

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Role dráhy mTOR při poškození buněk

Bakalářská práce

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

The Role of mTOR Pathway in Cell Injury

Bachelor Thesis

2022

Tina Babáčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tina Babáčková**
Osobní číslo: **C18198**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Role dráhy mTOR při poškození buněk**
Téma práce anglicky: **The Role of mTOR Pathway in Cell Injury**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis role signální kaskády mTOR. Ve své kompilaci se zaměřte na popis celé kaskády, jejích součástí, popř. dále pak na interakci s ostatními buněčnými signálními drahami. V rámci tohoto tématu také popište strukturu zapojených proteinů, popř. možnosti jejich aktivace či inhibice. Cílem práce je také popis role mTOR dráhy při intracelulární signalizaci v rámci reakce na buněčné poškození různého původu (např. mitochondriální, jaderné, oxidační).

2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. X/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.6. 2022

Tina Babáčková

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří vedoucímu práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat přátelům a rodině za velkou podporu po dobu mého studia.

ANOTACE

Práce je věnována proteinu mTOR a jeho signální dráze, jež ovlivňuje buněčný růst, proliferaci a buněčné přežití. Protein mTOR je v dnešní době hlavním terapeutickým cílem, neboť se jeho inhibice jeví jako potenciální lék mnoha nádorových a neurodegenerativních onemocnění. Vědci se zabývají vývojem nových účinných inhibitorů, které by do budoucna mohly být velkým přínosem v medicíně.

KLÍČOVÁ SLOVA

dráha mTOR, mTORC1/2, Akt, inhibitory, regulace, onemocnění

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the mTOR protein and its signaling pathway, which affects cell growth, proliferation and cell survival. The mTOR protein is now a major therapeutic target, as its inhibition appears to be a potential cure for many types of cancers and neurodegenerative diseases. Researchers are working on the development of new effective inhibitors that could be of great benefit in medicine in the future.

KEYWORDS

mTOR pathway, mTORC1/2, Akt, inhibitors, regulation, disease

OBSAH

Úvod	12
1. Protein mTOR.....	13
1.1 Struktura proteinu mTOR	13
1.2 Komplex mTORC1	14
1.2.1 Syntéza proteinů.....	15
1.2.2 Syntéza nukleotidů.....	15
1.2.3 Syntéza lipidů.....	16
1.2.4 Metabolismus glukózy	16
1.2.5 Aktivace komplexu mTORC1.....	16
1.2.6 Vliv aminokyselin	17
1.2.7 Hypoxie, poškození DNA, deficit glukózy a růstové faktory	17
1.3 Komplex mTORC2	18
1.3.1 Funkce komplexu mTORC2	18
1.3.2 Aktivace komplexu mTORC2.....	18
1.4 Regulace dráhy mTOR.....	20
1.4.1 Hamartin a tuberin (TSC1 a TSC2).....	20
1.4.2 Protein Rheb.....	21
1.4.3 Kináza Akt	23
1.4.4 Fosfatidylinositol 3-kináza.....	24
1.4.5 Ribozomální protein S6 kinázy beta-1 (S6K1)	25
1.4.6 Protein 4E-BP1.....	26
1.5 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR.....	27
2. Inhibitory dráhy mTOR.....	29
2.1 Rapamycin a jeho analogy	30
2.2 ATP-kompetitivní inhibitory dráhy mTOR.....	31
2.3 Duální inhibitory signalizace PI3K/mTOR.....	31
2.4 Třetí generace inhibitorů dráhy mTOR.....	33
3. Vliv dráhy mTOR na onemocnění.....	34
3.1 Karcinom prsu.....	34
3.2 Obezita	36
3.3 Alzheimerova choroba	36
Závěr	38
Použitá literatura	39

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: Primární struktura proteinu mTOR.	14
Obrázek 2: Struktura komplexů proteinu mTOR.	19
Obrázek 3: Aktivace komplexu mTORC1 v závislosti na AMK.	22
Obrázek 4: Struktura izoform kinázy Akt.	24
Obrázek 5: Struktura proteinu 4E-BP.	26
Obrázek 6: Signální dráha PI3K/Akt/mTOR.	28
Obrázek 7: Působení všech generací inhibitorů dráhy mTOR.	33
Tabulka 1: Přehled tříd inhibitorů mTOR.	32

Seznam zkratek a značek

4E-BP1	Protein 1 vázající eukaryotický translační iniciační faktor 4E
AD	Alzheimerova choroba
Akt	Proteinkináza B
AMK	Aminokyseliny
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ATP	Adenosintrifosfát
BAT	Hnědá tuková tkáň
Bnip3	Apoptický protein a negativní regulátor Rheb
CAT	Katalytická doména
Deptor	Protein interagující s doménou DEP u mTOR
EIF4A	Eukaryotický iniciační faktor 4A
EIF4E	Eukaryotický iniciační faktor translace 4E
EIF4F	Eukaryotický iniciační faktor 4F
EIF4G	Eukaryotický iniciační faktor 4G
FAT	Doména ve struktuře mTOR
FATC	Doména FAT na C-konci mTOR
FDA	Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FKBP12	FK506 vazebný protein 12 kDa
FOXO	Transkripční faktory
FRAP	Protein asociovaný s komplexem FKBP – rapamycin
FRB	Vazebné místo pro komplex FKBP12 – rapamycin
GAP	Proteiny aktivující GTPázu
GDP	Guanosindifosfát
GEF	Výměnný faktor guaninnukleotidů
GLUT4	Glukózový transportér typu 4
GS	Glykogensyntáza
GSK3β	Glykogensyntáza kináza 3 beta
GTP	Guanosintrifosfát
HEAT	Strukturní doména proteinu mTOR odvozená od 4 proteinů: Huntington, elongační faktor 3, proteinová fosfatáza 2A a TOR1

HER2	Epidermální růstový faktor 2
MCRS1	Protein mikrosférul 1
mLST8	Savčí homolog letálního proteinu se sec 13 proteinem 8
mSin1	Protein 1 interagující s MAP kinázou aktivovaný stresem
mTOR	Savčí cíl rapamycinu
mTORC1	Savčí cíl rapamycinu komplex 1
mTORC2	Savčí cíl rapamycinu komplex 2
pAKT	Fosforylovaná kináza Akt
PIP2	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát
PDK	Fosfoinositid dependentní kináza
PH	Pleckstrinová homologická doména
PHLPP	Proteinová fosfatáza bohatá na doménu PH a leucin
PKB	Proteinkináza B
PKC	Proteinkináza C
PRAS40	Na prolin bohatý substrát Akt o velikosti 40 kDa
Protor 1/2	Protein pozorovaný u Rictor
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PIK3CA	Gen kodující fosfatidylinositol-3-kinázu
PPARγ	Receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PTEN	Homolog tenzinu
Raptor	Regulační protein asociovaný s mTOR
Rictor	Společník mTOR necitlivý na rapamycin
Rheb	Ras homolog obohacený v mozku
RTK	Tyrosin kinázové receptory
RD	Regulační doména
S6K1	Ribozomální protein S6 kináza beta-1
Thr	Threonin
TOR	Cíl rapamycinu
TSC	Komplex tuberózní sklerózy
SCAP	Protein aktivující štěpení SREBP
Ser	Serin
SREBP	Protein vázající regulační prvek sterolu 1
WAT	Bílá tuková tkáň

Úvod

Savčí cíl rapamycinu - mTOR je hlavním regulátorem buněčného růstu a proliferace v reakci na širokou škálu podnětů. Změny v jeho aktivitě jsou pozorovány u několika onemocnění, z tohoto důvodu se stal hlavním cílem terapeutické činnosti.

Úvodní část se zabývá charakteristikou proteinu mTOR a jeho dvou komplexů, ve kterých se nachází. Jsou zde popsány struktury a hlavní funkce tohoto proteinu, které mají vliv na buněčný metabolismus, homeostázu či buněčné přežití. Hlavní část se věnuje signální dráze PI3K/Akt/mTOR a jejím dílčím částem. Tato dráha je klíčovým faktorem správného fungování buňky. Její dysregulace vede k mnoha patologiím, které jsou uvedeny v závěrečných kapitolách společně s jejich možnou léčbou. Léčba využívá inhibice komplexů mTOR, nebo částí signální dráhy mTOR. Jak vypovídá název, hlavními inhibitory kinázy mTOR jsou rapamycin a jeho analogy.

Cílem této bakalářské práce je porozumění problematice týkající se poškození buněk vlivem dysregulace dráhy mTOR.

1. Protein mTOR

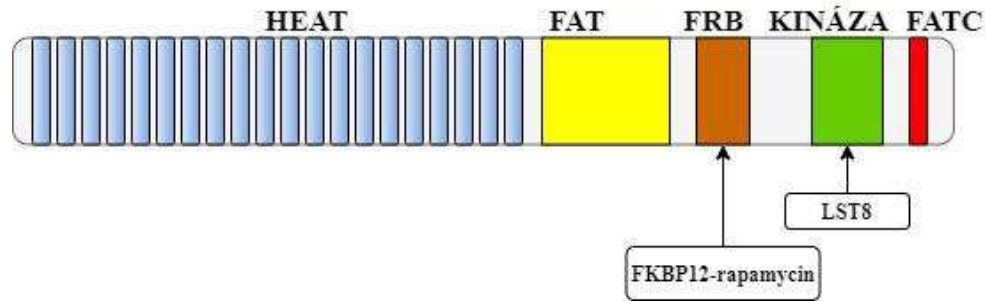
Protein mTOR (odvozeno od anglického „*mammalian target of rapamycin*“) je savčí serin/threoninová kináza, která má vliv na několik důležitých nitrobuněčných procesů u eukaryotických organismů. Mezi hlavní funkce kinázy mTOR řadíme podíl na regulaci v metabolismu buňky a regulaci G1 fáze buněčného cyklu, tzv. období buněčného růstu, na základě obsažených živin v buňce. Mezi další funkce můžeme zařadit regulaci iniciace translace, transkripce, či degradaci proteinů. Podílí se také na vývoji neuronů a správném fungování zralých neuronů (Switon et al., 2017).

Název mTOR je odvozen od imunosupresivní látky rapamycinu, který se vyznačuje schopností tento protein vázat. V důsledku různé senzitivity na rapamycin a vazbě s dalšími proteiny rozlišujeme mTOR na dva odlišné multi-proteinové komplexy: mTOR komplex 1 (mTORC1) a mTOR komplex 2 (mTORC2). Tyto komplexy regulují různé buněčné procesy a jsou aktivovány fosforylací hydrofobních motivů na proteinkinázách (Lane et.al., 2017).

1.1 Struktura proteinu mTOR

mTOR je 250 kDa velký protein rozdělený do několika domén (Obrázek 1). Na N-konci se nachází 20 HEAT motivů. Název HEAT je odvozen od 4 proteinů (Huntington, elongační faktor 3, proteinová fosfatáza 2A a TOR1), které slouží k interakci proteinů.

Následuje rozsáhlá doména FAT, název je odvozen od členů PI3K kinázové rodiny (*FRAP*, *ATM*, *TRAP*). Má obdobné funkce jako doména HEAT a to protein-protein interakce. FAT doména je nezbytným článkem pro aktivaci mTOR proteinu. FRB doména neboli vazebné místo komplexu FKBP12-rapamycin, má regulační funkci. Je to místo, kde se váže FKBP12 - rapamycin na mTOR protein. Jedná se o reakci hydrofobní kapsy FKBP12 obsahující rapamycin s hydrofobní oblastí FRB. Vedle FRB domény se nachází katalytická kinázová doména, jež váže savčí homolog letálního proteinu se sec 13 proteinem 8 (mLST8). Na C-konci potom nalezneme druhou FAT doménu, nazývanou FATC. Tato doména se vyskytuje pouze ve vazbě s FAT, protože je oproti jiným doménám tak malá, že by samostatně nemohla fungovat (Gedaly et al., 2015).



Obrázek 1: Primární struktura proteinu mTOR.

HEAT – doména s 20 HEAT motivy sloužící k interakci proteinů, FAT – klíčový článek aktivace mTOR, FRB – vazebné místo FKBP12-rapamycinu, KINÁZA – vazebné místo savčího proteinu LST8, FATC – doména závislá na FAT (upraveno dle Showkat et al., 2014).

1.2 Komplex mTORC1

Komplex mTORC1 je citlivý na rapamycin a je tedy zodpovědný za všechny procesy citlivé na rapamycin v savčích buňkách. Rapamycin společně s FKBP12 tvoří komplex, který je schopen se vázat pouze na TOR1 nebo TOR2 u mTORC1, nikoli u mTORC2. Komplex FKBP12 – rapamycin inhibuje funkci komplexu mTORC1 navázáním se na FRB doménu.

Komplex mTORC1 je tvořen kromě katalytické podjednotky mTOR dvěma hlavními komponentami: regulační protein asociovaný s mTOR (Raptor) a mLST8 (viz Obrázek 2). Raptor slouží jako takové lešení proteinu mTOR - váže se na HEAT doménu a díky jeho přítomnosti může mTOR signalizace správně fungovat. Další funkcí Raptoru je pozitivní regulace „downstream“ efektorů nebo stabilizace komplexu tzv. mTOR-Raptor interakce, ke které dochází při nedostatku aminokyselin (AMK) v buňce nebo nedostatku zdroje energie. V důsledku těchto nedostatků dochází k inhibici mTOR signalizační dráhy a represí mTOR kinázové dráhy (Kim et al. 2002). mLST8 je protein sloužící jako pozitivní regulátor mTOR dráhy, který reaguje na hladinu živin. Další součástí komplexu jsou dvě inhibiční podjednotky: protein PRAS40 (na prolin bohatý substrát Akt o velikosti 40 kDa), který má funkci negativního regulátoru mTOR a Deptor (protein interagující s mTOR s doménou DEP) (Lane et al., 2017).

Komplex mTORC1 je aktivován fosforylací ribozomálního proteinu S6 (S6K1) a proteinu vázajícího eukaryotický translační iniciační faktor 4E (4E-BP1). Hlavní funkcí komplexu mTORC1 je sjednocování informací z různých drah, které mají vliv na buněčný růst či homeostázu. Prostřednictvím translace mRNA řídí buněčné procesy včetně syntézy proteinů, lipogeneze, autofagie, metabolismu glukózy a biogeneze lysozomů v odezvě na změny hladin AMK, glukózy, energie, kyslíku a růstových faktorů (Kim et Guan, 2019).

Tyto signály společně regulují aktivitu celého proteinu mTOR a podporují buněčný růst a proliferaci zvýšením anabolických procesů, a naopak snížením katabolických procesů. Mezi anabolické procesy patří syntéza proteinů a lipidů, zatímco do těch katabolických řadíme autofagii nebo biogenezi lysozomů. U komplexu mTORC1 je aktivita navíc regulována oxidačním nebo genotoxickým stresem (Li and Yan, 2019).

Dysregulace tohoto komplexu se projevuje u některých lidských onemocnění a metabolických poruch, zejména u nádorových neoplazií, diabetu, neurodegenerativních chorob a také u procesu srdeční hypertrofie. Bylo vědecky prokázáno, že právě hyperaktivace signalizace PI3K/Akt/mTOR způsobila zvětšení srdce na podkladě hypertrofie kardiomyocytů neboli zvětšení jejich objemu. Takto zvětšené srdce je jedním z rizikových faktorů vzniku srdečního selhání (Shioi et al., 2002; Switon et al., 2017).

1.2.1 Syntéza proteinů

Proteosyntéza je jedním z energeticky nejnáročnějších procesů v buňce a pozitivně koreluje s rychlostí buněčné proliferace. Proteiny tvoří přibližně 50 % biomasy buněk. mTORC1 hraje klíčovou roli v indukci syntézy proteinů v reakci na signály růstových faktorů. Komplex stimuluje syntézu proteinů fosforylací několika substrátů. Nejdůležitějším z nich je protein 4E-BP1 a S6K1. Komplex mTORC1 přímo fosforyluje eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eIF4E), čímž stimuluje uvolňování 4E-BP1 z jeho inhibiční vazby eIF4E na 5'-cap mRNA. Uvolnění mu umožňuje vázat se na eukaryotické iniciační faktory eIF4G a eIF4A za vzniku aktivního komplexu iniciace translace eIF4F. Komplex mTORC1 ovlivňuje syntézu a kontroluje translaci podskupiny mRNA, která kóduje složky translačního aparátu, včetně ribozomálních proteinů a translačních faktorů. Jejich nárůst zvyšuje celkovou kapacitu syntézy buňky. Zvýšení biogeneze ribozomů je hlavní funkcí mTORC1. Kromě stimulace syntézy ribozomálních proteinů se mTORC1 podílí na regulaci transkripce různých tříd ribozomálních RNA (Ben-Sahra et al., 2017; Morita et al., 2015).

1.2.2 Syntéza nukleotidů

Pro správný růst buňky je kromě bílkovin ještě velmi důležitá zvýšená syntéza nukleových kyselin RNA a DNA. RNA je potřebná pro většinu buněčných (syntetických) pochodů – replikace, translace, transkripce a také tvorba ribozomů. Zvýšenou syntézou DNA je pak míněna její replikace u dělících se buněk. Spolu s těmito pochody tedy stoupá i poptávka buňky po základních stavebních kamenech RNA i DNA – nukleotidech. Ty buňka získá buď syntézou *de novo*, nebo exogenním vychytáváním (Ben-Sahra et al., 2017). Komplex mTORC1

stimuluje syntézu nukleotidů prostřednictvím aktivace karbamoylfosfátsyntetázy 2, aspartát transkarbamylázy a dihydrorotát dehydrogenázy (Morita et al., 2015).

1.2.3 Syntéza lipidů

Lipidy jsou v buňce nezbytné pro biogenezi a expanzi cytoplazmatické membrány a membrány buněčných organel. Kináza mTORC1 podporuje *de novo* syntézu nových lipidů prostřednictvím dvou hlavních regulátorů: protein vázající regulační prvek sterolu (SREBP) a receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPAR γ). SREBP a PPAR γ náleží do transkripčních faktorů, které kontrolují expresi metabolických genů kódujících hlavní lipogenní enzymy zapojené do biosyntézy mastných kyselin či sterolů. SREBP je syntetizován jako prekurzor, který je připojen k membráně endoplazmatického retikula prostřednictvím vazby s proteinem aktivujícím štěpení SREBP (SCAP). Mechanismus, kterým je heterodimer SCAP - SREBP přenesen do Golgiho aparátu ke zpracování proteolytickými enzymy na svou zralou formu, je neznámý. Důležité je, že zralá forma se poté translokuje do jádra, aby vyvolala transkripci cílových genů, včetně těch, které kódují hlavní lipogenní enzymy (Morita et al., 2015).

1.2.4 Metabolismus glukózy

Vlivem komplexu mTORC1 dochází k přeměně oxidativní fosforylace na glykolýzu, která podporuje tvorbu nové biomasy. Komplex zvyšuje translaci transkripčního faktoru HIF1 α , který řídí expresi několika glykolytických enzymů, například fosfofruktokinázy. HIF1 α je aktivován za podmínek hypoxie. Regulace aerobní glykolýzy zprostředkována komplexem mTORC1 prostřednictvím HIF1 α je také důležitá při rozšiřování populací imunitních buněk. Kromě toho aktivace SREBP závislá na mTORC1 vede ke zvýšené produkci intermediárních metabolitů potřebných pro proliferaci a růst (Düvel et al., 2010).

1.2.5 Aktivace komplexu mTORC1

Aktivita mTORC1 je regulována několika faktory: růstovými faktory, intracelulárními a enviromentálními stresy (např. poškození DNA, hypoxie, nízká hladina ATP) a aminokyselinami. Velmi důležitou molekulou při aktivaci je Rheb, malý GTPáza protein, jehož aktivita je negativně ovlivňována TSC1/2 (komplex tuberózní sklerózy 1/2). TSC1/2 reguluje Rheb převodem aktivního Rheb-GTP do neaktivního Rheb-GDP, čímž se snižuje aktivita celého mTORC1. Aktivita mTORC1 může být podpořena růstovými faktory

podobné inzulínu, které inhibují komplex TSC1/2. Tato aktivace mTORC1 je závislá na fosforylaci TSC prostřednictvím kinázy Akt, která disociuje TSC z lysozomální membrány.

1.2.6 Vliv aminokyselin

Kombinací všech 20 biogenních AMK dochází k aktivaci komplexu mTORC1, z nichž leucin a arginin jsou klíčové. Komplex je rozdílně citlivý na AMK v různých buněčných liniích. Experimenty ukazují, že arginin je hlavní AMK, která ovlivňuje aktivaci komplexu mTOR v různých typech lidských buněk. Aktivita komplexu v buňkách zbavených argininu byla silně potlačena (Carroll et al., 2015). AMK aktivují mTORC1 pomocí Rag GTPázy. Jejich hlavní úlohou je regulace lokalizace komplexu (Bar-Peled a Sabatini, 2014). Buňky bez přítomnosti AMK obsahují komplex mTORC1 rozptýlený různě v cytoplazmě, zatímco po přidání AMK se komplex okamžitě translokuje do lysozomální membrány, kde je aktivován přítomností GTPázou Rheb, jež je sama negativně regulována komplexem TSC (Yang et Ming, 2012). Umístění mTORC1 na lysozomální membráně zprostředkovává Raptor (Bar Peled a Sabatini, 2014). Funkcí lysozomů není pouze platforma pro umístění a aktivaci mTORC1, nýbrž hrají důležitou roli v katabolismu degradací intracelulárního a extracelulárního materiálu (Yang et Ming, 2012).

V průběhu dlouhodobého hladovění a absenci AMK je signalizace mTORC1 inhibována a dochází k autofagii, která obnovuje zásobu AMK degradací proteinů. Objevující se studie naznačují, že i nukleotidy a proteiny obsažené v ribozomech slouží jako zásoba zdrojů a mohou být selektivně degradovány. Tento proces je nazýván ribofagie a je regulován mTORC1 prostřednictvím autofagického receptoru NUFIP1 – ZNNHIT3 (Wyant et al., 2018).

1.2.7 Hypoxie, poškození DNA, deficit glukózy a růstové faktory

Hypoxie, nebo poškození DNA aktivují TSC1/2 prostřednictvím aktivace AMPK (AMP-aktivovaná proteinkináza), to zablokuje protein Rheb a inhibuje komplex mTORC1. Deficit glukózy má také určitý vliv na inhibici mTORC1, neboť snižuje poměr ATP/AMP a tím aktivuje AMPK. Aktivace tumor supresorového genu p53 a signalizace vápníkem mohou také přispívat k inhibici dráhy mTOR prostřednictvím aktivované AMPK.

Růstové faktory regulují komplex mTORC1 v plazmatické membráně transdukcí signálu vyvolaného hormonem inzulínem. Inzulín aktivuje komplex prostřednictvím aktivace kinázy Akt, která poté fosforyluje a inhibuje TSC2. Tyto komplexy tuberózní sklerózy jsou produkty tumor supresorových genů. Při mutaci může docházet ke genetickým poruchám charakterizovaných benigními nádory v několika orgánech. Při inhibici TSC2 pomocí kinázy

Akt dochází ke zvýšení RHEB nabitého guanosin trifosfátu (GTP), který je velmi silným aktivátorem komplexu mTORC1 (Yang and Ming, 2012).

1.3 Komplex mTORC2

Dalším komplexem proteinu mTOR je komplex mTORC2, u kterého se vědci dohnímali, že není citlivý na rapamycin. Ovšem po několika výzkumech bylo zjištěno, že po dlouhodobém účinku nebo vysoké dávce rapamycinu dochází k inhibici tohoto komplexu potlačením jeho jednotek (Switon et al., 2017). Citlivost mTORC2 na rapamycin se odvíjí od buněčné linie a typu tkáně. Například v játrech, svalech či tukové tkáni je mTORC2 citlivý pouze na chronickou expozici, zatímco v ledvinách, žaludku nebo brzlíku je zcela rezistentní (Apelo et al., 2016).

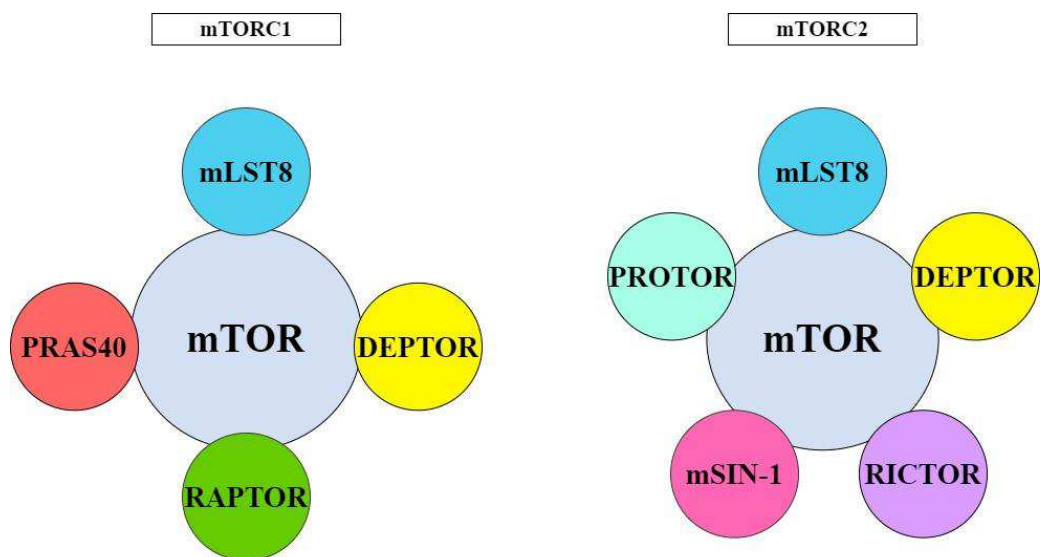
Ve struktuře komplexu je typický protein Rictor, což je protein necitlivý na rapamycin. Má analogickou funkci jako Raptor u komplexu mTORC1, a tou je vazba substrátu na mTOR. Dále obsahuje regulační podjednotku mSIN-1, tento protein je pro komplex nezbytný, neboť je schopný fosforylovat kinázu Akt. Poslední součástí jsou proteiny pozorované u Rictor (Protor 1/2), u kterých ještě pořádně neznáme hlavní roli, co se týče dráhy mTOR. Studie ukázaly, že jejich absence výrazně neovlivnila expresi ostatních složek. Komplex mTORC2 společně s mTORC1 sdílí Deptor a mLST8 (Lane et al., 2017).

1.3.1 Funkce komplexu mTORC2

Komplex mTORC2 kontroluje především přežití a proliferaci buněk pomocí fosforylace a aktivace několik členů rodiny kináz AGC. Má hlavní podíl na kontrole tvorby aktinového cytoskeletu a celkové polarizace buňky. K regulaci aktinového cytoskeletu dochází prostřednictvím Rho proteinu a proteinkinázy C (PKC). Rho protein spadá do rodiny malých GTPáz (Li and Gao, 2014). Nejdůležitější úlohou komplexu mTORC2 je fosforylace a aktivace kinázy Akt. Ve chvíli, kdy je efektor Akt aktivní, podporuje přežití, růst a také proliferaci buněk prostřednictvím fosforylace a inhibice několika hlavních substrátů, počítaje transkripčních faktorů FOXO, metabolického regulátoru GSK3 (glykogensyntáza kináza 3) a inhibitorů TSC2.

1.3.2 Aktivace komplexu mTORC2

K aktivaci dochází fosforylací AGC kináz, což je skupina enzymů obsahující 3 kinázové rodiny: PKA, PKG a PKC. Konkrétně tedy komplex mTORC2 fosforyluje kinázu Akt na endoplazmatickém retikulu prostřednictvím kinázy regulované sérem a glukokortikoidy. Proteinu mTORC2 stačí k aktivaci pouze růstový faktor jako je inzulin (Betz et al., 2013).



Obrázek 2: Struktura komplexů proteinu mTOR.

Oba komplexy spolu sdílí pozitivní regulátor mLST8 (savčí homolog letálního proteinu se sec 13 proteinem 8) a DEPTOR (protein interagující s mTOR s doménou DEP). Komplex mTORC1 navíc obsahuje Raptor (regulační protein asociovaný s mTOR) a PRAS40 (na prolin bohatý substrát Akt o velikosti 40 kDa). Druhý komplex mTORC2 se skládá z Rictoru (protein necitlivý na rapamycin), regulační podjednotky mSIN-1 a Protoru (protein spojený s Rictor).

1.4 Regulace dráhy mTOR

Na regulaci signalizace mTOR se podílí několik faktorů. Tyto faktory ovlivňují proteiny, které mají účast na signální dráze PIK3/Akt/mTOR. V následujících kapitolách probereme průběh této kaskády a všechny klíčové proteiny do ní zapojené.

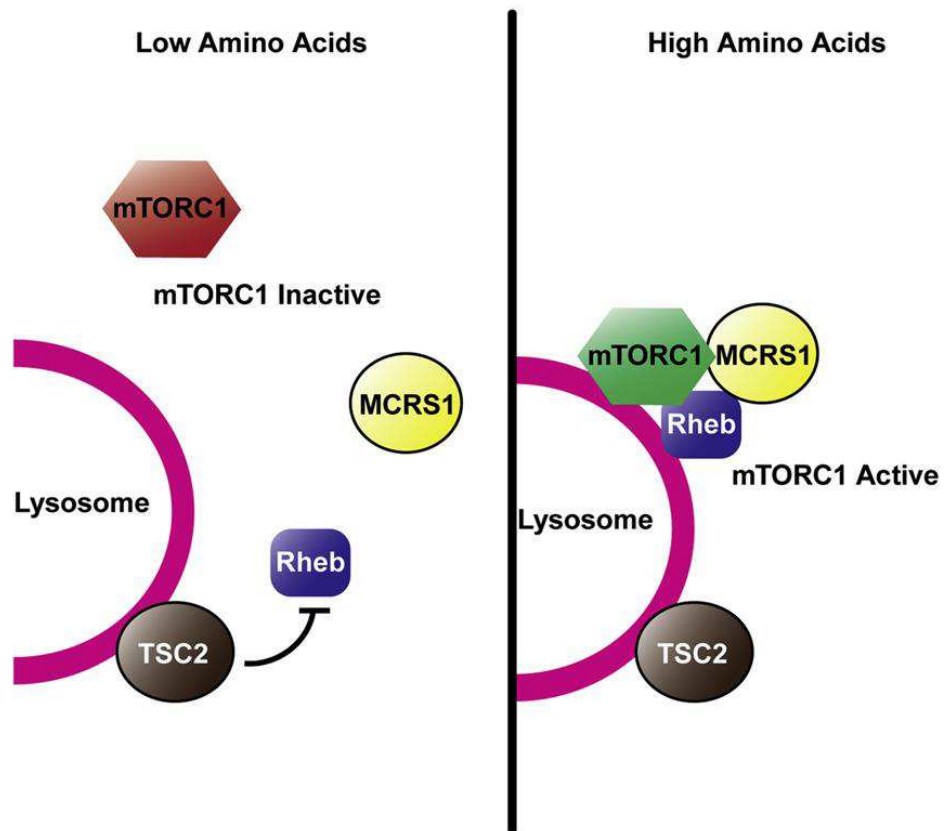
1.4.1 *Hamartin a tuberin (TSC1 a TSC2)*

Komplex tuberózní sklerózy (TSC) je dominantně autozomální onemocnění, které způsobují nádorové supresorové geny TSC1 a TSC2. Tato dědičná porucha se projevuje výskytem tumorů v různých tkáních a orgánech, nejčastěji mozek, ledviny, kůži, srdce a plíce. Mutace TSC2 se vyskytují také v případech lymfangioleiomyomatózy, která je charakterizována aberantní proliferací buněk hladkého svalstva a cystickou destrukcí v plicích (Carsillo et. Al., 2000). Zmíněné proteiny společně tvoří TSC1-TSC2 heterodimer. TSC1-TSC2 komplex je negativním regulátorem mTORC1 komplexu. V savčích buňkách snižuje hladiny Rheb vázaného na GTP (G proteiny). Proteiny nesdílejí žádnou vzájemnou homologii. TSC2 obsahuje na svém N-konci leucinový zip, který slouží pro interakci s TSC1.

TSC2 je 180 kDa velký protein, který na svém C-konci obsahuje homologní doménu s proteiny aktivujícími GTPázu (GAP). GAP snižují aktivitu malých proteinů vázajících GTP. Tyto G proteiny jsou tzv. molekulární spínače. V aktivním stavu jsou navázány na GTP, a pokud jsou navázány na GDP (guanodifosfátu vzniklý hydrolýzou GTP), tak dochází k inaktivaci. Přepínání mezi těmito stavy slouží k regulaci aktivity a je zprostředkováno výměnným faktorem guaninnukleotidů (GEF). GEF aktivuje monomerní GTPázu tím, že stimuluje uvolňování GDP, čímž umožní vazbu GTP. V aktivním stavu mohou malé G proteiny interagovat s dalšími proteiny buněčných signálních kaskád (Krymskaya, 2003). TSC1 sice nevykazuje žádnou aktivitu GAP, ale v buňkách je nezbytný pro funkci TSC2. Bylo zjištěno, že mutace v TSC1 snižují funkci komplexu TSC1/TSC2. Mezi hlavní funkci TSC2 patří regulace dráhy mTOR, zatímco TSC1 má za úkol celý komplex stabilizovat (Bai et al., 2010; Nellist et. al., 2005).

1.4.2 Protein Rheb

Rheb neboli Ras homolog obohacený v mozku je malá GTPáza, patří do podrodiny Ras, která aktivuje mTORC1. Slouží jako spojení mezi signalizací PI3K/Akt a mTORC1 pro kontrolu buněčného růstu. Dva typy proteinů regulují aktivitu proteinů Ras - GEF a GAP. GEF podporují uvolňování GDP a usnadňují vazbu GTPázy na GTP. Tato vazba dále umožňuje interakci a aktivaci downstream efektorových proteinů. GAP urychlují hydrolyzu GTP a narušují interakci s efektor. Je zajímavé, že Rheb jako jedna z mála GTPáz může interagovat s mTORC1 i v neaktivní formě, nicméně k aktivaci mTORC1 je nutná aktivní forma vázaná na GTP. Prostřednictvím stimulace aktivity mTORC1 řídí inhibici 4EBP1 a aktivaci p70S6K, což vede k podpoře buněčného růstu a proliferaci pomocí stimulace syntézy proteinů. Lidský gen Rheb se nachází na chromozomu 7(7q36). Z názvu můžeme odvodit, že se nachází v mozku. Není to však jediné útočiště, neboť Rheb je všudypřítomný. Rheb může být inhibován pomocí TSC, neboť TSC podporuje hydrolyzu Rheb vázaného GTP. Známe ještě další cesty, jak negativně regulovat Rheb, jednou je interakce s Bnip3. Bnip3 je protein z rodiny apoptických proteinů, jež je indukovaný hypoxií. Vazba Rheb-Bnip3 snižuje hladiny Rheb - GTP a inhibuje mTORC1 během hypoxie. Aktivace Rheb je jednoduchá, stačí inhibovat negativní regulátory, čímž dojde ke zvýšení hladiny Rheb a silné aktivaci mTORC1. Při aktivaci komplexu se využívá proteinu mikrosférul 1 (MCRS1), který se naváže na aktivní formu Rheb a udržuje ho v lysozomech (Fawal et al., 2015; Marisol et al., 2015). Interakce MCRS1 a Rheb je také ovlivněna množstvím aminokyselin v buňce (Obrázek 3).



Obrázek 3: Aktivace komplexu mTORC1 v závislosti na AMK.

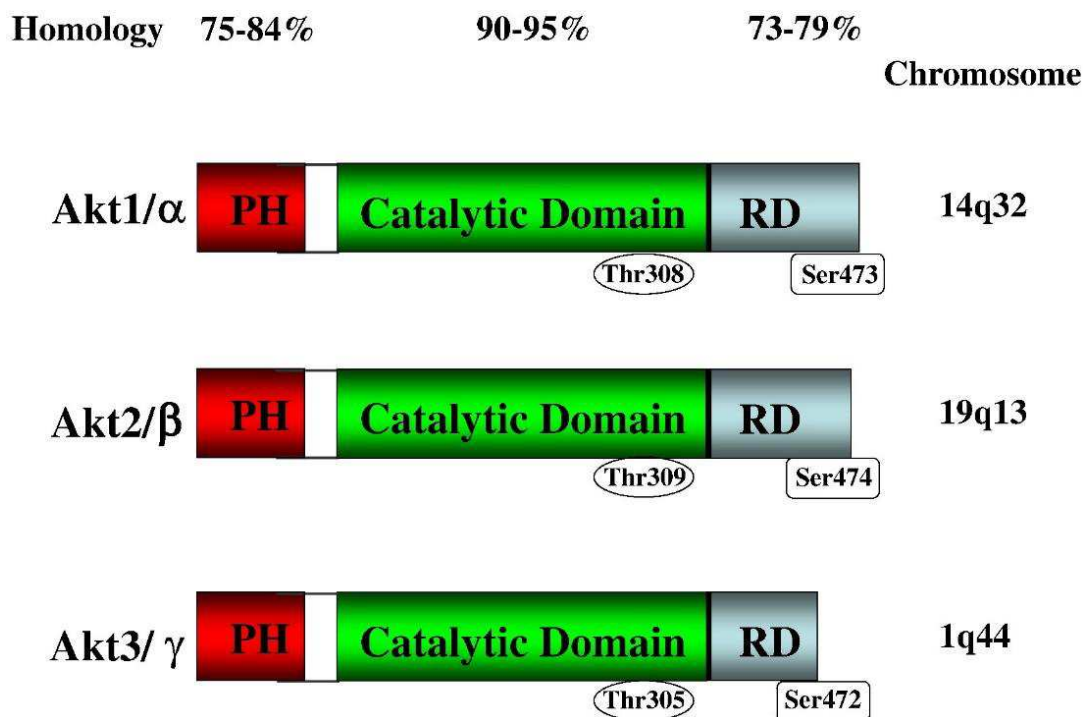
Přítomnost AMK v buňce je velmi důležitá pro aktivaci mTORC1, neboť pomáhají k translokaci komplexu na povrch lyzozomální membrány a následné vazbě s Rheb (malá GTPáza). Protein mikrosférul 1 (MCRS1) udržuje protein Rheb na povrchu lyzozomů v aktivní formě, čili vázaného na guanosintrifosfát (GTP), aby došlo k aktivaci komplexu mTORC1. Deplece proteinu MCRS1 podporuje interakci Rheb s TSC2 (komplex tuberózní sklerózy 2) - Rheb se stává neaktivním, což vede k inaktivaci celého komplexu mTORC1 (Fawal et al., 2015).

1.4.3 Kináza Akt

AKT je serin/threonin kináza, také známá jako proteinkináza B (PKB). Jedná se o onkogenní protein, který je součástí signalizační dráhy PI3K/Akt/mTOR. Podporuje několik mechanismů včetně syntézy proteinů, mastných kyselin, glykogenu, příjmu glukózy vyvolaného inzulinem a její následné glykolýze a hlavně buněčnou proliferaci společně s přežitím celé buňky. Nachází se v jádře a cytosolu buňky. Kináza Akt se skládá ze tří konzervovaných domén (Obrázek 4) – pleckstrinová homologická doména (PH), katalytická doména (CAT) a regulační doména (RD). PH doména je pojmenována po proteinu pleckstrin, ve kterém byla poprvé objevena. Tato doména slouží k vazbě fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát (PIP3), který je syntetizovaný fosfatidylinositol 3-kinázou (PI3K), což vede k fosforylaci a aktivaci celkové kinázy Akt. Následuje CAT nacházející se v centrální oblasti proteinu a RD obsahující regulační hydrofobní motiv a jež je uložena na C-konci.

Kináza Akt je aktivována několika efekty: již zmíněným PI3K, fosfoinositid - dependentními kinázami (PDK), růstovými faktory, zánětem, poškozením DNA nebo deregulací tumor supresorového genu PTEN. Aktivace probíhá na doméně Thr308 nebo Ser473. Fosforylovaná kináza Akt (pAKT) indukuje signály, které interferují s regulačními procesy aktivujícími mTOR a díky tomu se podílí na deregulaci apoptózy, proliferace a buněčné motility. Dysregulovaná aktivita kinázy Akt, myšleno především nadměrná exprese pAKT, hraje významnou roli v patogenezi mnoha nádorových onemocnění a představuje tedy jeden z možných terapeutických cílů při léčbě těchto onemocnění.

Rodina Akt/PKB zahrnuje tři členy známé jako PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 a PKB γ /Akt3. Tyto izoformy jsou u savců kódovány geny umístěnými na třech chromozomech (14q32, 19q13, 1q44). Akt1 a Akt2 jsou všudypřítomné, zatímco Akt3 se nachází hlavně v mozku, srdci, ledvinách a varlatech. Ve svých katalytických doménách sdílejí vysoký stupeň sekvenční homologie. Navzájem se liší ve svých intracelulárních funkcích a lokalizacích. To vede k bohaté signální síti s více než stovkou downstream substrátů, jako například mTOR. Aktivační mutace a nadměrná exprese kinázy Akt často způsobuje rezistenci vůči chemoterapii (Landel I et al., 2020; Martelli et al., 2012).



Obrázek 4: Struktura izoform kinázy Akt.

Struktura skládající se z pleckstrinové homologické domény (PH), katalytické domény (CAT) a regulační domény (RD). Procentuálně jsou katalytické domény nejvíce homologické u všech třech izoform, společně s regulační doménou obsahují velmi podobná fosforylační místa (Thr308/Ser473/Akt1, Thr309/Ser474/Akt2, Thr305/472/Akt3). Vpravo jsou označena umístění chromozomů genů kódujících jednotlivé izoformy (Martelli et al., 2012).

1.4.4 Fosfatidylinositol 3-kináza

Fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) jsou enzymy z rodiny lipidových kináz, které přenáší fosfátovou skupinu z donorové molekuly na cílovou molekulu a podílejí se na regulaci buněčných procesů zahrnujících buněčný růst, proliferaci metabolismus, či apoptózu. PI3K signální dráha je nesmírně důležitá pro správnou funkci organismu a bylo zjištěno, že dráha PI3K/AKT/mTOR je dysregulována téměř u všech lidských karcinomů, jako je karcinom prsu, kolorektální karcinom a hematologické malignity, což zdůrazňuje hodnotu cílení této dráhy jako potenciální terapeutické léčby karcinomu. Inhibice PI3K může mít za následek jak sníženou buněčnou proliferaci, tak zvýšenou buněčnou smrt. Tyto enzymy dělíme do tří skupin na základě jejich funkce, struktury, substrátové specifity a způsobu aktivace.

První třídou jsou heterodimerní enzymy, které se skládají z katalytické a regulační podjednotky. Hlavním produktem této třídy je fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3), který je klíčovou součástí signalizační dráhy PI3K/Akt/mTOR. Rekrutuje kinázu Akt, která reguluje další cesty počítaje aktivaci mTORC1. Dalšími produkty jsou fosfatidylinositol-3-fosfát a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát. Podle receptorů rozeznáváme další dvě podtřídy, a to IA a IB.

Podtřída IA je typem, který se nejvíce podílí na lidské rakovině, je aktivována prostřednictvím tyrosinkinázových receptorů (RTK), zatímco IB aktivují malé G-proteiny.

Do druhé třídy patří enzymy skládající se z jedné katalytické podjednotky. Produktem je v tomto případě fosfatidylinositol-3-fosfát a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát. Enzymy poslední třídy se skládají z katalytické podjednotky Vps34 a regulační podjednotky Vps15. Vps34 je regulátorem autofagie a klíčovým prvkem pro správnou funkci kardiovaskulární soustavy. Vps15 má na starost regulaci intracelulární membránovou lokalizaci Vps34 a jeho aktivitu. Produktem je fosfatidylinositol-3-fosfát podílející se na řízení membránovém transportu. Tato třída se navíc podílí na syntéze proteinů skrze dráhu mTOR (Becker et al., 2008; Jaber et al., 2012).

Někdy je uváděna i třída IV, do které řadíme enzymy příbuzné PI3K. Mezi takové enzymy patří např. DNA dependní proteinkináza nebo protein mTOR. Inhibice signalizace PI3K je účinná při léčbě několika typů rakoviny (Shuttleworth et al., 2011).

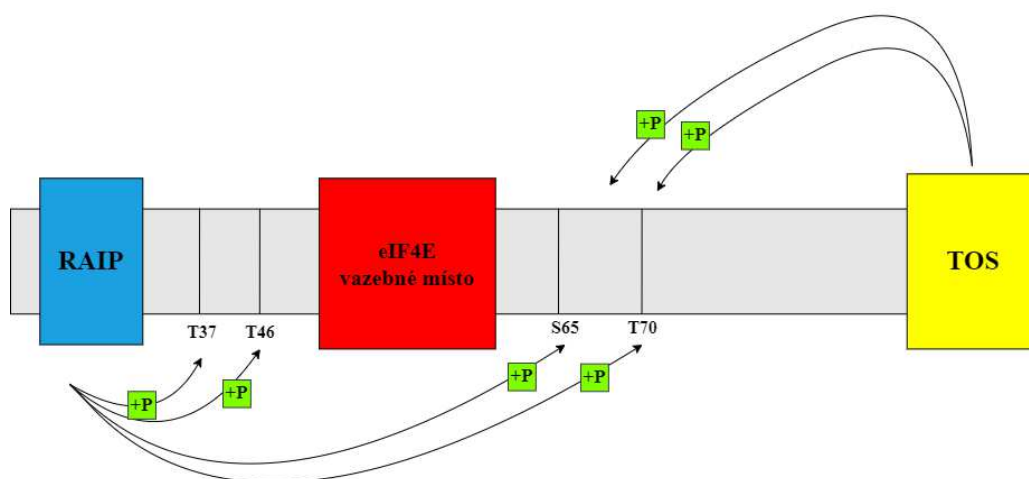
1.4.5 Ribozomální protein S6 kinázy beta-1 (S6K1)

Jedná se o 70 kDa velký protein, jež je členem rodiny proteinkináz AGC. Jak už název napovídá, jeho cílovým substrátem je ribozomální protein S6. Fosforylace S6 signalizuje syntézu proteinů na ribozomu. S6K1 se skládá ze čtyř různých domén: N-terminální doména, kinázovou doména, linkerová oblast a C-terminální doména. Na C-terminální doméně se vyskytují čtyři fosforylační místa: Ser411, Ser418, Ser424 a Thr421, která jsou zaměřena na prolin. Aktivita S6K1 je regulována postupnými fosforylacemi na více místech serinu/threoninu. První krok aktivace je uvolnění vazby mezi C-terminální doménou a N-terminální doménou. Následně dojde k fosforylaci čtyř výše uvedených fosforylačních míst v C-terminální doméně a Thr389 v hydrofobním motivu, který se nachází ve všech AGC kinázách. Fosforylace těchto zbytků je nutná pro aktivaci S6K, protože samotná C-terminální doména inhibuje fosforylaci jiných fosforylačních míst. Fosforylace C-terminálních míst je zprostředkována mitogenem aktivovanou proteinkinázou in vitro. Posledním krok aktivace zahrnuje fosforylaci Thr229 v T-smyčce pomocí PDK1.

Aktivovaný S6K1 fosforyluje S6 protein, který se nachází na malé 40S podjednotce eukaryotického ribozomu. Tento proces zvyšuje rychlost mRNA translace. Rapamycin inhibuje fosforylaci a aktivaci S6K1 a tím dochází i k inhibici fosforylace ribozomálního S6 proteinu čili i mRNA translace (Hannan et al., 2003; Showkat et al., 2014; Yaguchi et al., 2020).

1.4.6 Protein 4E-BP1

Protein 1 vázající eukaryotický translační iniciační faktor 4E (4E-BP1) je kódován EIF4EBP1 genem. Patří do rodiny translačních proteinů, které působí jako inhibitory iniciace translace vazbou a inaktivací eIF4. Je jedním ze substrátů signální dráhy mTOR. Komplex mTORC1 fosforyluje 4E-BP1 společně s kinázou S6K1, tento krok vede ke stimulaci proteinové syntézy. Studie prokázaly, že 4E-BP1 může být fosforylován i jinými kinázami. Jeho zvýšená exprese způsobuje různá karcinogenní onemocnění. Kromě vazebného eIF4E obsahuje další regulační motivy – motiv RAIP na N-konci a motiv signalizace mTOR (TOS) na C-konci (Obrázek 5). Motiv TOS je přítomen také na S6K1, PRAS 40 a dalších substrátech proteinu mTOR. RAIP je nezbytný pro fosforylaci zbytků na obou koncích 4E-BP1. Protein 4E-BP1 inhibuje iniciaci translace vazbou na translační faktor eIF4E, který je důležitou složkou komplexu, jež rekrutuje 40S ribozomální podjednotku na 5' cap mRNA. Pokud je 4E-BP1 fosforylován na několika místech (Thr37/46, Thr70, Ser65 atd.), dojde k uvolnění vazby mezi eIF4E a 4E-BP1, čímž dojde k iniciaci translace mRNA. Jako jeden ze dvou nejdůležitějších substrátů mTOR hraje 4E-BP1 klíčovou roli v signalizaci mTORC1 pro řízení translace a buněčné proliferace. Vědci prokázali, že fosforylace 4E-BP1 může vyvolat epiteliálně - mezenchymální transformaci, migraci a invazi rakovinných buněk (Qui et al., 2016; Zhang et al., 2018).



Obrázek 5: Struktura proteinu 4E-BP.

Protein se skládá z regulačních motivů RAIP a TOS (motiv signalizace kinázy mTOR). 4E - BP1 (protein 1 vázající eukaryotický translační iniciační faktor 4E) je fosforylován na několika místech: Threonin37/46/70 a Serin65, to vede k uvolnění vazby mezi eIF4E a 4E-BP1 a aktivaci komplexu mTORC1 (Vytvořeno dle Showkat et al., 2014).

1.5 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR

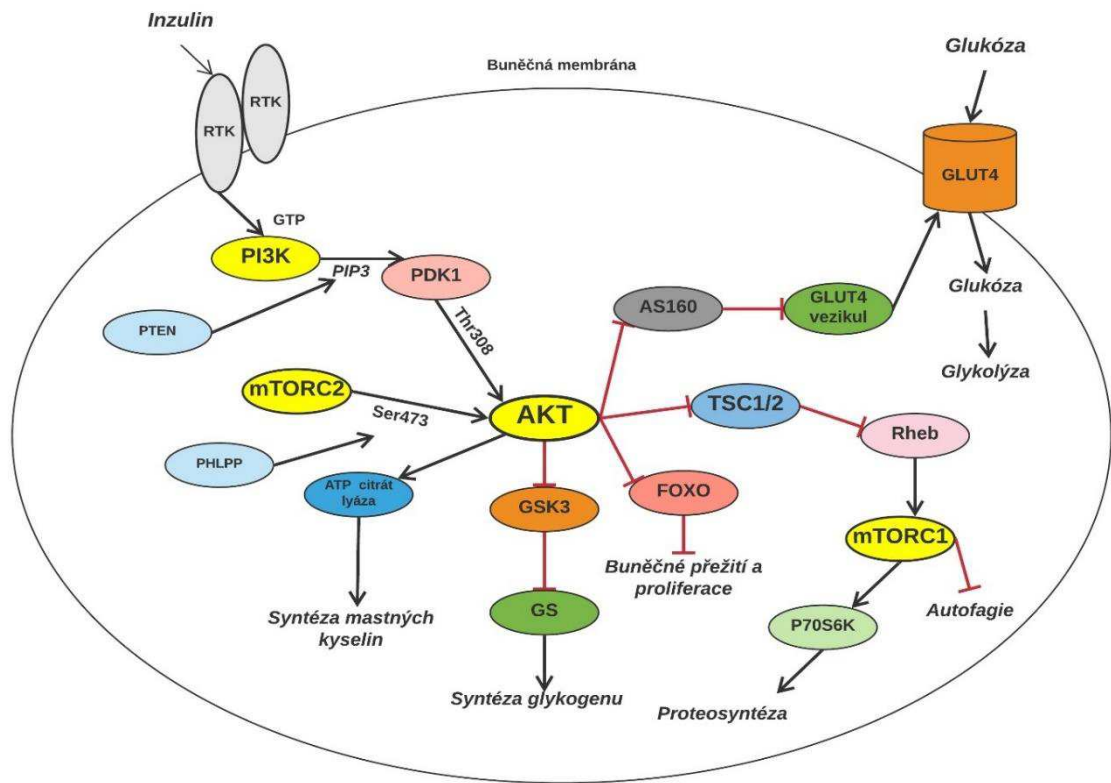
Dráha reguluje downstream proteiny, které mají vliv na buněčný cyklus, proliferaci, buněčný metabolismus (translace, transkripce) a další buněčné procesy (Obrázek 6). Celá signalizace začíná na povrchu buněčné membrány prostřednictvím tyrosinkinázových receptorů (RTK). Jsou to inzulinové receptory, které musí být dimerizovány, aby dosáhly aktivního stavu a signalizace mohla pokračovat dále. Molekuly inzulinu se naváží na RTK monomery, čímž spustí dimerizaci. Kinázové domény receptorů jsou fosforylovány a připraveny na další vazebné interakce. V tomhle momentě začíná downstream signalizace. Na inzulinový receptor se naváže protein PI3K, ale v deaktivovaném stavu. K aktivaci je potřeba GTP. Aktivovaný PI3K konvertuje PIP2 na PIP3 dodáním jednoho fosfátu, aby mohlo dojít k interakci s proteinem PDK1. PDK1 aktivuje kinázu Akt přímou fosforylací T-smyčky na Thr308.

Aktivovaná kináza Akt je teď takovým rozcestníkem různých inhibičních a stimulačních dráh. Mezi nejdůležitější inhibiční dráhu patří Akt/TSC1/TSC2. Proteiny TSC1/2 jsou negativní regulátory Rheb, hlavního aktivátora mTOR komplexu 1. Inhibicí těchto proteinů dochází tedy k aktivaci Rheb a následně i mTORC1. Aktivní mTORC1 dále aktivuje P70S6K kinázu, která vede k syntéze proteinů.

Prostřednictvím fosforylace je kináza Akt schopna inhibovat AS160, což je negativní regulátor translokace GLUT4 (glukózový transportér typu 4). Pokud tedy dojde k deaktivaci AS160, buňka je schopná translokovat GLUT4 obsahující vezikuly do buněčné membrány a dovolit glukóze vstoupit dovnitř buňky a podstoupit glykolýzu.

Dalšími proteiny, které jsou regulovány pomocí kinázy Akt, jsou FOXO a glykogensyntáza kináza 3 (GSK3). FOXO proteiny patří mezi transkripční faktory a negativně regulují expresi genů zapojených do buněčného růstu, proliferace, diferenciaci a dlouhověkosti. Kináza Akt tedy podporuje růst buňky a její proliferaci. GSK3 inhibuje glykogensyntázu (GS), která vede k syntéze glykogenu. Inhibovaná GS snižuje syntézu glykogenu v játrech a svalech a dochází k hyperglykémii. To je důvod, proč je GSK3 spojována s progresí mnoha onemocnění, jako je diabetes, obezita, karcinogeneze a Alzheimerova choroba. Abychom nebrali kinázu Akt pouze jako inhibitora, tak zároveň podporuje syntézu mastných kyselin stimulací citrát lyázy. Díky těmto procesům chápeme, proč je kináza Akt tak důležitý při onemocněních spojených s inzulinovou rezistencí nebo u vývoje již dříve zmíněného diabetu či karcinogeneze.

Tato signalizační dráha může být aktivována i deaktivována. K deaktivaci slouží PTEN neboli homolog fosfatázy a tenzinu, který konvertuje PIP3 zpátky na PIP2, jež není schopen interagovat s PDK1. Obdobně to tak je i u fosfatázy PHLPP, která defosforyluje kinázu Akt na její serinové doméně Ser473 (Papa et al., 2019).



Obrázek 6: Signální dráha PI3K/Akt/mTOR.

Zde je schéma signální kaskády, které se účastní mnoho proteinů. Postupnou aktivací či inhibicí dílčích částí dochází k důležitým buněčným procesům, jako je syntéza mastných kyselin, syntéza glykogenu, proteosyntéza, buněčné přežití spolu s proliferací, nebo dokonce autofagie.

RTK - tyrosinkinázové receptory, **PI3K** - fosfatidylinositol-3-kináza, **PDK** - fosfoinositid dependentní kináza, **PTEN** - homolog fosfatázy a tenzinu, **Akt** - proteinkináza B, **mTORC1/2** - savčí cíl rapamycinu komplex 1/2, **GSK3 β** - glykogensyntáza kináza 3 beta, **GS** – glykogensyntáza, **FOXO** - transkripční faktor, **TSC1/2** - komplexy tuberózní sklerózy, **Rheb** - Ras homolog obohacený v mozku, **P70S6K**-ribosomální protein S6 kináza 70kDa, **AS160** – Akt substrát 160 kDa, **GLUT4** - glukózový transportér typu 4, **PHLPP** – proteinová fosfatáza bohatá na leucin, **GTP** – guanosintrifosfát, **PIP3** - fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát, **Thr** - threonin, **Ser** – serin

2. Inhibitory dráhy mTOR

Signální dráha mTOR je zodpovědná za správný buněčný růst, proliferaci, metabolismus a angiogenezi. Dysregulace signálních drah závislých na mTOR mají za následek různá lidská maligní onemocnění, proto se stala atraktivním terapeutickým cílem při vývoji léků. Nádorové buňky prokázaly vyšší citlivost k inhibitorům mTOR než buňky normální. Dráha mTOR je často aktivována u mnoha typů maligních nádorů. Vývoj léků známých jako inhibitory dráhy mTOR byl obrovským pokrokem. V současné době máme k dispozici několik inhibitorů dráhy mTOR. Rapamycin neboli sirolimus, byl definován jako první protirakovinná látka v preklinických modulech. Špatná rozpustnost a farmakokinetika rapamycinu měla za následek vývoj několika analogů: temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), či deforolimus (AP23573). Všechny analogy jsou shrnuty v tabulce níže (Tabulka 1)

Temsirolimus a everolimus byly schváleny v roce 2007 a 2009 Americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu pokročilého karcinomu ledviny (Wander et al., 2011). Tyto deriváty rapamycinu byly široce využívány hlavně jako imunosupresiva po transplantacích ledvin a jater, nebo k léčbě určitých typů rakoviny a k léčbě komplikací tuberózní sklerózy, což je genetická porucha vedoucí k aberantní aktivaci mTORC1. Analogy rapamycinu působí prostřednictvím vazby s vazebným proteinem FKBP12 a tvoří komplex, který se poté naváže na doménu (FRB) oddělenou od katalytického místa mTOR, čímž zablokuje funkci mTOR a v mnoha případech zpomalí vývoj nádoru, či podpoří autofagii. I když byly původně analogy rapamycinu vyvinuty s úmyslem lepších farmakologických vlastností, jejich účinek byl omezen na určité typy rakoviny. Objev, že mTORC2 přímo fosforyluje kinázu Akt, přineslo nový pohled na věc a podnítilo to úsilí vyvinout druhou generaci inhibitorů mTOR, které jsou schopny cílit na oba komplex proteinu mTOR.

Některé studie vylučují široká použití rapamycinu a jeho analogů jako činidlo pro prodloužení života z důvodu negativních vedlejších účinků jako je glukózová intolerance, hyperlipidémie, hypertriglyceridémie, hypercholesterolémie, inzulinová rezistence a vzniklý diabetes, anémie a trombocytopenie, dermatologické příhody, gastrointestinální poruchy, respirační a močové infekce či dysfunkce varlat. Většina z uvedených vedlejších účinků se zdá být reverzibilní, zejména dermatologické a testikulární vedlejší účinky, zatímco imunologické důsledky jsou extrémně závažné a občas vedou k úmrtí na infekce. K těmto vedlejším účinkům přispívá narušení mTORC2, neboť chronická léčba rapamycinem inhibuje mTORC2 *in vivo* ve většině tkání (Arancibia et al., 2019; Arriola et Lamming, 2016).

2.1 Rapamycin a jeho analogy

Na půdě Velikonočního ostrova, známého jako Rapa Nui, byl rapamycin poprvé objeven roku 1975 jako antifungální metabolit produkovaný bakterií *Streptomyces hygroscopicus*, která byla schopna inhibovat proliferaci kvasinky *Candida albicans*. Následně bylo zjištěno, že rapamycin má imunosupresivní a antiproliferativní vlastnosti u savčích buněk, což vedlo k přijetí rapamycinu jako standardní terapie prevenci rejekce štěpu u příjemců transplantátu a k léčbě autoimunitních poruch. V roce 1999 byl rapamycin schválen jako imunosupresivní lék v USA. Je známo, že rapamycin akutně inhibuje mTORC1, zatímco mTORC2 je poměrně necitlivý na rapamycin a k narušení mTORC2 *in vivo* je nutná prodloužená, chronická expozice léku. Fakt, že mTORC2 přímo fosforyluje nejdůležitější kinázy přežití - Akt, nutí vědce vyvinout nový typ léčiva, zejména pro léčbu rakovin charakterizovaných hyperaktivní kinázou Akt. Krátce po objevu inhibičních vlastností rapamycinu započaly studie, které potvrdily další schopnosti, a to prodloužení životnosti u kvasinek, červů, much, dokonce je schopný prodloužit střední i maximální délku života samic i samců u heterogenních myší nebo účinnost proti myším onemocněním spojených s věkem (Lamming et al., 2013; Li et al., 2014; Zhavoronkov, 2015; Zhou et al., 2013).

Temsirolimus je ester rapamycinu s dihydroxymethylpropionovou kyselinou. Vědci ho navrhli tak, aby zvýšil rozpustnost rapamycinu a mohl být podáván jak orálně, tak intravenózně. Temsirolimus byl navržen v 90. letech 20. století a následně vyvinut jako činidlo pro léčbu pacientů s rakovinou. Hlavní funkcí je potlačení aktivity mTOR. Preklinické studie ukázaly silný inhibiční účinek na růst v šesti z osmi nádorových buněčných linií s IC 50. Stejně tak v různých zvířecích modelech nádorů, jako jsou gliomy, karcinom pankreatu či dokonce spinocelulární karcinom hlavy a krku vykazoval temsirolimus také významnou protinádorovou aktivitu, jak už sám, nebo v kombinaci s chemoterapeutiky. Kromě toho byl temsirolimus zkoumán v několika klinických studiích pro léčbu pokročilého neuroendokrinního karcinomu.

Everolimus je druhou generací derivátu sirolimu. Byl vyvinut s lepšími farmakologickými vlastnostmi a lepší metabolickou stabilitou ve srovnání se sirolimem. V roce 2011 FDA schválilo použití everolimu u pacientů s progresivními neuroendokrinními nádory pankreatického původu. Kromě toho se vědci zabývali studií everolimu u pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic, pokročilým karcinomem žaludku a pokročilým hepatocelulárním karcinomem. Doktoři navíc everolimus předepisují k léčbě pokročilého karcinomu prsu (Roskoski, 2019). Ridaforolimus, další analog rapamycinu, byl také zkoumán

v klinických studiích, konkrétně v pokročilých sarkomech kostí a měkkých tkání a také v pokročilých solidních nádorech (Klawitter et al., 2015; Zhou et Huang, 2013).

2.2 ATP-kompetitivní inhibitory dráhy mTOR

Pro silnější inhibici mTOR byla vyvinuta skupina ATP-kompetitivních inhibitorů, které cílí jak na komplex mTORC1, tak i na komplex mTORC2. Na rozdíl od temsirolimu nebo everolimu jsou schopné zastavit buněčný růst nebo dokonce vyvolat apoptózu. Velice účinným inhibitorem je MLN0128. Má silné protinádorové účinky *in vitro* a *in vivo* a prošel klinickými testy pro nádory, jako je sarkom kostí a měkkých tkání, karcinom prsu, a lymfom primárního výpotku. Je účinným prostředkem u nádorů, které jsou rezistentní na rapamycin nebo chemoterapii. Nedávná studie ukazuje, že MLN0128 může snížit velikost nádoru o 20 % u PIK3CA-mutantních kolorektálních karcinomů či v modelu xenograftu pankreatických neuroendokrinních nádorů odvozeného od pacienta.

Tokinib (PP242) je další selektivní ATP-kompetitivní inhibitor mTOR, který silně působí proti několika typům rakoviny, jako je leukémie, karcinom žaludku a tlustého střeva. Na rozdíl od rapamycinu dokáže inhibovat mTORC2. Vistusertib (AZD2014) společně se svým analogem AZD8055 jsou skvělými inhibitory při léčbě karcinomu prsu s pozitivním estrogenovým receptorem. Tyto inhibitory jsou vyvinuty společností AstraZeneca. Dokáží potlačit karcinom prsu získanou rezistencí na endokrinní terapii, paklitaxel (cytostatikum) či analogy rapamycinu (Sun, 2013).

2.3 Duální inhibitory signalizace PI3K/mTOR

Vzhledem k podobnosti mezi PI3K a mTOR mohou některé inhibitory působit v obou případech najednou. Tyto inhibitory mohou mít lepší protinádorovou aktivitu než inhibitory cílené pouze na mTOR. Mezi duální inhibitory řadíme dactolisib (NVP- BEZ235), omipalisib (GSK2126458), gedatolisib (PF05212384), nebo omipalisib (GSK2126458). Dactolisib inhibuje aktivitu několik proteinů včetně mTOR a PI3K. Může pronikat hematoencefalickou bariérou a díky tomu může být podáván při léčbě gliomu nebo k prolomení rezistence na temozolomid. Gedatolisib inhibuje růst nádorů v modelech xenoimplantátu prsu, plic, tlustého střeva a gliomu, také je velice účinný proti akutní lymfoblastické leukémii T-buněk. Kromě toho senzibilizuje karcinom hlavy a krku na radiační terapii. V kombinaci s ostatními duálními inhibitory mají vyšší účinnost. Omipalisib je perorální inhibitor působící na životaschopnost nádorových buněk FGFR4-V550E (Hua et al., 2019).

Tabulka 1: Přehled tříd inhibitorů mTOR.

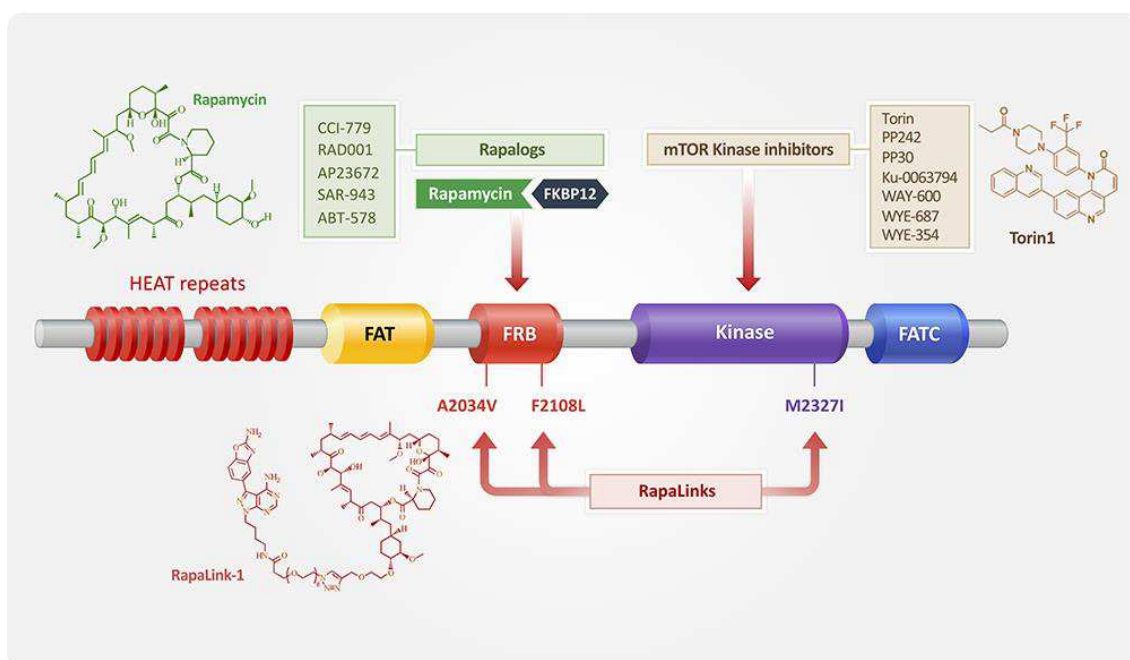
Class of inhibitor	Action	Representative drugs	Pipeline status
mTORC1 inhibitors (Rapalogs)	Bind allosterically to block FKBP-12 binding and inhibit mTORC1	Sirolimus (rapamycin; Wyeth), Everolimus (RAD001; Novartis), Temsirolimus (CCI-779; Wyeth), Ridaforolimus (AP23573; ARIAD and MK-8669; Merck)	FDA approved
mTORC1/2 inhibitors (mTORKI or TORkinibs)	Bind to ATP-binding site of mTOR kinase to inhibit mTORC1 and mTORC2	AZD2014, AZD8055 (AstraZeneca) OSI-027 (OSI) INK128 (Intellikine) CC-223 (Celgene) PP242, PP30 (University of California) Torin-1, Torin-2 (Harvard)	Clinical/preclinical
Dual PI3K/mTORC1/2 inhibitors	Inhibit PI3K, mTORC1, and mTORC2	NVP-BEZ235 (Novartis) XL765 (Exelixis) GSK2126458 (GlaxoSmithKline) SF1126 (Semafore) PF-04691502, PF-05212384 (Pfizer) PI-103 (Merck)	Clinical/preclinical

Abbreviations: FDA, Food and Drug Administration; mTOR, mechanistic target of rapamycin.

První třída analogů rapamycinu inhibuje mTORC1 prostřednictvím vazby FKBP12. Druhá třída inhibitorů se již zaměřuje na inhibici obou komplexů mTOR. Poslední třídou jsou duální inhibitory, které cílí jak na mTOR, tak na PI3K. Vědci se domnívají, že tyto inhibitory mají velmi slibnou budoucnost, co se týče léčby onemocnění vzniklých dysregulací dráhy mTOR. Inhibitory 2. a 3. třídy prozatím nejsou schváleny FDA, neboť jsou stále v procesu zkoumání (Altomare et Gitto, 2015).

2.4 Třetí generace inhibitorů dráhy mTOR

Jisté mutace v proteinu mTOR snižují účinnost základních a duálních inhibitorů v nádorových buňkách. Substituce aminokyselin (A2034V a F2108L) v doméně FRB narušuje senzitivitu na rapamycin. Somatická mutace v kinázové doméně indukuje rezistenci vůči ATP kompetitivnímu inhibitoru AZD8055. To vede k hyperaktivaci dráhy mTOR. Z toho důvodu byla vyvinuta třetí generace inhibitorů, která má překonat rezistenci na léky vzniklou mutací v kinázové nebo FRB doméně (Obrázek 7). Tyto inhibitory kombinují vysokou afinitu k FRB doméně komplexu mTORC1 s účinnou inhibicí kinázy mTOR prostřednictvím MLN0128. Inhibitor MLN0128 je účinnější než rapamycin, protože účinněji inhibuje 4EBP1, ale má krátký retenční čas *in vivo* ve srovnání s rapamycinem. RapaLink, hlavní zástupce této generace byl vytvořen kombinací rapamycinu a MLN0128. Na rozdíl od rapamycinu má zvýšenou účinnost vůči 4EBP1 a je schopen se vázat na FKBP12 - to zlepšuje jeho retenční čas *in vivo*. RapaLink účinně působí v buňkách s rezistencí vůči rapamycinu a jeho analogům (Yoon, 2020).



Obrázek 7: Působení všech generací inhibitorů dráhy mTOR.

Inhibitory dráhy mTOR první generace - rapamycin a jeho analogy („Rapalogs“) snižují aktivitu mTOR interakci s FRB doménou. Druhá generace inhibitorů (Torin, PP242) soutěží s ATP o vazbu na kinázové doméně proteinu mTOR. RapaLink, inhibitor signalizace mTOR třetí generace, byl vyvinut za účelem překonání omezení předchozích inhibitorů mTOR, neboť mutace domény FRB (substituce AMK A2034V, F2108L) a mutace kinázové domény (M2327I) přispívají k rezistenci mTOR na základní a duální inhibitory mTOR (Yoon, 2020).

3. Vliv dráhy mTOR na onemocnění

Protože signalizace mTOR reguluje základní vitální buněčné funkce včetně buněčného cyklu, proliferace, růstu a přežití, stejně jako proteosyntézu či metabolismus glukózy, její dysregulace vede k vážnému onemocnění. Údaje o solidních nádorech prokázaly, že dráha mTOR je dysregulována u téměř 30 % případů malignit a je jednou z nejčastěji postižených kaskád u lidských nádorů. Signalizace mTOR je u karcinomů aktivována třemi hlavními mechanismy. Prvním mechanismem je mutace v mTOR genu, která vede k hyperaktivní mTOR signalizační kaskádě. Za druhé se jedná o mutace v komplexech mTORC1 a mTORC2, jež vedou k aktivaci signalizace mTOR. Rictor, který je součástí mTORC2 bývá amplifikován u nemalobuněčného a spinocelulárního karcinomu plic. Jeho nadměrná exprese zvyšuje aktivitu komplexu mTORC2, čímž se nádorové buňky stávají proliferativnějšími a invazivnějšími. Jako poslední a zároveň nejdůležitější abnormalitou je mutace v upstream genech, tzn. mutace spojené se ztrátou funkce v supresorových genech a mutace, jež podporují zisk funkcí onkogenů. U složek signální dráhy PI3K se vyskytují různé druhy mutací, jako třeba amplifikace kinázy Akt nebo receptorů růstových faktorů. Ztráta tumor supresorových genů PTEN, p53 či TSC1/TSC2 také podporují aktivaci mTOR v patologickém stavu. Nejčastěji mutovaným genem u lidské rakoviny je p53 a PTEN. PTEN může být negativně regulován proteinovou nestabilitou, metylací nebo intracelulární lokalizací. Jeho mutace ovlivňují buňky u myelomu, rakoviny prsu a rakoviny endometria. Inhibice negativních regulátorů mTOR – TSC1/2 je zodpovědná za onemocnění tuberózní sklerózy a vede k benigním nádorům. Jejich mutace nacházíme u karcinomu močového měchýře, ledviny a pankreatických neuroendokrinních tumorů.

Downstream efekторы 4E-BP1, eIF4E a S6K1 také souvisí s různými malignitami. eIF4E je onkogen nadměrně exprimován u mnoha lidských rakovin se špatnou prognózou a jeho amplifikace vede k transformaci buněk *in vivo*. S6K1 je nadměrně exprimován u rakoviny plic a vaječníků a bylo zjištěno, že jeho genová exprese je upregulovaná u mozkových nádorů (Tian et al., 2019).

3.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je celosvětově závažným zdravotním problémem a u žen představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí na maligní onemocnění. Patogeneze je ovlivněna endogenními a exogenními hormony nebo fyziologickými a genetickými faktory. U karcinomu prsu je výskyt většiny genetických změn a mutací před proteinem mTOR, což vede k hyperaktivaci

signalizace. U nádorů prsu je často mutován gen PIK3CA, který je lokalizován v exonu 9 (helikální doména) a exonu 20 (kinázová doména). Mutace PIK3CA se vyskytly u 20–50 % karcinomů prsu, zejména 35 % karcinomů prsu pozitivních na hormonální receptor, 23 % karcinomů prsu s pozitivním receptorem lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2) a méně než 10 % u triple – negativního karcinomu prsu. HER2 je nadměrně exprimován u 20 – 30 % karcinomů prsu. Na membránové receptory HER1, HER2, HER3 a HER4 jsou připojovány různé ligandy, což způsobuje aktivaci dráhy PI3K/Akt. Kromě mutace genu PIK3CA k aktivaci dráhy přispívá navíc mutace Akt1 či ztráta PTEN. Absence PTEN se objevuje až u 30 % případů karcinomu prsu.

Běžnou terapií karcinomu prsu je kromě operace a chemoterapie také endokrinní terapie. Endokrinní terapie hraje v léčbě karcinomu prsu klíčovou roli. Bylo zjištěno, že endokrinní terapie je účinná u cca 50 % pacientek s pozitivním estrogenovým receptorem (ER). Růst, proliferace a metastazování nádorových buněk závisí na hormonech, které se váží na jejich speciální receptory. U karcinomu prsu se jedná o estrogenové a progesteronové receptory. Cílem této léčby je blokáce vazby ženských pohlavních hormonů na již zmíněné receptory nádorových buněk. Tamoxifen byl první účinnou terapeutickou látkou, která vykazovala skvělé výsledky, neboť inhibuje růst nádorových buněk kompetitivní inhibicí hormonálních receptorů. Pozdější studie ukázaly, že na rozvoji tohoto onemocnění se podílejí i signální dráhy receptoru růstového faktoru. Mutace PI3K, ztráta PTEN či aktivace kinázy Akt podporují rezistenci na hormonální terapii, z toho důvodu se při vývoji nové léčby vědci zaměřují kromě estrogenového receptoru právě na tyto signální dráhy. Everolimus je perorální analog schválený FDA jako protinádorové činidlo u karcinomu prsu s pozitivním ER a negativním HER2. Kromě analogů byly zkoumány také kompetitivní inhibitory ATP a duální inhibitory PI3K/mTOR. AZD2014 prokázal velmi dobré antiproliferativní schopnosti v buněčných liniích prsu. MLN128 dokázal inhibovat životaschopnost buněk v pěti buněčných liniích prsu. Duální inhibitory – BEZ235 a PF-04691502 sice prokázaly protinádorovou aktivitu, ale způsobovaly vážné vedlejší účinky v klinické praxi. Momentálně probíhá vývoj nových kombinačních terapií (Miricescu et al., 2021; Li et al., 2021).

3.2 Obezita

Při rozvoji obezity či inzulinové rezistence je tuková tkáň kritickým orgánem. mTORC1 reguluje tvorbu a lipogenezi tukové tkáně a je klíčový pro adipogenezi, čili formování adipocytů (tukových buněk) z buněk kmenových. Úloha mTORC1 byla zkoumána u transgenních myší. Bylo zjištěno, že ablace dráhy mTORC1 indukuje snížení tukové tkáně a rezistenci vůči obezitě vyvolané dietou. Tuková tkáň existuje dvojího typu, bílá tuková tkáň (WAT) a hnědá tuková tkáň (BAT). BAT se dále dělí na hnědé adipocity a béžové adipocity. WAT slouží k ukládání energie ve formě kapiček TAG a BAT má termogenní vlastnosti, rozptyluje energii prostřednictvím dýchání a produkci tepla. Zahřívací schopnost může získat i WAT. Tento proces se nazývá “hnědnutí”, je stimulován katecholaminem a vyžaduje mTORC1 a Raptor. Myši, které jsou léčené rapamycinem nebo jim v genetické výbavě chybí Raptor, mají chladovou intoleranci a schopnost hnědnutí je výrazně snižena. Další studie potvrdily, že chronická léčba rapamycinem vedla ke zvýšenému energetickému výdeji a aktivitě BAT, tzn. dříve obézní myši byly štíhlejší. Bohužel účinek rapamycinu také vedl ke zhoršené glukózové toleranci a inzulinové rezistenci. Úloha mTORC2 v tukové tkáni u myší byla zkoumána pomocí delece jádrové složky Rictor. Deficit této části blokuje diferenciaci BAT, posouvá metabolismus BAT do oxidativnějšího a méně lipogenního stavu a chrání myši před metabolickými poruchami nebo obezitou. mTORC2 se také podílí na procesu hnědnutí WAT. Ztráta mTORC2 v BAT způsobuje intoleranci chladu v důsledku defektního vychytávání glukózy. mTORC2 reguluje velikost tukových buněk, metabolismus glukózy, lipidů a diferenciaci BAT (Mao et Zhang, 2019; Ye et al., 2019).

3.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejrozšířenějším typem demence, jež se vyskytuje po celém světě. Jedním z hlavních rizikových faktorů progresu AD je stárnutí. Mozek AD je charakterizován akumulací plaků tvořených převážně peptidem amyloid-beta, a neurofibrilárními klubky tvořenými abnormálně hyperfosforylovaným tau proteinem v neuronech. 4EBP1 společně s p70S6K1 způsobují hyperfosforylaci tau proteinu, což vede ke vzniku neurofibrilárních klubek. Zvýšené hladiny zmíněných složek signalizace mTOR v neuronech mozku AD jenom podporují tvrzení, že signalizace mTOR je zapojená do této problematiky. Bylo zjištěno, že hladiny fosforylovaného eIF4E jsou 100krát vyšší v mozcích AD ve srovnání s fyziologickými kontrolami. Vědci jeví velký zájem o potencionální lék rapamycin za účelem prodloužení života laboratorních zvířat, neboť je v současnosti

nejúčinnějším farmakologickým přístupem k přímému zacílení na proces buněčného stárnutí. Bylo prokázáno, že prodlužuje délku života myši o 10 až 30 %, v případě dlouhotrvajícího pravidelného režimu až o 60 %. Kromě účinků na delší život ukázalo, že má rapamycin příznivé účinky u několika různých myších modelů AD vykazující samotnou amyloidózu nebo primární tauopatii. Rapamycin má do budoucna velmi dobré vyhlídky, co se týče terapie neurodegenerativních onemocnění způsobené stárnutím. Kromě studií s rapamycinem se výzkum zabýval genetickou inhibicí mTOR, která byla schopna zachránit paměťové deficity, zlepšit kognitivní funkce nebo dokonce snížit depozita tau proteinu a peptidu amyloid-beta. Snížení signalizace mTOR nejen prodloužilo životnost, ale snížilo patologii související s věkem, včetně ztráty citlivosti na inzulín nebo motorické dysfunkce (Kaeberlein et Galvan, 2019; Mueed et al., 2019; Pei et Hugon, 2008).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se mTOR. Je zřejmé, že tato kináza a signální dráhy na ní závislé mají velmi významnou roli v mnoha fyziologických buněčných procesech. Dysregulace signální dráhy PI3K/Akt/mTOR vede k různým patologiím. Hyperaktivace dráhy PI3K/Akt/mTOR byla zkoumána u mnoha typů nádorových onemocnění.

Kináza mTOR je hlavním efektozem kinázy Akt. Hyperaktivace mTOR způsobena hyperaktivací enzymu Akt vede k nekontrolovatelnému růstu buněk. Nadměrný růst je typickým znakem karcinogeneze. Mutací, nebo ztrátou určitých komponent signální dráhy PI3K/Akt/mTOR dochází k různým nádorovým onemocněním, např. kolorektální karcinom, karcinom prsu, žaludku nebo k neurodegenerativním chorobám jako je Alzheimerova choroba. V závislosti na typu mutace jsou voleny určité inhibitory. Rapamycin slouží k inhibici mTORC1, v některých případech je ale navíc nutná i inhibice komplexu mTORC2, nebo PI3K. Takové inhibitory nazýváme duální, mají vyšší účinnost než inhibitory cílené na jednotlivé komplexy.

Ve své bakalářské práci jsem se také zaměřila na patologie vyvolané dysregulací mTOR, a to karcinom prsu, obezita a Alzheimerova choroba. Ve všech případech se jedná o závažná onemocnění, která mohou vést i ke smrti. U karcinomu prsu jsou nejvíce pozorovány dvě změny: mutace genu PIK3CA a ztráta PTEN. Obě vedou k hyperaktivaci celé signalizace. Obezita je momentálně velmi častým onemocněním, které postihuje přibližně 30 % světové populace. Bylo zjištěno, že dráha mTOR má na rozvoji obezity určitý podíl, neboť její ablace snižuje tukovou tkáň. Také podávání rapamycinu má pozitivní účinky na vyšší výdej energie. Kromě toho, aktivace mTOR negativně potencuje rozvoj neurodegenerativních onemocnění. Inhibicí této dráhy dochází k prodloužení délky života a snížení výskytu patologií rostoucích s věkem.

Pochopení dějů v rámci buněčných signalizací spojených s různými patologiemi vede k vývoji dalších inhibitorů, které se následně využívají jako léčiva. Tento proces má však před sebou ještě dlouhou cestu, neboť některé buněčné procesy jsou stále neobjasněny.

Použitá literatura

1. ALTOMARE, D. a S. GITTO. Recent insights into the pathophysiology of mTOR pathway dysregulation. *Research and Reports in Biology*. 2015, 11. ISSN 1179-7274.
2. ARANCIBIA, J., T. P. LABBÉ a J. A. RÍOS. MTOR, autofagia y cáncer: ad portas del nuevo decreto de la Ley Ricarte Soto. *Revista médica de Chile*. 2019, **147**(5), 674-676. ISSN 0034-9887.
3. ARMIJO, M. E., T. CAMPOS, F. FUENTES-VILLALOBOS, M. E. PALMA, R. PINCHEIRA a A. F. CASTRO. Rheb signaling and tumorigenesis: mTORC1 and new horizons. *International Journal of Cancer*. 2016, **138**(8), 1815-1823. ISSN 00207136.
4. ARRIOLA APELO, S.I. a D. W. LAMMING. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2016, **71**(7), 841-849. ISSN 1079-5006.
5. BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*. 2008, **410**(1), 1-17. ISSN 0264-6021.
6. BAI, X. a Y. JIANG. Key factors in mTOR regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2010, **67**(2), 239-253. ISSN 1420-682X.
7. BAR-PELED, L. a D. M. SABATINI. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell Biology*. 2014, **24**(7), 400-406. ISSN 09628924.
8. BEN-SAHRA, I. a B. D. MANNING. MTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*. 2017, **45**, 72-82. ISSN 09550674.
9. BETZ, C., D. STRACKA, C. PRESCIANNOTTO-BASCHONG, M. FRIEDEN, N. DEMAUREX a M. N. HALL. MTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(31), 12526-12534. ISSN 0027-8424.

10. CARROLL, B., V. I. KOROLCHUK a S. SARKAR. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino Acids*. 2015, **47**(10), 2065-2088. ISSN 0939-4451.
11. CARSILLO, T., A. ASTRINIDIS a E. P. HENSKE. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, **97**(11), 6085-6090. ISSN 0027-8424.
12. DÜVEL, K., J. L. YECIES, S. MENON, et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Molecular Cell*. 2010, **39**(2), 171-183. ISSN 10972765.
13. FAWAL, M., M. BRANDT a N. DJOUDER. MCRS1 Binds and Couples Rheb to Amino Acid-Dependent mTORC1 Activation. *Developmental Cell*. 2015, **33**(1), 67-81. ISSN 15345807.
14. GEDALY, R. MTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion. *SOJ Immunology*. 2015, **3**(1), 1-10. ISSN 23720948.
15. HANNAN, K. M., G. THOMAS a R. B. PEARSON. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical Journal*. 2003, **370**(2), 469-477. ISSN 0264-6021.
16. HARDIE, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*. 2004, **117**(23), 5479-5487. ISSN 1477-9137.
17. HUA, H., Q. KONG, H. ZHANG, J. WANG, T. LUO a Y. JIANG. Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019, **12**(1). ISSN 1756-8722.

18. JABER, N., Z. DOU, J.-S. CHEN, et al. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(6), 2003-2008. ISSN 0027-8424.
19. KAEBERLEIN, M. a V. GALVAN. Rapamycin and Alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Science Translational Medicine*. 2019, **11**(476), 1-10. ISSN 1946-6234.
20. KIM, D., D.D. SARBASSOV, S. M. ALI, J. E. KING, R. R. LATEK, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST a D. M. SABATINI. MTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*. 2002, **110**(2), 163-175. ISSN 00928674.
21. KIM, J. a K. GUAN. MTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature Cell Biology*. 2019, 21(1), 63-71. ISSN 1465-7392.
22. KLAWITTER, J., B. NASHAN a U. CHRISTIANS. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2015, **14**(7), 1055-1070. ISSN 1474-0338.
23. KRYMSKAYA, V. P. Tumour suppressors hamartin and tuberlin: intracellular signalling. *Cellular Signalling*. 2003, **15**(8), 729-739. ISSN 08986568.
24. LAMMING, D. W., L. YE, D. M. SABATINI a J. A. BAUR. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*. 2013, **123**(3), 980-989. ISSN 0021-9738.
25. LANDEL, I., L. QUAMBUSCH, L. DEPTA a D. RAUH. Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2020, **11**(3), 225-227. ISSN 1948-5875.
26. LANE, D., V. I. KOROLCHUK, J. T. MURRAY, Y. RABANAL-RUIZ, E. G. OTTEN a V. I. KOROLCHUK. MTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in Biochemistry*. 2017, **61**(6), 565-584. ISSN 0071-1365.

27. LI, J., S. G. KIM a J. BLENIS. Rapamycin: One Drug, Many Effects. *Cell Metabolism*. 2014, **19**(3), 373-379. ISSN 15504131.
28. LI, X. a T. GAO. mTORC 2 phosphorylates protein kinase C ζ to regulate its stability and activity. *EMBO reports*. 2014, **15**(2), 191-198. ISSN 1469-221X.
29. LI, X. a X. YAN. Sensors for the mTORC1 pathway regulated by amino acids. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2019, **20**(9), 699-712. ISSN 1673-1581.
30. LI, Y., X. KONG, L. XUAN, Z. WANG a Y. HUANG. Prolactin and endocrine therapy resistance in breast cancer: The next potential hope for breast cancer treatment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021, **25**(22), 10327-10348. ISSN 1582-1838.
31. MAO, Z. a W. ZHANG. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(7), 2043. ISSN 1422-0067.
32. MARTELLI, A. M., G. TABELLINI, D. BRESSANIN, A. OGNIBENE, K. GOTO, L. COCCO a C. EVANGELISTI. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012, **1823**(12), 2168-2178. ISSN 01674889.
33. MIRICESCU, D., A. TOTAN, I. STANESCU-SPINU, S. C. BADOIU, C. STEFANI a M. GREABU. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(1). ISSN 1422-0067.
34. MORITA, M., S. GRAVEL, L. HULEA, O. LARSSON, M. POLLAK, J. ST-PIERRE a I. TOPISIROVIC. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle*. 2015, **14**(4), 473-480. ISSN 1538-4101.
35. MUEED, Z., P. TANDON, S. K. MAURYA, R. DEVAL, M. A. KAMAL a N. K. PODDAR. Tau and mTOR: The Hotspots for Multifarious Diseases in Alzheimer's Development. *Frontiers in Neuroscience*. 2019, **12**, 1-14. ISSN 1662-453X.

36. NELLIST, M., O. SANCAK, M.A GOEDBLOED, et al. Distinct effects of single amino-acid changes to tuberin on the function of the tuberin–hamartin complex. *European Journal of Human Genetics*. 2005, **13**(1), 59-68. ISSN 1018-4813.
37. PAPA, A., PANDOLFI, P. P. The PTEN–PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*. 2019, **9**(4) 153. ISSN 2218-273X.
38. PEI, J. a J. HUGON. MTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008, **12**(6b), 2525-2532. ISSN 15821838.
39. QIN, X., B. JIANG a Y. ZHANG. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*. 2016, **15**(6), 781-786. ISSN 1538-4101.
40. ROSKOSKI, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*. 2019, 144, 19-50. ISSN 10436618.
41. SHIOI, T., J. R. MCMULLEN, P.M. KANG, P. S. DOUGLAS, T. OBATA, T. F. FRANKE, L. C. CANTLEY a S. IZUMO. Akt/Protein Kinase B Promotes Organ Growth in Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology*. 2002, **22**(8), 2799-2809. ISSN 0270-7306.
42. SHOWKAT, M., M. A. BEIGH a K. I. ANDRABI. MTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Molecular Biology International*. 2014, **2014**, 1-14. ISSN 2090-2182.
43. SUN, S. MTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Letters*. 2013, **340**(1), 1-8. ISSN 03043835.
44. SWITON, K., K. KOTULSKA, A. JANUSZ-KAMINSKA, J. ZMORZYNSKA a J. JAWORSKI. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*. 2017, **341**, 112-153. ISSN 03064522.

45. TIAN, T., X. LI a J. ZHANG. MTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(3) 755. ISSN 1422-0067.
46. TRAUT, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1994, **140**(1), 1-22. ISSN 0300-8177.
47. W., S. A., B. T. HENNESSY a J. M. SLINGERLAND. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *Journal of Clinical Investigation*. 2011, **121**(4), 1231-1241. ISSN 0021-9738.
48. WYANT, G. A., M. ABU-REMAILEH, E. M. FRENKEL, et al. NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. *Science*. 2018, **360**(6390), 751-758. ISSN 0036-8075.
49. YAGUCHI, M., S. IKEYA a A. KOZAKI. The activation mechanism of plant S6 kinase (S6K), a substrate of TOR kinase, is different from that of mammalian S6K. *FEBS Letters*. 2020, **594**(4), 776-787. ISSN 0014-5793.
50. YANG, Z. a X. MING. MTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases. *Obesity Reviews*. 2012, **13**, 58-68. ISSN 14677881.
51. YE, Y., H. LIU, F. ZHANG a F. HU. MTOR signaling in Brown and Beige adipocytes: implications for thermogenesis and obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2019, **16**(1), 1-14. ISSN 1743-7075.
52. YOON, M. Nanotechnology-Based Targeting of mTOR Signaling in Cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2020, **15**, 5767-5781. ISSN 1178-2013.
53. ZHANG, T., J. GUO, H. LI a J. WANG. Meta-analysis of the prognostic value of p-4EBP1 in human malignancies. *Oncotarget*. 2018, **9**(2), 2761-2769. ISSN 1949-2553.

54. ZHAVORONKOV, A. Inhibitors of mTOR in aging and cancer. *Oncotarget*. 2015, 6(42), 45010-4501. ISSN 1949-2553.
55. ZHOU, H. a S. HUANG. Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chinese Journal of Cancer*. 2013, 32(5), 8-18. ISSN 1000467X.