů. Některé z nich dojdou až do stádia ovulace a budou schopny oplození, ale některé budou degradovány a podlehnou atresii. Ty, které degradovány nebudou se dostanou z této zásobárny. Tyto oocyty poté začnou růst a buňky, které je obklopují (teď už nazývané granulózní) se přemění z plochých na kubické, čímž vznikne primární (preantrální) folikul. Mezi oocytem a granulózními buňkami jsou speciální interakce, které zajišťují jejich správný vývoj a funkci. Po čase je primární folikul obklopen více vrstvami granulózních buněk až se z něj stane folikul sekundární (antrální), který již obsahuje plně dorostlý oocyt (shrnutí v Tukur et al., 2020).

Při přechodu z primárního (preantrálního) folikulu do sekundárního (antrálního) získává oocyt schopnost znovu zahájit meiózu (Sorensen and Wassarman, 1976).

2.3. Meiotické zrání oocytu

Meiotické zrání oocytu je důležité k tomu, aby byly oocyty schopny oplození. Meiotické zrání můžeme rozdělit na jaderné, epigenetické a cytoplazmatické zrání.

Jaderné zrání zahrnuje obnovení meiózy, dokončení prvního meiotického dělení a posun do metafáze druhého meiotického dělení. Oocyty, které jsou zablokovány v profázi I, mají jadernou membránu a jejich jádro se nazývá zárodečný váček (GV, Germinal Vesicle). Proto se tomuto stádiu přezdívá stádium GV. K obnovení meiózy v plně dorostlých oocytech dochází díky preovulační vlně luteinizačního hormonu (LH). Jaderné zrání začíná rozpadem zárodečného váčku/ rozpadem jaderné membrány (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown / NEBD, Nuclear Envelope Breakdown), které je následováno kondenzací chromatinu a formováním chromozomů. Poté je polovina chromozomů vydělena do prvního pólového

tělíska, čímž vzniká haploidní genom. Dále vzniká druhé meiotické vřeténko a oocyty vstupují do metafáze II, kde jsou zablokovány až do oplození spermií (Eppig et al., 2004).

Během růstu oocyty nastává epigenetické zrání, které ústí v genomické modifikace v genové expresi. Jsou to stabilní a dědičné chromatinové modifikace, které regulují genovou expresi bez toho, aniž by došlo ke změně sekvence DNA. V oogenezi tyto modifikace slouží například k regulaci imprintingu, ale i k regulaci genové exprese během zrání (Eppig et al., 2004).

Cytoplazmatické zrání označuje procesy, které probíhají v cytoplazmě při vývoji oocyty a jsou důležité pro oplození a časný embryonální vývoj. Toto zrání zahrnuje velké změny ve struktuře, například přeskupení buněčných organel, nebo akumulaci mRNA, proteinů a substrátů, které jsou potřebné pro oplození a časnou embryogenezi předtím, než dojde k aktivaci embryonálního genomu (Watson, 2007). Jaderné a cytoplazmatické zrání jsou dva zcela odlišné procesy, ale jsou na sobě plně závislé. Probíhají současně a jsou vzájemně propojené. Všechny procesy cytoplazmatického zrání přispívají k tomu, aby bylo jaderné zrání úspěšné a aby byly oocyty nakonec schopné oplození (Tukur et al., 2020).

Meióza je regulována několika faktory, například M-fázi podporujícím faktorem (MPF, M-phase promoting Factor), cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP, Cyclic Adenosine Monophosphate), nebo mitogenem aktivovanou protein kinázou (MAPK, Mitogen-activated Protein Kinase).

2.3.1. M-fázi podporující faktor (MPF)

M-fázi podporující faktor, též známý jako mitózu podporující faktor (Mitosis promoting factor), nebo jako maturaci podporující faktor (Maturation promoting factor) se skládá z cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) a z cyklinu. MPF je zodpovědný za obnovení a postup meiózy (Murray, 1995). CDK1 je serin-threoninová kináza, která se dokáže vázat na různé cykliny. Jejím klíčovým aktivátorem je cyklin B1 (CCNB1, CYB). Syntéza cyklinu B1 je nejvyšší na konci MI, ale v anafázi I dochází k jeho degradaci pomocí ubiquitin-dependentní dráhy (Hampl and Eppig, 1995; Karabinova et al., 2011). Kromě vazby s cyklinem B1 je k aktivaci CDK1 dále potřebná defosforylace na Thr14 a Tyr15 a fosforylace na Thr161 (Krek a Nigg, 1991; Solomon et al., 1990). Defosforylace je zprostředkována fosfatázou CDC25 (Coleman a Dunphy, 1994). CDK1 reguluje meiózu pomocí své aktivity, která v rámci cyklu osciluje. CDK1 je aktivována krátce před obnovením meiózy a jak lze vidět na obrázku č. 5, její aktivita

dosahuje maxima v MI, poté se sníží při přechodu z MI do MII a následně znovu stoupá v MII (shrnutí v Eppig et al., 2004).

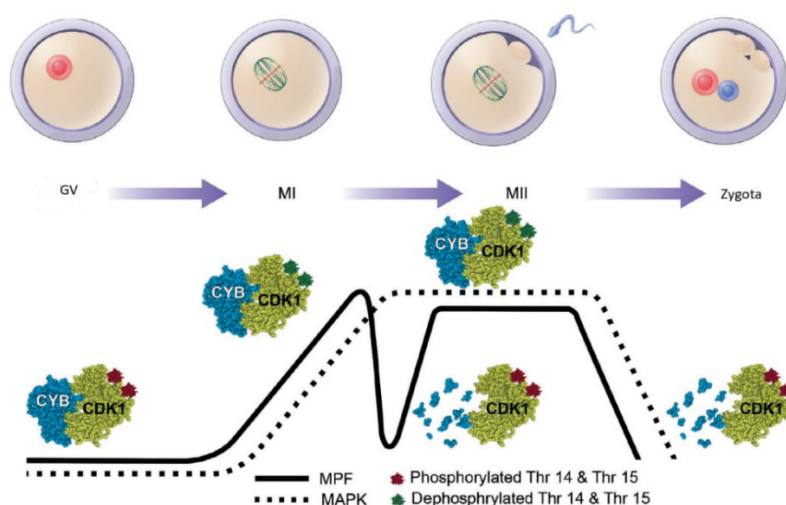
MPF může být regulován i prostřednictvím protein kinázy B/AKT, která je součástí PI3K dráhy (viz kapitola 4.1.). Tato dráha přispívá k expresi cyklinu B1, díky kterému může být následně aktivována CDK1 (Kalous et al., 2006).

2.3.2. Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) se podílí na regulaci vstupu oocyty do meiózy. Jeho koncentrace je regulována gonadotropiny, mezi které patří folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) (Schultz et al., 1983). Pokud je v oocytech zvýšená hladina cAMP společně s protein kinázou A (PKA), tak jsou oocyty zablokovány ve stádiu GV – v profázi I (Tsafiriri et al., 1996). Oocyty jsou zablokovány až do té doby, než dojde k degradaci cAMP pomocí fosfodiesterázy typu IIIA (PDE3A), což vede ke snížení hladiny PKA (Conti et al., 2002).

2.3.3. Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK)

Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) je společně s MOS proteinem a kinázou aktivované protein kinázy (MAPKK/MEK1) součástí cytotatického faktoru (CSF). CSF je zodpovědný za zablokování oocytů v MII. MAPK je aktivována až po aktivaci CDK1 a obnovení meiózy. Její aktivita roste během zrání oocytů a následně zůstává konstatní i při přechodu z MI do MII (viz obrázek č. 5) (Verlhac et al., 1996).



Obrázek 4: Klíčové kroky při jaderné maturaci oocytů a diagram aktivity MPF (plná čára) a MAPK (přerušovaná čára) (Viveiros a De La Fuente, 2019)

2.4. Funkce mTOR v oogenezi

Lokalizace mTOR se během meiotického zrání oocytů mění – ve stádiu GV se nachází v jádře, při rozpadu jaderné membrány je lokalizován kolem chromozomů a během MII fáze je lokalizován na meiotickém vřeténku. Tato proměnlivá lokalizace poukazuje na to, že je mTOR svou funkcí zapojen v meiotickém zrání oocytů (Kogasaka et al., 2013).

mTOR má také funkci při migraci vřeténka a asymetrickém dělení (vydělení prvního pólového tělíska) během meiotického zrání oocyty. Při použití rapamycinu (inhibitoru mTOR) došlo k inhibici mTORC1-zprostředkovaných drah S6K1 a 4E-BP1. Tyto dráhy jsou důležité k tomu, aby mohl mTORC2 zprostředkovat expresi mRNA malých GTPáz (RhoA, Cdc42 a Rac1). Tyto malé GTPázy jsou důležité při buněčné motilitě, při reorganizaci cytoskeletu a především v oocyty zajišťují migraci vřeténka a asymetrické dělení oocyty (Lee et al., 2012).

Zdá se, že oba komplexy mTOR mají v oogenezi odlišné funkce. mTORC1 je zřejmě zapojen do fungování vřeténka jak při mitóze, tak i během meiotického zrání. mTORC1 je totiž silně exprimován na pólech vřeténka i na midbody, a to jak v oocytech, tak v kumulárních buňkách. Naopak mTORC2, který má funkci při organizaci aktinového cytoskeletu, je zřejmě zapojen do migrace vřeténka během meiotického zrání (Kogasaka et al., 2013).

3. Regulace translace pomocí mTOR

3.1. Translace

Regulace translace mRNA je klíčová při regulaci genové exprese během oogeneze a rané embryogeneze. U eukaryot probíhá nejčastěji translace způsobem závislým na čepičkové struktuře (cap-dependentní způsob) (Mamane et al., 2006). Translaci můžeme rozdělit na 3 fáze – iniciace, elongace a terminace. Nejvíce mechanismů, které regulují translaci se nachází právě v iniciaci (Mamane et al., 2006). Iniciace translace jsou zjednodušeně reakce zahrnující iniciační faktory, které vedou k nalezení iniciačního kodonu (start kodonu) a sestavení 80S iniciačního komplexu, který následně vstupuje do elongace.

Iniciace translace je započata navázáním ternárního komplexu, který se skládá z eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2, Eucaryotic Initiation Factor 2), GTP a methylované methionyl-tRNA, na malou ribozomální podjednotku (40S). Dohromady poté tvoří 43S pre-iniciační komplex (43S PIC, 43S Pre-Initiation Complex). Tento komplex dokáže rozpoznat 7-methylguanidinovou čepičkovou strukturu, nacházející se na 5' konci mRNA. Rozpoznání je možné díky eukaryotickému iniciačnímu faktoru 4F (eIF4F). Po navázání mRNA na 43S pre-iniciační komplex je mRNA skenována ve směru od 5' ke 3' konci, dokud nenarazí na start kodon (většinou AUG). Poté, co je tento správný kodon rozpoznán, je vytvořen 48S pre-iniciační komplex a dochází k uvolnění iniciačních faktorů, které by bránily navázání velké ribozomální podjednotky (60S). Po navázání velké ribozomální podjednotky (60S) na 48S pre-iniciační komplex vzniká 80S iniciační komplex, který pokračuje do elongace (Jackson et al., 2010).

Eukaryotický iniciační faktor 4F (eIF4F) se skládá ze tří podjednotek – eIF4E, eIF4A a eIF4G. Každá tato podjednotka má při iniciaci translace svou funkci. eIF4E dokáže rozpoznat 7-methylguanidinovou čepičku, eIF4A má RNA helikázovou aktivitu a rozplétá sekundární strukturu v 5' nepřekládané oblasti mRNA (UTR, Untranslated region) a eIF4G funguje jako scaffold protein pro eIF4F a společně s eukaryotickým iniciačním faktorem 3 (eIF3, Eukaryotic initiation factor 3) rekrutuje malou ribozomální podjednotku (40S) na mRNA (Mader et al., 1995).

Základním krokem při regulaci iniciace translace je tvorba eIF4F, která závisí na dostupnosti eIF4E vázajícího se na čepičkovou strukturu mRNA. Dostupnost eIF4E je regulována na několika úrovních – expresí, fosforylací a translačními represory (Sonenberg a

Gingras, 1998). Pro téma této práce jsou nejdůležitější právě tyto translační represory, do kterých patří eIF4E vázající proteiny (4E-PBs, eIF4E Binding Proteins).

3.1.1. 4E vázající protein (4E-BP)

U savců byly identifikovány tři tyto proteiny – 4E-BP1 (také znám jako PHAS-I), 4E-BP2 a 4E-BP3 (Poulin et al., 1998). Ale pouze 4E-BP1 je přítomen jako protein v oocytu (Jansova et al., 2017).

Existují tři izoformy 4E-BP1 – α , β a γ . První izoforma α se pohybuje nejrychleji ze všech uvedených izoform a vykazuje největší afinitu k eIF4E. Další izoformou je β , která je hypofosforylovaná a pohybuje se pomaleji a má i nižší afinitu k eIF4E než izoforma α . Poslední je izoforma γ , která se pohybuje ze všech nejpomaleji a na eIF4E se neváže vůbec (Bhandari et al., 2001).

Aktivita těchto proteinů je regulována pomocí fosforylace. Pokud jsou hypofosforylované, tak s eIF4E silně interagují a blokují vazebné místo pro eIF4G, čímž brání sestavení komplexu eIF4F a dochází tak k inhibici translace. Naopak pokud jsou hyperfosforylované, tak dochází k jejich uvolnění z eIF4E a tím se iniciuje translace specifické mRNA (Gingras et al., 1999; Mader et al., 1995). Tato fosforylace 4E-BPs je zprostředkována pomocí mTORC1. Dříve se myslelo, že fosforylace probíhá hierarchicky – nejdříve na Thr37 a Thr46, poté na Thr70 a nakonec na Ser65 (Gingras et al., 2001), ale podle nedávných studií se usuzuje, že by tato posloupnost mohla být spíše tkáňově specifická (Ayuso et al., 2010). Insulin patří mezi pozitivní regulátory iniciace translace a to díky tomu, že zvyšuje fosforylaci 4E-BP1 (Bhandari et al., 2001).

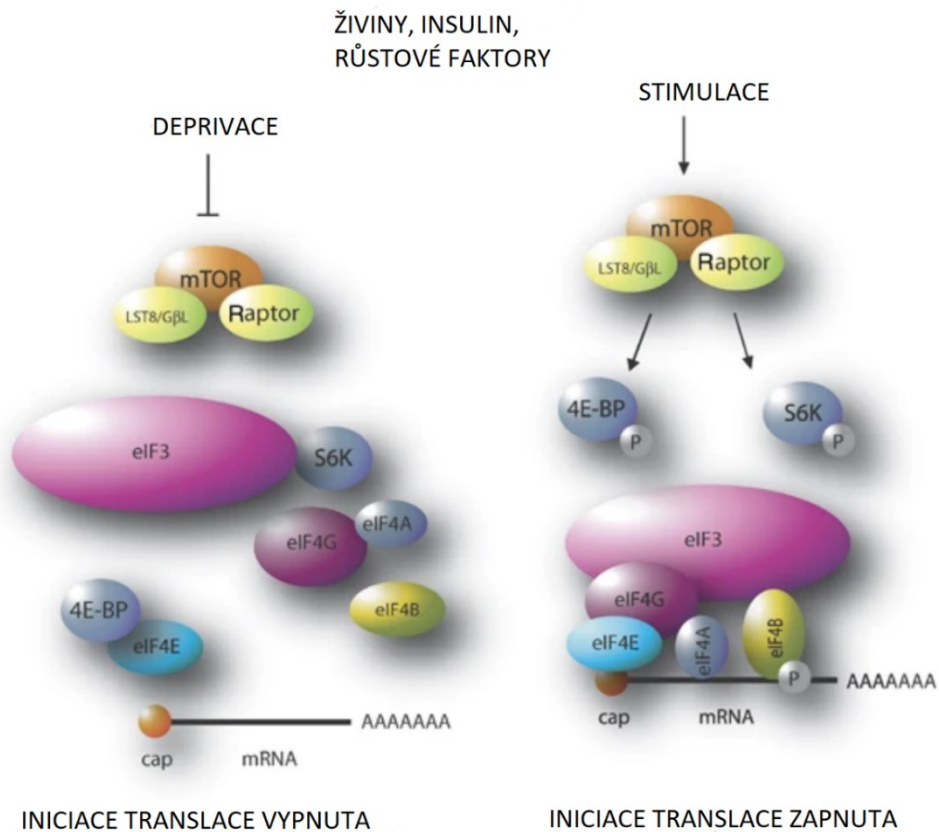
3.1.2. S6 kináza (S6K)

Mezi další významné regulátory translace patří S6 kináza (S6K). Je to serin-threoninová kináza, která patří do rodiny AGC kináz (Manning et al., 2002). Savčí buňky obsahují dvě S6 kinázy – S6 kinázu 1 (S6K1) a S6 kinázu 2 (S6K2), které jsou kódovány odlišnými geny (Shima, 1998). Pokud není S6 kináza stimulována růstovými faktory, či živinami, tak je asociována s eukaryotickým iniciačním faktorem 3 (eIF3) (Peterson a Sabatini, 2005).

Aby mohla být S6 kináza aktivována, musí být fosforylována. Mezi nejdůležitější fosforylační místa patří Thr229 a Thr389. Fosforylace Thr389 je zprostředkována mTORC1 (Kim et al., 2002). Tato fosforylace vytvoří kotvící místo pro PDK1 (Phosphoinositide-

dependent kinase 1, Fosfoinositid-dependentní kináza 1), která následně fosforyluje S6K na Thr229 (Alessi et al., 1998; Frödin et al., 2002). Takto aktivovaná S6 kináza poté fosforyluje další substráty. Mezi tyto substráty patří například eukaryotický iniciační faktor 4B (eIF4B), který když je aktivovaný, stimuluje helikázovou aktivitu eIF4A (Rozen et al., 1990). S6 kináza fosforyluje eIF4B na Ser422, což vede k jeho aktivaci (Raught et al., 2004). Díky tomu, že jeho aktivovaná forma stimuluje helikázovou aktivitu eIF4A, tak je stimulována celková aktivita eIF4F, což vede k pozitivní regulaci iniciace translace.

S6 kináza také fosforyluje ribozomální S6 protein, součást malé ribozomální podjednotky (40S). Fosforyluje ho na čtyřech zbytcích – Ser235, Ser236, Ser240 a Ser244 (Ferrari et al., 1991). Tato fosforylace vede ke zvýšení rekrutace malé ribozomální podjednotky (40S) na mRNA a tudíž opět k pozitivní regulaci iniciace translace (Roux et al., 2007).



Obrázek 5: Aktivace iniciace translace pomocí mTOR (Mamane et al., 2006)

mTOR fosforyluje dva hlavní substráty, kterými jsou 4E-BP a S6K. Fosforylace 4E-BP vede k jeho uvolnění z eIF4E a fosforylace S6K zase k jejímu uvolnění z eIF3. Takto fosforylovaná a aktivovaná S6K dále fosforyluje eIF4B a ribozomální S6 protein. Všechny tyto procesy vedou k aktivaci iniciace translace.

4. Regulace mTOR

Dráha mTOR může být regulována různými faktory – například přítomností aminokyselin, živin, růstových faktorů nebo stresem. Tyto faktory poté ovlivňují proteiny, které jsou součástí mTOR dráhy.

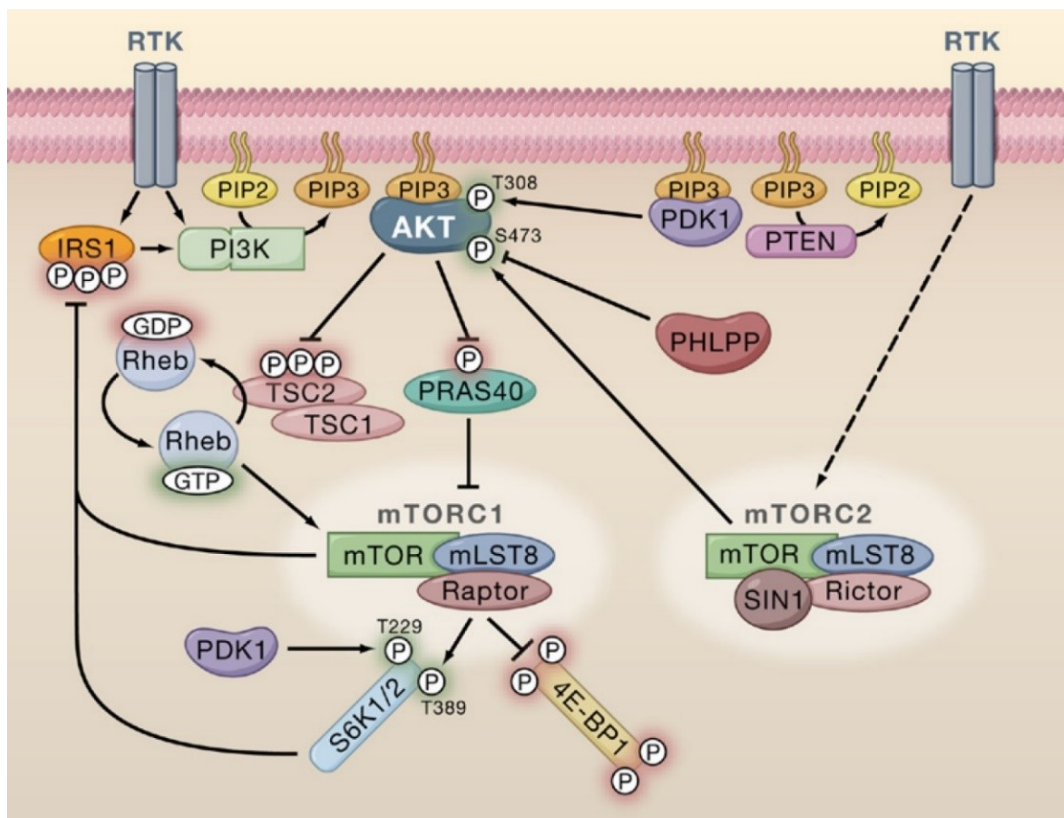
4.1. Protein kináza B (AKT)

Protein kináza B (AKT) je zapojena v mnoha buněčných procesech, jako je regulace metabolismu, buněčné přežití, růst buňky, regulace transkripce a apoptóza (shrnutí v Brazil and Hemmings, 2001). Je to serin-threoninová kináza, která patří společně s protein kinázou A (PAK), protein kinázou G (PKG) a protein kinázou C (PKC) do AGC kinázové rodiny. U savců můžeme nalézt tři izoformy protein kinázy B – PKB α /AKT1, PKB β /AKT2 a PKB γ /AKT3, které se liší expresí v jednotlivých částech těla. PKB α /AKT1 je exprimována v mnoha tkáních lidského těla a je zapojena především v buněčném přežití a růstu, PKB β /AKT2 je exprimována ve svalech a adipocytech a PKB γ /AKT3 ve varlatech a mozku (shrnutí v Hers et al., 2011).

Každá z izoform je kódována odlišnými geny, ale sdílejí mezi sebou konzervovanou strukturu. Na jejich N-terminálním konci se nachází Pleckstrin homologická doména (PH) o délce 100 aminokyselin (Rebecchi and Scarlata, 1998), v centru molekuly je kinázová doména a na C-terminálním konci je doména regulační (Song et al., 2005). Katalytická doména sdílí vysoký stupeň podobnosti s ostatními členy AGC kinázové rodiny a u PKB α /AKT1 se zde nachází aminokyselinový zbytek Thr308 (Alessi et al., 1996; Peterson and Schreiber, 1999). Regulační doména obsahuje hydrofobní motiv, který je charakteristický pro všechny AGC kinázy (Alessi et al., 1996). Pleckstrin homologická doména získala svůj název díky objevení u Pleckstrinu, což je hlavní fosforylační substrát PKC u krevních destiček (Tyers et al., 1988). PH doména je schopna vázat fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfát (PIP3) a fosfatidylinositol (4,5)-bifosfát (PIP2) (Frech et al., 1997; James et al., 1996), díky čemuž hraje roli při aktivaci PKB/AKT, pro kterou je potřeba aby PKB/AKT byla rekrutována na plazmatickou membránu, což probíhá přes navázání na PIP3 (Andjelković et al., 1997). PH doména také zprostředkovává protein-protein interakce, což umožňuje následné sestavení proteinových komplexů PKB/AKT (Datta et al., 1995).

K aktivaci PKB/AKT je potřeba aktivovaný receptor Tyrosin kinázy (RTKs), který následně aktivuje třídu I fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K). PI3K poté fosforyluje PIP2 a tím

generuje PIP3, který jak už bylo zmíněno výše, je společně s PH doménou zodpovědný za translokaci PKB/AKT na plazmatickou membránu, kde dochází k fosforylaci dvou klíčových aminokyselinových zbytků. Prvním z nich je Thr308, který se nachází v aktivační smyčce v katalytické doméně PKB/AKT, a jeho fosforylace je zprostředkována PDK1 (Alessi et al., 1996; Andjelković et al., 1997). Druhým klíčovým zbytkem je Ser473 nacházející se v hydrofobním motivu regulační domény. Dlouho nebylo jasné, čím je tento zbytek fosforylován a až nedávná studie odhalila, že to má na svědomí mTORC2 (Hresko and Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005b). PKB/AKT je schopna provést autofosforylaci Ser473, ale pouze za určitých podmínek (Toker a Newton, 2000). K plné aktivaci PKB/AKT je zapotřebí, aby byly oba zbytky fosforylovány najednou. Pokud dojde pouze k fosforylaci Thr308, tak PKB/AKT funguje jen částečně a fosforylace samotného Ser473 nemá na aktivitu téměř žádný vliv (Alessi et al., 1996). Negativním regulátorem této PI3K/AKT dráhy je PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten), který defosforyluje PIP3 (Simpson and Parsons, 2001).



Obrázek 6: Schéma aktivace PKB/AKT a dalších cílů této dráhy, které ovlivňuje (Manning a Cantley, 2007)

4.1.1. Komplex tuberózní sklerózy (TSC)

TSC1 (Tuberous Sclerosis 1), který kóduje protein Hamartin, a TSC2 (Tuberous Sclerosis 2), který kóduje protein Tuberin, jsou tumor supresorové geny a dokáží v savčích buňkách tvořit komplex TSC1-TSC2, který funguje jako negativní regulátor mTORC1 (Van Slegtenhorst et al., 1998). TSC1 a TSC2 se podílejí na kontrole buněčného cyklu, endocytóze, transkripci a buněčné adhezi (shrnuto v Gao a Pan, 2001). Pokud dojde k mutaci v jednom z těchto genů, vede to k dědičnému onemocnění nazývanému tuberózní skleróza, která se projevuje četnými benigními nádory v různých orgánech (Young a Povey, 1998).

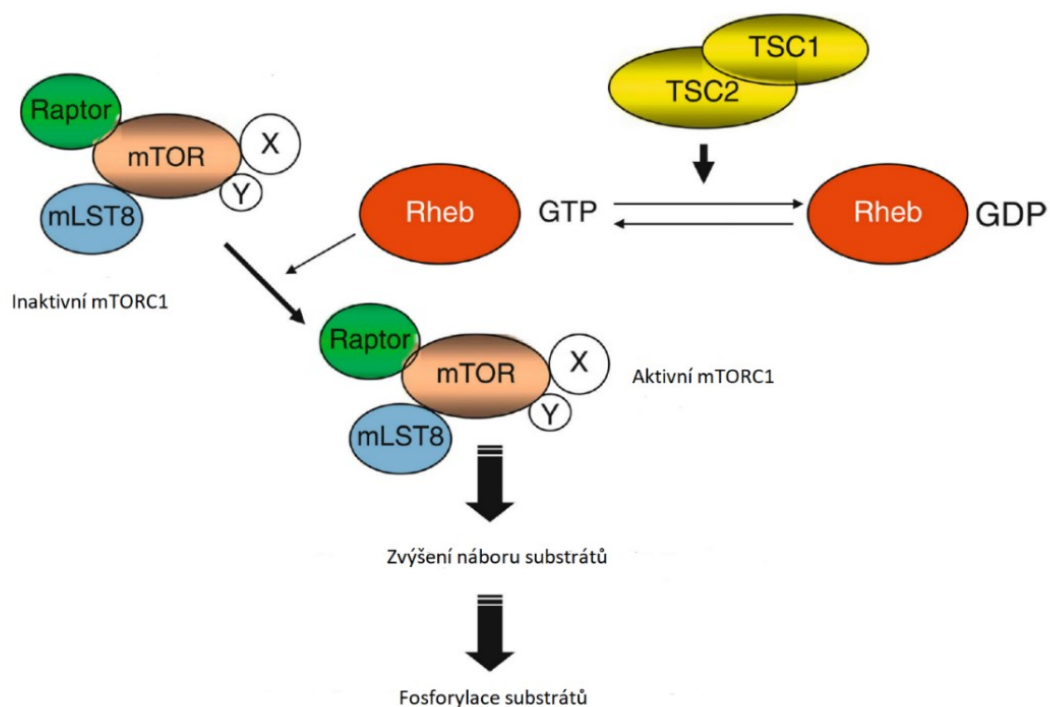
PKB/AKT reguluje aktivitu mTORC1 právě přes fosforylaci TSC2 v rámci komplexu TSC1-TSC2. Tato fosforylace pomocí PKB/AKT má za následek disociaci komplexu TSC1-TSC2. Jelikož je interakce mezi TSC1 a TSC2 důležitá pro stabilitu a funkci obou proteinů, vede tato disociace k inhibici komplexu a tím k následné aktivaci mTORC1 (Inoki et al., 2002; Krymskaya, 2003).

TSC2 může být ještě fosforylován pomocí AMPK (AMP-activated protein kinase, AMP aktivovaná proteinkináza) na Ser1345. Tato fosforylace podněcuje GAP (GTPase activating protein, protein aktivující GTPázu) aktivitu TSC2 a tím inhibuje mTORC1 (viz kapitola 4.1.2.) (Inoki et al., 2003).

4.1.2. Obohacený Ras homolog v mozku (Rheb)

Rheb (Ras homolog enriched in brain, Obohacený Ras homolog v mozku) je vysoce konzervovaný protein, který je součástí RAS rodiny malých GTPáz (Reuther a Der, 2000). Rheb dokáže vázat GTP i GDP, kdy forma s navázaným GTP funguje jako aktivátor mTORC1. Ale TSC2 v rámci komplexu TSC1-TSC2 obsahuje na svém C-terminálním konci GAP (GTPase activating protein, protein aktivující GTPázu) doménu, která stimuluje GTPázovou aktivitu Rheb, který poté vyměňuje vazbu s GTP za vazbu s GDP, čímž se stává inaktivním a dochází tak k inhibici mTORC1 (Scrima et al., 2008).

Na Rheb se také může vázat glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH), která při nízké hladině glukózy brání Rheb, aby se navázal na mTORC1, čímž dojde k inhibici samotného mTORC1 (Lee et al., 2009).



Obrázek 7: Schéma aktivace mTORC1 pomocí Rheb (převzato z Parmar a Tamanoi, 2010, upraveno)

4.1.3. 40 kDa prolin bohatý AKT substrát (PRAS40)

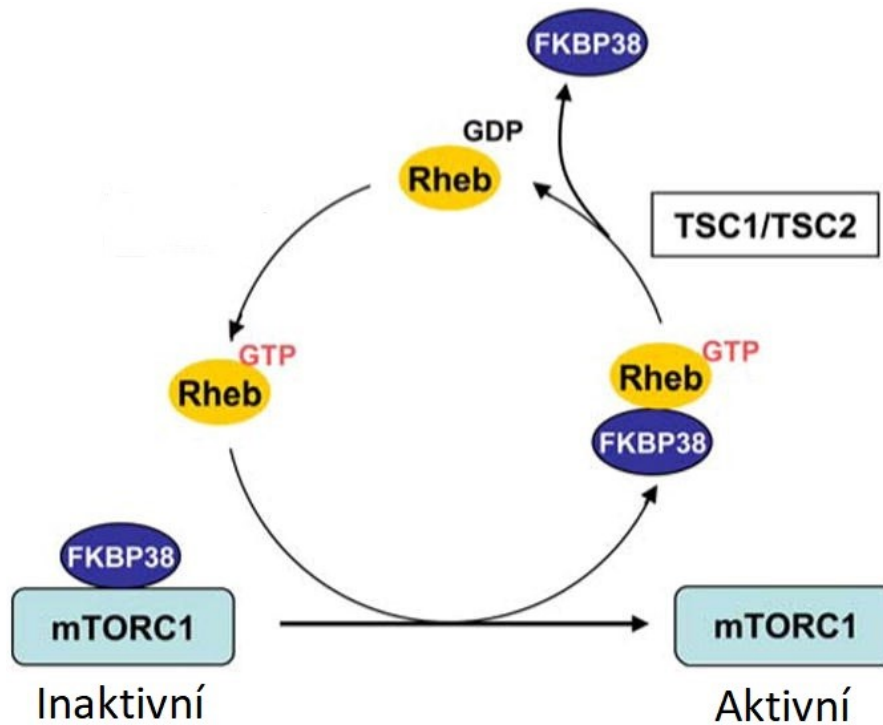
Jak již bylo zmíněno výše, PRAS40 je součástí mTORC1 a interaguje s raptorem (viz kapitola 1.2.1.). Tato interakce je umožněna tím, že PRAS40 obsahuje TOS motiv (Fonseca et al., 2007). Po navázání PRAS40 na raptor dojde k inhibici kinázové aktivity mTOR.

PKB/AKT fosforyluje PRAS40 na Thr246 zbytku, což umožňuje jeho vazbu na 14-3-3 proteiny. Tato vazba následně oslabuje interakci mezi PRAS40 a mTORC1 a díky tomu dojde k aktivaci mTOR (Kovacina et al., 2003).

4.2. FK-506 vázající protein 38 (FKBP38)

FKBP38 (FK-506 Binding Protein 38, FK-506 vázající protein 38), též známý jako FKBP8, je peptidyl-prolyl cis/trans izomeráza (PPIáza), která patří do rodiny FK506-vázajících proteinů (FKBP) (Fischer, 1994). Na svém N-terminálním konci má PPIázovou doménu (také známá jako FKBP-C doména), uprostřed molekuly se nachází tetra-trykopeptidový motiv (TRP), který se vyskytuje u všech členů FKBP rodiny a zřejmě zajišťuje protein-protein interakce, a na C-terminálním konci se zřejmě nachází motiv vázající kalmomodulin (CaM binding motif) (Edlich et al., 2005).

FKBP38 se přímo váže na mTOR přes FKBP-C doménu a tím způsobuje inhibici mTORC1. FKBP38 dokáže interagovat pouze s mTORC1, nikoliv s mTORC2. Tato vazba je regulována proteinem Rheb, jehož forma s navázaným GTP se váže do FKBP-C domény FKBP38. Po navázání Rheb nemůže FKBP38 interagovat s mTOR, tudíž je mTORC1 aktivní (Bai et al., 2007).



Obrázek 8: Schéma regulace mTOR pomocí FKBP38 a následné regulace FKBP38 pomocí proteinu Rheb (převzato z Bai a Jiang, 2016, upraveno)

4.3. S6 kináza 1 (S6K1)

Jedna z izoform S6 kinázy, S6 kináza 1, hraje roli nejen při regulaci iniciace translace, ale může fungovat také jako inhibitor mTORC1 dráhy. Je to díky tomu, že funguje jako její negativní zpětnovazebná smyčka přes regulaci aktivity mTORC2. Aktivovaný mTORC2 fosforyluje AKT na Ser473 a tím ji aktivuje (Sarbasov et al., 2005b). Pro tuto fosforylaci jsou nezbytné dvě komponenty mTORC2 – mSin1 a Rictor (Yang et al., 2006). S6K1 dokáže fosforylovat mSin1 na Thr86 a Thr389, čímž dojde k disociaci mSin1 z mTORC2. Tato disociace způsobí, že poklesne celková aktivita mTORC2 (Liu et al., 2013). Dalším způsobem, jak dokáže S6K1 regulovat aktivitu mTORC2, je pomocí Rictoru. Fosforyluje ho na Thr1135, což vede k inhibici aktivace AKT (Julien et al., 2010).

5. Role mTOR v jiných drahách

mTOR je zapojen v regulaci mnoha buněčných procesů, jako je například regulace buněčného cyklu, proliferace, buněčné přežití, nebo proteosyntéza, proto není překvapující, že je jednou z příčin rakoviny a dalších lidských onemocnění. Rakovinné buňky jsou charakteristické tím, že nekontrolovaně rostou a proliferují, aniž by přijímaly signál podporující růst. Je to částečně způsobeno deregulací mTOR, tedy jeho zvýšenou aktivitou.

K deregulaci mTOR dochází díky mutacím v drahách, které vedou k jeho aktivaci. Je to například mutace v dráze PI3K, která je příčinou širokého spektra rakovin. Dráha je deregulována různými mechanismy, jako je například inhibice negativního regulátoru PTEN, či přímá mutace nebo amplifikace PI3K. Inhibice PTEN se vyskytuje například u rakoviny mozku, prsu, nebo prostaty. Amplifikace PI3K je častá u rakoviny prsu, rakoviny tlustého střeva, žaludku, děložního čípku nebo u rakoviny plic (shrnutí v Yang et al., 2019).

Další možností jsou mutace tumor supresorových genů TSC1 a TSC2 v rámci komplexu TSC1-TSC2, který patří mezi negativní regulátory mTOR. Tyto mutace způsobují dvě onemocnění – Tuberózní sklerózu (TSC) a Lymfangioleiomyomatózu (LAM). Tuberózní skleróza je charakteristická benigními nádory, které rostou pomalu a mohou se vyskytovat ve všech částech těla. Pokud se ale vyskytují v mozku, mohou způsobovat záchvaty, mentální retardaci a smrt (Sarbasov et al., 2005a). Lymfangioleiomyomatóza je vzácné onemocnění, které postihuje spíše ženy, a při kterém dochází k narušení funkce plic v důsledku abnormální proliferace buněk hladké svaloviny (LAM buněk) v plicích (shrnutí v Trámov a Yurin, 2001).

Jiným negativním regulátorem mTOR zapojeným v rakovině je p53. Je to tumor supresorový gen, který slouží jako hlavní regulátor buněčné odpovědi na vnější i vnitřní stres. Gen p53 je nejčastěji mutovaný gen v lidské rakovině – vyskytuje se u více než 50 % případů (Hollstein et al., 1991).

Další příčinou rakoviny je inaktivace LKB1 (Liver kinase B1, B1 kináza v játrech,), též známá jako STK11 (Serin-Threonin kinase 11, Serin-threoninová kináza 11), což je další negativní regulátor mTORC1. Inaktivace této kinázy způsobuje Peutzův-Jeghersův syndrom, který se projevuje melaninovými pigmentacemi v oblasti kolem úst a polypy v tlustém střevě. Kvůli těmto polypům jsou poté pacienti náchylnější k vyššímu výskytu kolorektálního karcinomu (rakovina tlustého střeva a konečníku) (Jenne et al., 1998).

Deregulace mTORC1 se vyskytuje i v mnohých dalších poruchách, jako je například hypertrofie, diabetes typu II, obezita, epilepsie nebo Alzheimerova choroba (shrnutí v Zhou a Huang, 2010).

mTOR může ovlivňovat i ženskou plodnost. Je exprimován ve všech vývojových stádiích oocyty, ale jeho funkce se v rámci vývoje mění. Ve studii, kterou provedl Guo et al., byla provedena delece mTOR pomocí kondicionálního knockoutu ve dvou stádiích vývoje oocyty – v oocyty primordiálního folikulu a v rostoucím oocyty. V obou případech vedla delece mTOR k ovlivnění kvality oocytů, osudu granulóznic buněk a vývoje oocytů. Delece mTOR v oocyttech v primordiálním folikulu vedla také ke snížení ovulace, naopak u rostoucích oocytů nebyla ovulace ovlivněna takřka vůbec. Ve všech případech došlo k tomu, že oocytty sice byly schopné vydělit první pólové tělíčko, ale nedokončily první meiotické dělení. Část z nich měla také abnormálně zformované MII vřeténko. Všechny tyto odchylky způsobené delecí mTOR vedou k neplodnosti (Guo et al., 2018).

Kromě již výše zmíněných poruch a onemocnění je mTOR důležitý i při nástupu puberty. mTOR je silně exprimován i v hypotalamu (Cota et al., 2006) a pokud dojde k potlačení této signalizace, může to negativně ovlivnit nástup puberty. Ve studii, kterou provedli Roa et al., 2009 bylo zjištěno, že pokud je mTOR v mozku inhibován intracerebroventrikulárním podáváním rapamycinu, dochází u potkanů k potlačení nástupu puberty. To se projevuje sníženou hladinou luteinizačního hormonu (LH) a estradiolu a atrofií (zmenšením) vaječnic a dělohy. U lidí zatím nejsou podobné účinky zdokumentovány, jelikož při klinických testech byl rapamycin podáván orálně (Zhang et al., 2014). Takto podávaný rapamycin zřejmě nedokáže ovlivnit mTOR signalizaci v mozku (Sparagana et al., 2017).

Závěr

Zapojení dráhy mTOR v buněčných procesech a její regulace je velmi široké téma, které je ale velmi důležité. Díky tomu, že je mTOR zapojen v oogenezi, meiotickém zrání nebo translaci je identifikace jeho regulátorů velmi potřebná. Mezi zatím popsané regulátory patří protein kináza B/Akt a s ní související PRAS40, Rheb a TSC1-TSC2 komplex. Dále to je FKBP38 a S6K. Další výzkumy by se mohly věnovat identifikaci dalších regulátorů.

mTOR je důležitý také z pohledu jeho účasti v lidských onemocněních. Díky tomu, že ve většině onemocnění hraje roli zvýšená aktivita mTOR dráhy, tak její inhibice představuje jednu z možností léčby. Nejznámějším inhibitorem mTOR je rapamycin a jeho deriváty – temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) a deforolimus (AP23573). Tyto inhibitory ale v klinických testech nevykazují požadované výsledky. Dalšími nadějnými léky jsou inhibitory, které působí na mTOR i na PI3K dráhu současně. Tyto inhibitory vykazují dobré výsledky právě u akutní myeloidní leukémie i u akutní lymfoblastické leukémie. Ale nejslibnějšími léky jsou inhibitory PP242 a Torin-1, které dosahují zatím nejlepších výsledků.

Seznam použité literatury

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou *

- Adams, I.R., McLaren, A., 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: Switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155–1164.
- Alessi, D., Kozlowski, M.T., Weng, Q.P., Morrice, N., Avruch, J., 1998. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70037-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70037-5)
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541–6551. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x>
- AlQurashi, N., Hashimi, S.M., Wei, M.Q., 2013. Chemical inhibitors and microRNAs (miRNA) targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Potential for novel anticancer therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3874–3900. <https://doi.org/10.3390/ijms14023874>
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., Hemmings, B.A., 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–31524. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31515>
- Andrade, M.A., Bork, P., 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* <https://doi.org/10.1038/ng1095-115>
- Ayuso, M.I., Hernández-Jiménez, M., Martín, M.E., Salinas, M., Alcázar, A., 2010. New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. *J. Biol. Chem.* 285, 34355–34363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.135103>
- Bachvarova, R., 1985. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev. Biol. (N. Y. 1985)* 1, 453–524. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813209-8.00013-3>
- Bai, X., Jiang, Y., 2016. Key factors in mTOR regulation Xiaochun. *Cell Mol Life Sci.* 67, 239–253. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0163-7.Key>
- Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y., Jiang, Y., 2007. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science (80-.)*. 318, 977–980. <https://doi.org/10.1126/science.1147379>
- Baker, T.G., 1964. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Obstet. Gynecol. Surv.* 19, 700–701. <https://doi.org/10.1097/00006254-196408000-00038>
- Bendel-Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J., Wylie, C., 1998. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0204>

- Bhandari, B.K., Feliars, D., Duraisamy, S., Stewart, J.L., Gingras, A.C., Abboud, H.E., Choudhury, G.G., Sonenberg, N., Kasinath, B.S., 2001. Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 59, 866–875. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.059003866.x>
- Bosotti, R., Isacchi, A., Sonnhammer, E.L.L., 2000. FAT: A novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 225–227. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01563-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01563-2)
- * Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657–664. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01958-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01958-2)
- * Castells, A., Ino, Y., Louis, D.N., Ramesh, V., Gusella, J.F., Rustgi, A.K., 1999. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 117, 831–837. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70341-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70341-0)
- Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., Schreiber, S.L., 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4947–4951. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4947>
- Chiquoine, A.D., 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118, 135–146. <https://doi.org/10.1002/ar.1091180202>
- Coleman, T.R., Dunphy, W.G., 1994. Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 877–882. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90060-4)
- Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.Y., Horner, K., Jin, C., Tsafirri, A., 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation, in: *Molecular and Cellular Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00686-4)
- Cota, D., Proulx, K., Blake Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., Seeley, R.J., 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.1124147>
- Dames, S.A., Mulet, J.M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M.N., Grzesiek, S., 2005. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J. Biol. Chem.* 280, 20558–20564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501116200>
- Datta, K., Franke, T.F., Chan, T.O., Makris, A., Yang, S.I., Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Golemis, E.A., Tsichlis, P.N., 1995. AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2304–2310. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.4.2304>
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghänel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J.U., Fischer, G., 2005. Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.* 24, 2688–2699. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600739>
- * Eppig, J.J., Marin-Bivens, C., Viveiros, M.M., de la Fuente, R., 2004. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. *Ovary* Second Ed. 113–129. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50008-2>

- Ferrari, S., Bandi, H.R., Hofsteenge, J., Bussian, B.M., Thomas, G., 1991. Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*
- Fischer, G., 1994. Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases and Their Effectors. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 33, 1415–1436. <https://doi.org/10.1002/anie.199414151>
- Fonseca, B.D., Smith, E.M., Lee, V.H.Y., MacKintosh, C., Proud, C.G., 2007. PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M704406200>
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R., Hemmings, B.A., 1997. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474–8481. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8474>
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2006. mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* 16, 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>
- Frödin, M., Antal, T.L., Dümmler, B.A., Jensen, C.J., Deak, M., Gammeltoft, S., Biondi, R.M., 2002. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf551>
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M., 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat. Rec.* 188, 315–329. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880305>
- * Gao, X., Pan, D., 2001. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.901101>
- Gingras, A., Gygi, S.P., Raught, B., Gingras, A., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., Sonenberg, N., 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism 1422–1437.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N., 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 15, 2852–2864. <https://doi.org/10.1101/gad.912401>
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M., 2006. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>
- Guo, J., Zhang, T., Guo, Y., Sun, T., Li, H., Zhang, X., Yin, H., Cao, G., Yin, Y., Wang, H., Shi, L., Guo, X., Sha, J., Eppig, J.J., Su, Y.Q., 2018. Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5326–E5333. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800352115>

- Hampfl, A., Eppig, J.J., 1995. Translational regulation of the gradual increase in histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.1080400103>
- * Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 23, 1515–1527. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science (80-.)*. <https://doi.org/10.1126/science.1905840>
- Hresko, R.C., Mueckler, M., 2005. mTOR·RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>
- Hsueh, A.J.W., Billig, H., Tsafirri, A., 1994. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocr. Rev.* 15, 707–724. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.L., 2003. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rügge, M.A., Hall, A., Hall, M.N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T. V., 2010. the Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.THE
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J.A., Holmes, A.B., Alessi, D.R., 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/bj3150709>
- Jansova, D., Koncicka, M., Tetkova, A., Cerna, R., Malik, R., del Llano, E., Kubelka, M., Susor, A., 2017. Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte. *Cell Cycle* 16, 927–939. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1295178>
- Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J.I., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., Zimmer, M., 1998. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.* <https://doi.org/10.1038/ng0198-38>
- Johnson, J., Canning, J., Kanedo, T., Pru, J.K., Tilly, J.L., 2004. Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal Mammalian Ovary. *Obstet. Gynecol. Surv.* 59, 518–520. <https://doi.org/10.1097/00006254-200407000-00017>
- Johnstone, C.N., Castellví-Bel, S., Chang, L.M., Sung, R.K., Bowser, M.J., Piqué, J.M., Castells, A., Rustgi, A.K., 2005. PRR5 encodes a conserved proline-rich protein predominant in kidney: Analysis of genomic organization, expression, and mutation status in breast and colorectal carcinomas. *Genomics* 85, 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.11.002>
- Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., Roux, P.P., 2010. mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *Mol. Cell. Biol.* <https://doi.org/10.1128/mcb.00601-09>

- Kalous, J., Solc, P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlik, J., 2006. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol. Cell* 98, 111–123. <https://doi.org/10.1042/bc20050020>
- Karabinova, P., Kubelka, M., Susor, A., 2011. Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1235-1>
- Kee, K., Gonsalves, J.M., Clark, A.T., Reijo Pera, R.A., 2006. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 15, 831–837. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.831>
- Keith, C.T., Schreiber, S.L., 1995. PIK-Related Kinases: DNA Repair, Recombination, and Cell Cycle Checkpoints. *Science* (80-). 270, 50–50. <https://doi.org/10.1126/science.270.5233.50>
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V.P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2003. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895–904. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00114-X)
- Kogasaka, Y., Hoshino, Y., Hiradate, Y., Tanemura, K., Sato, E., 2013. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 334–348. <https://doi.org/10.1002/mrd.22166>
- Kovacina, K.S., Park, G.Y., Bae, S.S., Guzzetta, A.W., Schaefer, E., Birnbaum, M.J., Roth, R.A., 2003. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.* 278, 10189–10194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210837200>
- Krek, W., Nigg, E.A., 1991. Mutations of p34(cdc2) phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: Evidence for a double block to p34(cdc2) kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* 10, 3331–3341. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04897.x>
- Krymskaya, V.P., 2003. Tumour suppressors hamartin and tuberlin: Intracellular signalling. *Cell. Signal.* [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00040-8)
- * Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Lawson, K.A., Hage, W.J., 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* <https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch5>
- Lee, M.N., Ha, S.H., Kim, J., Koh, A., Lee, C.S., Kim, J.H., Jeon, H., Kim, D.-H., Suh, P.-G., Ryu, S.H., 2009. Glycolytic Flux Signals to mTOR through Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Mediated Regulation of Rheb. *Mol. Cell. Biol.* <https://doi.org/10.1128/mcb.00165-09>

- Lee, S.E., Sun, S.C., Choi, H.Y., Uhm, S.J., Kim, N.H., 2012. mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 356–366. <https://doi.org/10.1002/mrd.22035>
- Liu, P., Gan, W., Inuzuka, H., Lazorchak, A.S., Gao, D., Arojo, O., Liu, D., Wan, L., Zhai, B., Yu, Y., Yuan, M., Kim, B.M., Shaik, S., Menon, S., Gygi, S.P., Lee, T.H., Asara, J.M., Manning, B.D., Blenis, J., Su, B., Wei, W., 2013. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/ncb2860>
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N., 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4990–4997. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.9.4990>
- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., Sonenberg, N., 2006. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416–6422. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209888>
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Mordes, D.A., Glick, G.G., Zhao, R., Cortez, D., 2008. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.1666208>
- Murray, A., 1995. Cyclin Ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81, 149–152. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90322-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90322-4)
- Nakashima, S., 2002. Protein kinase C α (PKC α): Regulation and biological function. *J. Biochem.* 132, 669–675. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003272>
- Nikolai, S., Pallauf, K., Huebbe, P., Rimbach, G., 2015. Energy restriction and potential energy restriction mimetics. *Nutr. Res. Rev.* 28, 100–120. <https://doi.org/10.1017/S0954422415000062>
- Parmar, N., Tamanoi, F., 2010. Rheb G-proteins and the activation of mTORC1. *Enzymes* 27, 39–56. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)27003-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27003-8)
- Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gurlay, R., Magnuson, M.A., Alessi, D.R., 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* 405, 513–522. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>
- Peterson, R.T., Schreiber, S.L., 1999. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80326-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80326-1)
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2009. DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell* 137, 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>
- Peterson, T.R., Sabatini, D.M., 2005. eIF3: A connectTOR of S6K1 to the translation preinitiation complex. *Mol. Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.016>

- Poulin, F., Gingras, A.C., Olsen, H., Chevalier, S., Sonenberg, N., 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.14002>
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B., 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600193>
- Rebecchi, M.J., Scarlata, S., 1998. Pleckstrin homology domains: A common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 503–528. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.503>
- Reuther, G.W., Der, C.J., 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00071-X)
- Roa, J., Garcia-Galiano, D., Varela, L., Sánchez-Garrido, M.A., Pineda, R., Castellano, J.M., Ruiz-Pino, F., Romero, M., Aguilar, E., López, M., Gaytan, F., Diéguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2009. The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 150, 5016–5026. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0096>
- Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N., Blenis, J., 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M700906200>
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonenberg, N., 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* <https://doi.org/10.1128/mcb.10.3.1134>
- * Ruan, C., Ouyang, X., Liu, H., Li, S., Jin, J., Tang, W., Xia, Y., Su, B., 2019. Sin1-mediated mTOR signaling in cell growth, metabolism and immune response. *Natl. Sci. Rev.* 6, 1149–1162. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz171>
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2007. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol. Cell* 25, 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- * Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005a. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.009>
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., Sabatini, D.M., 2006. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005b. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* (80-.). 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

- Schroder, W., Cloonan, N., Bushell, G., Sculley, T., 2004. Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene* 339, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.07.001>
- Schultz, R.M., Montgomery, R.R., Belanoff, J.R., 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* 97, 264–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90085-4)
- Scrima, A., Thomas, C., Deaconescu, D., Wittinghofer, A., 2008. The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues. *EMBO J.* <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.30>
- Shima, H., 1998. Disruption of the p70s6k/p85s6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17, 6649–6659. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6649>
- Simpson, L., Parsons, R., 2001. PTEN: Life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5130>
- Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., Kirschner, M.W., 1990. Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63, 1013–1024. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90504-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90504-8)
- Sonenberg, N., Gingras, A.C., 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80150-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80150-6)
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S., 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x>
- Sorensen, R.A., Wassarman, P.M., 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50, 531–536. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90172-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90172-X)
- Sparagana, S., Franz, D.N., Krueger, D.A., Bissler, J.J., Berkowitz, N., Burock, K., Kingswood, J.C., 2017. Pooled analysis of menstrual irregularities from three major clinical studies evaluating everolimus for the treatment of tuberous sclerosis complex. *PLoS One* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186235>
- Toker, A., Newton, A.C., 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275, 8271–8274. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8271>
- * Tramov, G.Y., Yurin, A.G., 2001. Lymphangioliomyomatosis. *Arkh. Patol.* 63, 45–47. https://doi.org/10.5005/jp/books/10485_35
- Tsafiriri, A., Chun, S.Y., Zhang, R., Hsueh, A.J.W., Conti, M., 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0226>
- * Tukur, H.A., Aljumaah, R.S., Swelum, A.A.-A., Alowaimar, A.N., Saadeldin, I.M., 2020. The Making of a Competent Oocyte – A Review of Oocyte Development and Its Regulation. *J. Anim. Reprod. Biotechnol.* 35, 2–11. <https://doi.org/10.12750/jarb.35.1.2>

- Tyers, M., Rachubinski, R.A., Stewart, M.I., Varrichio, A.M., Shorr, R.G.L., Haslam, R.J., Harley, C.B., 1988. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/333470a0>
- Van Den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E.E., Bevers, M.M., 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum. Reprod. Update* 6, 457–474. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.5.457>
- Van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., Van Den Ouweland, A., Reuser, A., Sampson, J., Halley, D., Van Der Sluijs, P., 1998. Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/7.6.1053>
- Vanderhyden, B., 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Front. Biosci.* <https://doi.org/10.2741/a895>
- Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W.H., Evans, M.J., Maro, B., 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122, 815–822.
- Veverka, V., Crabbe, T., Bird, I., Lennie, G., Muskett, F.W., Taylor, R.J., Carr, M.D., 2008. Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: Compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* 27, 585–595. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210693>
- Vézina, C., Kudelski, A., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 28, 721–726. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.721>
- Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y., Chen, J., 1999. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J. Biol. Chem.* 274, 4266–4272. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4266>
- Viveiros, M.M., De La Fuente, R., 2019. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation, 3rd ed, The Ovary. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813209-8.00011-x>
- Wassarman, P.M., 1999. The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: A versatile player during mammalian fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 116, 211–216. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160211>
- Watson, A.J., 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 85. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- Woo, S.Y., Kim, Dong Hwan, Jun, C.B., Kim, Y.M., Haar, E. Vander, Lee, S. Il, Hegg, J.W., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., Kim, Do Hyung, 2007. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor β expression and signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 25604–25612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704343200>
- * Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., Wei, X., 2019. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Mol. Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x>
- Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., Guan, K.L., 2006. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.1461206>

- * Yoo, Y.J., Kim, H., Park, S.R., Yoon, Y.J., 2016. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 537–553. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1834-7>
- Young, J., Povey, S., 1998. The genetic basis of tuberous sclerosis. *Mol. Med. Today.* [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(98\)01245-3](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(98)01245-3)
- Yuan, Y., Pan, B., Sun, H., Chen, G., Su, B., Huang, Y., 2015. Characterization of Sin1 isoforms reveals an mTOR-dependent and independent function of sin1 γ . *PLoS One* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135017>
- Zhang, Y., Bokov, A., Gelfond, J., Soto, V., Ikeno, Y., Hubbard, G., Diaz, V., Sloane, L., Maslin, K., Treaster, S., Réndon, S., Van Remmen, H., Ward, W., Javors, M., Richardson, A., Austad, S.N., Fischer, K., 2014. Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69 A, 119–130. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt056>
- * Zhou, H., Huang, S., 2010. The Complexes of Mammalian Target of Rapamycin. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 409–424. <https://doi.org/10.2174/138920310791824093>
- Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D.M., 2011. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>