

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

**Inhibitory mTOR (mechanistic/mammalian target
of rapamycin) v terapii lidských onemocnění a
stárnutí**

Bakalářská práce

Autor: Ivana Stejskalová
Studijní program: B1407 - Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin
Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana Stejskalová**
Osobní číslo: **S15CH044BP**
Studijní program: **B1407 Chemie**
Studijní obor: **Toxikologie a analýza škodlivin**
Název tématu: **Inhibitory mTOR (mechanistic/ mammalian target of rapamycin) v terapii lidských onemocnění a stárnutí**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

The mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway is a master regulator of cell growth and metabolism. Deregulation of the mTOR pathway has been implicated in a number of human diseases such as cancer, diabetes, obesity, neurological diseases, and genetic disorders. Rapamycin, a specific inhibitor of mTOR, has been shown to be useful in the treatment of certain diseases.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] J. Li, S.G. Kim, J. Blenis, Rapamycin: one drug, many effects, Cell Metab. 19 (2014) 373-379. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001. [2] S.I. Arriola Apelo, D.W. Lamming, Rapamycin: An Inhibitor of Aging Emerges From the Soil of Easter Island, J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 71 (2016) 841-849. doi:10.1093/gerona/glw090. [3] B.K. Kennedy, J.K. Pennypacker, Mammalian Target of Rapamycin: A Target for (Lung) Diseases and Aging, Ann. Am. Thorac. Soc. 13 (2016) S398-S401. doi:10.1513/AnnalsATS.201609-680AW.

Vedoucí bakalářské práce: **PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. září 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **10. května 2019**

L.S.

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.
děkan

doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
vedoucí katedry

dne

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem čerpala. “

V Hradci Králové dne 10. 5. 2019

.....

Ivana Stejskalová

Poděkování:

Tato práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Jmenovitě bych ráda poděkovala PharmDr. Ondřejovi Benkovi, Ph.D. za pomoc při vypracování této práce, za poskytnutí odborných materiálů i za cenné rady a připomínky k tomuto textu. Dále bych chtěla poděkovat celé mé rodině a přátelům za trpělivost a podporování při sepisování práce.

Anotace

Enzym mTOR je proteinkinasa ze skupiny kinas podobných fosfatidylinositol-3-kinase (PIKK). mTOR reguluje mnoho buněčných procesů, jako je buněčný cyklus, metabolismus a proliferace. Je součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Deregulace této dráhy vede ke vzniku lidských onemocnění, např. různých druhů rakoviny, ale má vliv i na stárnutí. Tato práce poskytuje informace o signální dráze PI3K/Akt/mTOR a dále pak o inhibitech mTOR, které byly prokázány jako možná léčiva v terapii zmíněných onemocnění díky preklinickým a klinickým studiím. V práci je shrnuto využití těchto inhibitorů v léčbě nádorových onemocnění, ale i v procesu stárnutí.

Klíčová slova

mammalian target of rapamycin, fosfatidylinositol-3-kinasa, rakovina, rapamycin, stárnutí

Annotation

The mTOR enzyme is protein kinase from the group phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases (PIKKs). mTOR regulates many cellular processes such as cell cycle, metabolism and proliferation. It is part of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Dereglulation of this signaling pathway leads to development of human diseases for example various types of cancers but it affects the process of aging as well. The bachelor thesis provides information about signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and about mTOR inhibitors that have been tested in preclinical and clinical studies as potential drugs. In the bachelor thesis is summarized the use of these inhibitors in the treatment of cancer but also in the process of aging.

Keywords

mammalian target of rapamycin, phosphatidylinositol-3-kinase, cancer, rapamycin, aging

Obsah

Úvod	9
1 Historie	10
2 Co je to mTOR?.....	11
3 Komplexy mTOR.....	11
4 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR	14
4.1 Buněčná signalizace.....	14
4.2 Přehled signalizace mTOR	14
4.3 Aktivace PI3K.....	15
4.4 Akt	17
4.5 PTEN	17
4.6 TSC1/TSC2	18
4.7 S6K1 a 4E-BP1	18
5 Možnost léčby lidských onemocnění prostřednictvím inhibitorů mTOR	19
5.1 Přímé a nepřímé inhibitory mTOR	19
5.1.1 Nepřímé inhibitory mTOR – Rapamycin a jeho analogy.....	19
5.1.2 Přímé inhibitory mTOR – ATP-kompetitivní inhibitory	22
5.2 mTOR inhibitory v terapii stárnutí.....	24
5.3 Nová generace – RapaLink-1 a duální inhibitory PI3K/mTOR.....	25
6 Diskuze a závěr	28
Použitá literatura	29

Seznam zkratek použitých v textu

4E-BP1	4E-vazebný protein 1; <u>4E-binding protein 1</u>
AGC	skupina kinas obsahující rodiny PKA, PKG, PKC
Akt, PKB	proteinkinasa B
ATP	adenosintrifosfát
Deptor	<u>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</u>
eIF4E	eukaryotický translační iniciační faktor <u>4E</u>
EMA	<u>European Medicines Agency</u>
FDA	<u>Food and Drug Administration</u>
FKBP12	FK506 vazebný protein 12 kDa; <u>FK506 binding protein 12 kDa</u>
FRB domain	<u>FKBP12-rapamycin binding domain</u>
GAP	<u>GTPase activating protein</u>
GPCR	G-proteinové receptory; <u>G-protein-coupled receptor</u>
mLST8	<u>mammalian Lethal with SEC13 protein 8</u>
mSIN1	<u>mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</u>
mTOR	savčí cíl rapamycinu; <u>mammalian target of rapamycin</u>
mTORC1	savčí cíl rapamycinu komplex 1; <u>mammalian target of rapamycin complex 1</u>
mTORC2	savčí cíl rapamycinu komplex 2; <u>mammalian target of rapamycin complex 2</u>
PDK1	fosfoinositid-dependentní kinasa <u>1</u>
PDK2	fosfoinositid-dependentní kinasa <u>2</u>
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIKK(s)	kinasy podobné fosfatidylinositol-3-kinase; <u>phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases</u>
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PRAS40	<u>proline-rich Akt/PKB substrate of 40 kDa</u>
Protor	protein observed with rictor
PtdIns	fosfatidylinositol
PTEN	fosfatasa a tenzin homologu; phosphatase and tensin homolog
Raptor	<u>regulatory-associated protein of mTOR</u>
Rheb	<u>ras homolog enriched in brain</u>
Rictor	<u>rapamycin-insensitive companion of mTOR</u>
RTK	tyrosinkinasaový receptor; receptor of tyrosine-kinase
S6K1	<u>S6 kinasa 1</u>
TOR	<u>target of rapamycin</u>
TOR-KI	inhibitory TOR kinasy
TSC1	<u>tuberous sclerosis complex 1</u>
TSC2	<u>tuberous sclerosis complex 2</u>

Úvod

Při výběru tématu pro moji bakalářskou práci jsem narazila na problematiku mTOR. Po načtení několika odborných článků mě téma zaujalo, a proto jsem se rozhodla, že se v této práci zaměřím na inhibitory mTOR (mezi nejznámější patří rapalogy, tzn. rapamycin a jeho analogy) a jejich vliv v procesu stárnutí a léčby dalších lidských onemocnění.

mTOR (mammalian target of rapamycin; v překladu savčí cíl rapamycinu; v některých zdrojích lze nalézt i mechanistic target of rapamycin=mechanistický cíl rapamycinu) je proteinkinasa o velikosti přibližně 289 kDa, patří do skupiny kinas podobných fosfatidylinositol-3-kinase (PIKK), a která je specifická pro serin/threonin. mTOR, jako katalytická podjednotka, je součástí dvou různých proteinových komplexů, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) a mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), s odlišnými dalšími proteinovými složkami a substráty, z nichž známější je komplex mTORC1 [1–3].

Signální dráha PI3K/Akt/mTOR je hlavním regulátorem buněčného růstu a metabolismu. Deregulace této dráhy se podílí na vzniku řady lidských onemocnění, jako je rakovina plic, karcinom ledvin, obezita, diabetes a další neurologická onemocnění a genetické poruchy. Signální dráha PI3K/Akt/mTOR je tedy jednou z hlavních drah podílející se na procesu kancerogeneze a tudíž i centrem zájmu výzkumu a cílem onkologické léčby [1, 4].

Z klinických studií bylo prokázáno, že rapamycin a jeho rapalogy jsou účinné při léčbě některých onemocnění (rakovina, onemocnění plic, atd.) a mohou ovlivnit i proces stárnutí [4].

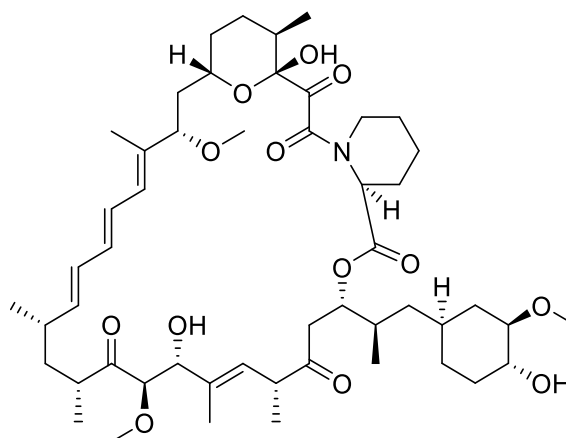
Cílem této práce je napsat rešerši na dané téma a shrnout dosavadní poznatky o enzymu mTOR, možnostech jeho ovlivnění s cílem terapie v konkrétních onemocněních a dále pak poznatky o inhibitech výše zmíněného enzymu s cílem léčby některých lidských onemocnění.

1 Historie

Enzym mTOR byl objeven později než jeho přirozený inhibitor rapamycin (sirolimus). Makrolid rapamycin, původně izolovaný z mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* (Obr. 1), byl nalezen na počátku 70. let v půdních vzorcích Velikonočního ostrova (známý jako Rapa Nui) ležícího v Jižním Pacifiku. Podle tohoto ostrova byla později také nalezená sloučenina pojmenována. Rapamycin přitáhl pozornost díky své schopnosti inhibovat růst *Candida albicans* (druh kvasinky, který u některých lidí způsobuje ústní a genitální houbové infekce) a dalších hub. Objev enzymu mTOR se tedy datuje až k pozdním sedmdesátým létům. Jiné zdroje zas hovoří o tom, že mTOR byl objeven až na počátku 90. let minulého století [5–7].

Rapamycin je sloučenina schválená Food and Drug Administration (FDA). Vyznačuje se protirakovinnými, imunosupresivními a silnými antifungálními (protiplísňovými) účinky. Je to silný a selektivní inhibitor proteinkinasy mTOR [5, 6].

Jako molekulární cíl rapamycinu byl u kvasinek popsán protein TOR (target of rapamycin), u savčích buněk byl identifikován jeho analog mTOR [8].



Obr. 1: Molekula rapamycinu ze *Streptomyces hygroscopicus*

2 Co je to mTOR?

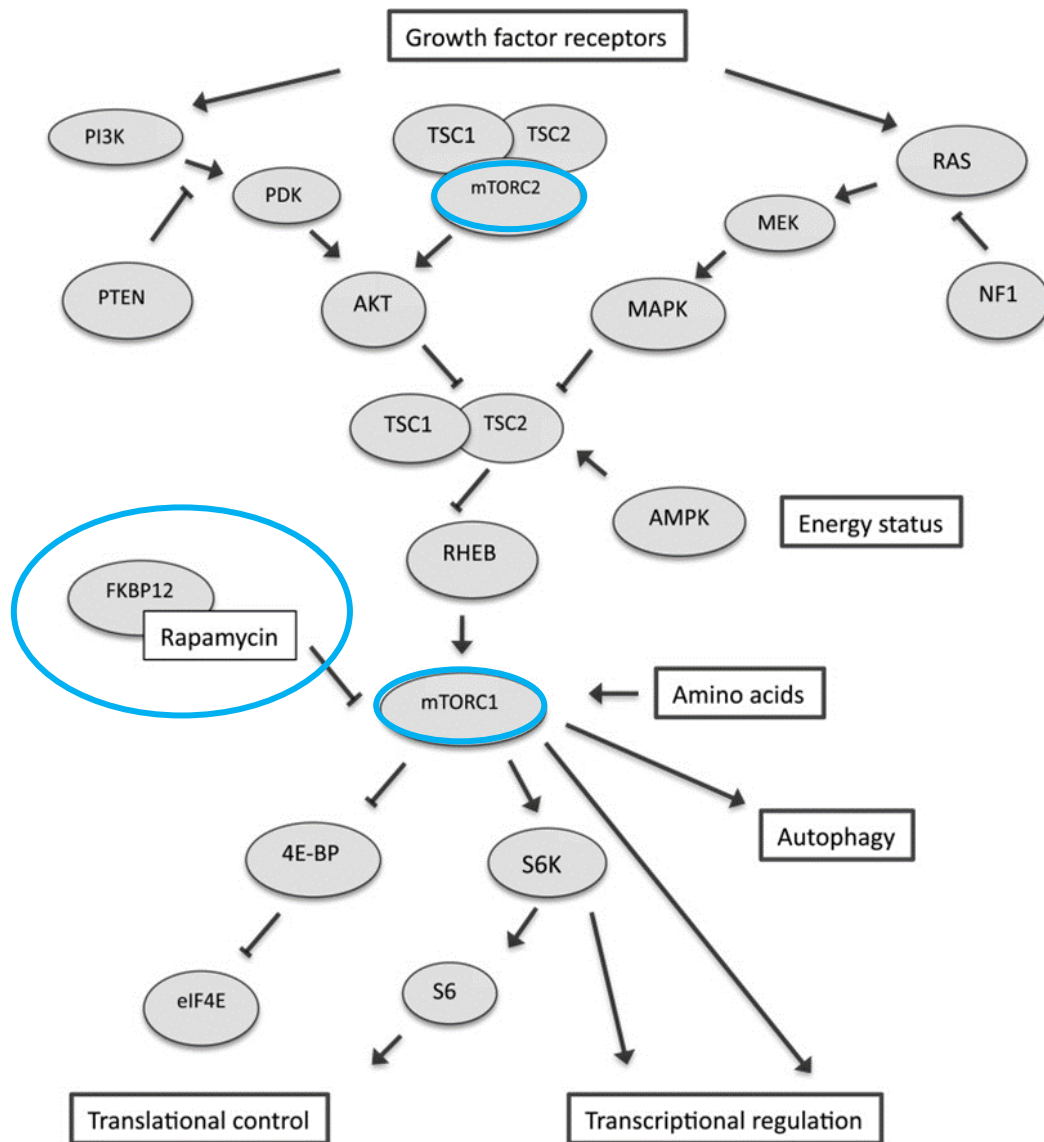
mTOR je serin/threoninová kinasa patřící do rodiny kinas podobných fosfatidylinositol-3-kinase (PIKK). Tato kinasa katalyzuje fosforylaci (přidání fosfátové skupiny) na serinových, někdy i threoninových, zbytcích bílkovin. Tento intracelulární protein rozhoduje o tom, jaké děje budou v buňce probíhat, zda anabolické či katabolické. Jak už bylo řečeno v úvodu této práce, molekula mTOR funguje jako regulátor buněčného cyklu. Hraje důležitou roli v buněčném metabolismu, dále pak kontroluje energetický stav buňky, množení buňky (proliferaci) a přežívání buněk (nádorových, endotelových, fibroblastů a dalších). Má vliv na novotvorbu krevních kapilár (angiogenezi), v tomto procesu se uplatňuje vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a hypoxií indukovaný faktor (HIF). Tyto faktory potřebuje myokard (srdeční sval) pro svůj růst a remodelaci, aby zajistil při zátěži adekvátní perfuzi (přiměřený průtok krve myokardem). Produkci těchto faktorů kontroluje právě mTOR. V případě nedostatku živin je mTOR neaktivní a tvorba proteinů je inhibována. V době nutričního nedostatku je pomocí mTOR aktivována autofagie [1, 8, 9].

Po objevu rapamycinu bylo zjištěno, že tento makrolid inhibuje proteinový komplex mTORC1. Ten obsahuje kinasu mTOR, která se vyskytuje i u druhého proteinového komplexu nazvaného jako mTORC2. Tyto bílkovinné komplexy se liší svou stavbou, funkcí a citlivostí na rapamycin. V další kapitole se podíváme na jejich stavební komponenty a funkci v buňce [5, 6].

3 Komplexy mTOR

Po objevu rapamycinu, kdy bylo definováno několik jeho vlastností a účinků (např. cytostatické účinky působící v celé řadě buněk, včetně rakovinných), molekulární analýzy ukázaly, že se rapamycin váže v cytoplazmě na **FKBP12 (FK506 vazebný protein 12kDa)** a vytváří s ním inhibiční komplex FKBP12-rapamycin (Obr. 2 – vyznačeno modře). Tento komplex se váže na **FRB doménu (FKBP12-rapamycin binding domain)** na mTOR kinase v mTORC1. Tato doména je specifická pouze pro mTORC1, a proto FKBP12-rapamycin inhibuje mTOR signalizaci mTORC1, avšak ne mTORC2 [7, 8, 10].

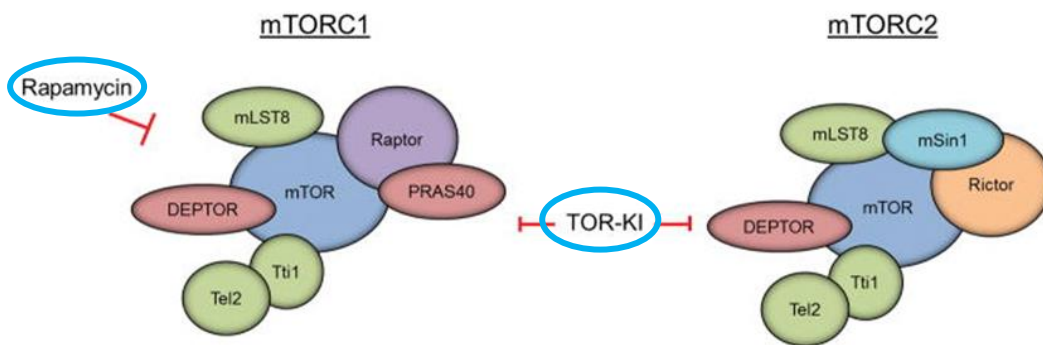
Z provedených studií byly objeveny již dva zmiňované proteinové komplexy, mTORC1 a mTORC2. Hlavním rozdílem mezi nimi je senzitivita na rapamycin. mTORC1 je akutně citlivý na rapamycin a má důležitou roli při regulaci syntézy proteinů a autofagie, zatímco mTORC2 je rezistentní vůči rapamycinu *in vivo* a podílí se na regulaci kinas skupiny AGC [2, 6, 7].



Obr. 2: Schéma signalizace buněk souvisejících s mTOR (převzato a upraveno z Ehninger et al. 2014) [11]

mTORC1 a mTORC2 mají několik shodných komponent (Obr. 3), jako například **mTOR proteinkinasu**, která působí jako centrální katalytická složka. Dále pak **mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8)** potřebný pro správnou funkci mTOR kiny a pomáhá také stabilizovat interakci mezi mTOR a Raptorem v mTORC1. **Raptor (regulatory-associated protein of mTOR)** je důležitý pro sestavení komplexu mTORC1, stejně tak jako **Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR)**, který je vyžadován pro stabilizaci, identifikaci substrátu a subcelulární lokalizaci mTORC2 na příslušná místa působení. **Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein)** funguje jako regulační podjednotka mTOR v mTORC1 a mTORC2. **Subkomplex Tti1/Tel2** je také složka

obou mTOR komplexů, mTORC1 a mTORC2, důležitá ke stabilizaci a sestavení komplexů mTOR. Subkomplex Tti1/Tel2 slouží jako stavební jednotka i u jiných kinas ze skupiny PIKK. **PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate of 40 kDa)** je regulační ojedinelá podjednotka mTORC1 vázající se na komplex přes Raptor. mTORC2 ještě navíc obsahuje **Protor (protein observed with rictor)**, který se váže uvnitř komplexu na Rictor, ale není potřebný pro stabilizaci mTORC2. Dále je mTORC2 tvořen podjednotkou **mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1)**, která je vyžadována pro subcelulární lokalizaci mTORC2 na plazmatickou membránu a potřebná pro správnou tvorbu mTORC2 [4–7, 12].



Obr. 3: Struktura proteinových komplexů mTORC1 a mTORC2 (převzato a upraveno z Kim et al. 2017) [7]

Na obrázku č. 3 (Obr. 3) nalezneme schématické znázornění dvou proteinových komplexů mTOR, mTORC1 a mTORC2. Jsou zde vidět výše zmiňované podjednotky komplexů a navíc fakt, že rapamycin je alosterický inhibitor mTORC1 (tuto vlastnost získá po navázání se na FKBP12) oproti inhibitorům TOR kinasy (TOR-KI) (lze vidět na obrázku 3 – vyznačeno modře), které inhibují aktivitu obou komplexů (viz kap. 5.1) [7].

4 Signální dráha PI3K/Akt/mTOR

4.1 Buněčná signalizace

Buněčná signalizace představuje buňku komunikující s okolními buňkami a reagující na podněty ve svém okolí. Buňka produkuje do svého okolí signální molekuly, těmi nejčastěji bývají hormony. Signální molekulu rozpoznají receptory na povrchu cílové buňky, která poté převádí signál pomocí vnitřní signalizační kaskády, jejímž konečným produktem je odpověď buňky na signál [13, 14].

Buněčná signalizace se dělí na mezibuněčnou a vnitrobuněčnou signalizaci. Při mezibuněčné signalizaci spolu buňky v organismu navzájem komunikují, kdežto u vnitrobuněčné, signalizace probíhá v rámci jedné buňky systémem signálních drah. Signální dráhy nebo též kaskády mají schopnost umožňovat buňce reagovat na přijatý signál a jsou spojené s mnoha buněčnými procesy, např. metabolismus, proliferace či apoptóza buněk (programovaná buněčná smrt). Vnitrobuněčná signalizace zahrnuje signální dráhu PI3K/Akt/mTOR [13, 14].

4.2 Přehled signalizace mTOR

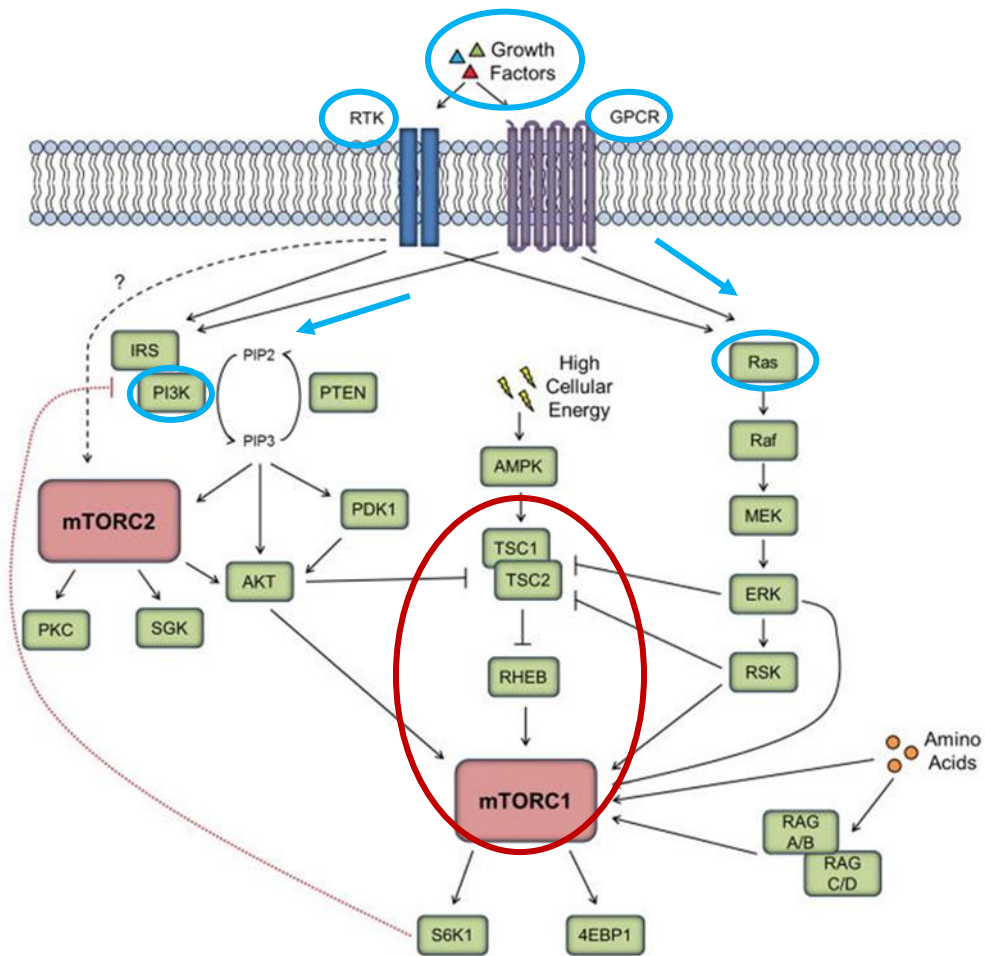
Klíčovým proteinem, regulujícím hned několik signálních drah, je proteinkinasa mTOR, která je tudíž i atraktivním terapeutickým cílem. Signalizace mTOR může být iniciována prostřednictvím ATP, růstových faktorů, hormonů, aminokyselin či jiných podnětů, které aktivují signální kaskádu PI3K/Akt/mTOR [9, 15].

Signální dráha PI3K/Akt/mTOR hraje důležitou roli nejenom při vzniku nádorového onemocnění, ale také při signalizaci v normálních buňkách. Tato cesta je zapojena do mnoha buněčných procesů, včetně proliferace, migrace, adheze, angiogeneze, transkripce, translace, růstu a přežití buněk. Aktivace této signální dráhy přispívá k patogenezi mnoha typů nádorových onemocnění, což směřuje k tomu, že cílená inhibice jednotlivých složek, včetně PI3K, Akt, PDK1 (fosfoinositid-dependentní kinasa 1) a mTOR, může být možnou strategií pro léčbu rakoviny [16, 17].

Počátek signalizace lze stručně popsat takto: molekula mTOR může být abnormálně aktivována v důsledku mutací v genech, které jsou zodpovědné za „upstream“ signalizaci, jako např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) nebo fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K). Na receptor, který je na povrchu cílové buňky, se naváže ligand (signální molekula), který se poutá na vazebné místo cílového proteinu (viz kap. 5.3). Poté se aktivuje fosfytydylinositol-3-kinasa a proteinkinasa B. PTEN (phosphatase and tensin homolog) naopak inhibuje aktivaci mTOR a Akt [9, 14].

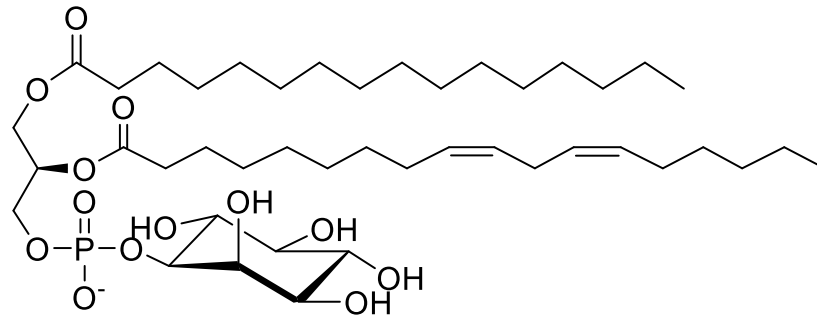
4.3 Aktivace PI3K

Lipidová kinasa PI3K je apikální molekulou signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Růstové faktory (ligandy vázající se na receptory) aktivují oba proteinové komplexy mTOR, prostřednictvím vazby receptorových tyrosinkinas (RTK) nebo G-proteinových receptorů (receptory sprážené s G proteinem; GPCR) a aktivují signální kaskádu PI3K nebo dráhu Ras-MAPK, což lze vidět na obrázku č. 4 (Obr. 4 – vyznačeno modře) [7, 9, 14, 18].



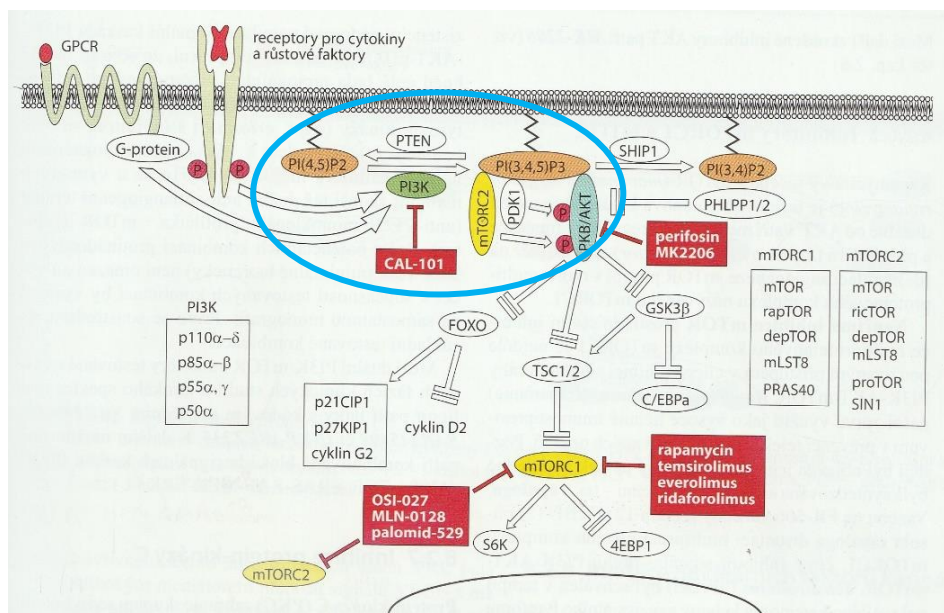
Obr. 4: Signální cesta mTOR (převzato a upraveno z Kim et al. 2017) [7]

Fosfatidylinositol-3-kinasy jsou enzymy fosforylující 3-OH konec inositolového kruhu fosfatidylinositolu (PtdIns) (Obr. 5). PtdIns jsou fosfolipidy ze skupiny glycerolfosfolipidů, které mají na fosfátové skupině navázaný cyklický alkohol inositol [16, 19].



Obr. 5: Fosfatidylinositol (PtdIns)

Aktivovaná fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K) katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) ve třetí pozici inositolového kruhu. Produktem této reakce je fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃) v membráně, který má funkci druhého posla a spolu s PDK1 aktivuje proteinkinasu B (Akt). Fosforylace PIP₂ na PIP₃ je díky PI3K u normální buňky negativně regulována fosfatasou PTEN. Ta defosforyluje PIP₃ na PIP₂ (Obr. 6 – vyznačeno modře) [7, 18, 20].



Obr. 6: Schématické znázornění inhibice signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (převzato a upraveno z Pavel et al. 2013) [18]

4.4 Akt

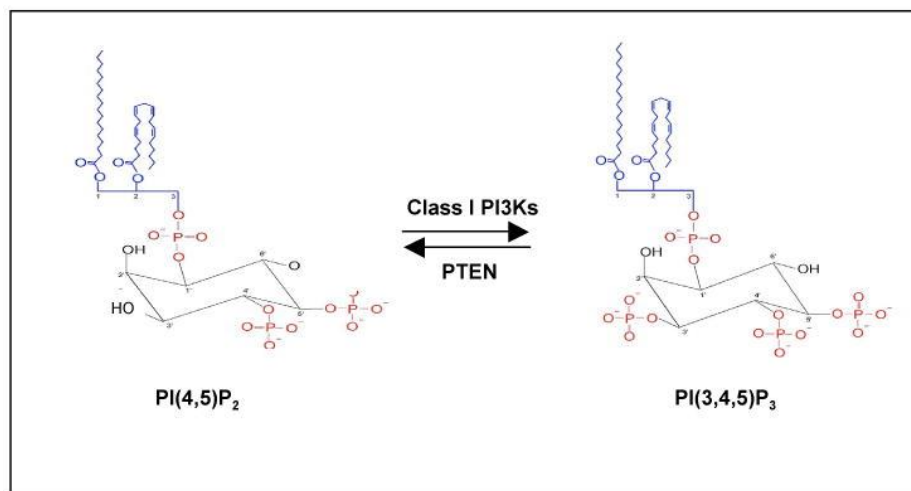
Akt je serin/threoninová kinasa, nazývaná také jako proteinkinasa B (PKB), která se řadí mezi AGC kinasy (skupina kinas obsahující rodiny PKA, PKG, PKC). Stejně jako ostatní kinasy třídy AGC potřebuje fosforylaci ke své aktivaci. Ta je zajištěna pomocí PDK1, avšak tou dojde jen k částečné aktivaci. Pro plnou je potřeba i fosforylace Akt pomocí PDK2 (fosfoinositid-dependentní kinasa 2). Akt se vyskytuje ve třech izoformách: Akt1, Akt2 a Akt3, ty jsou kódovány geny PKB α , PKB β a PKB γ . Všechny 3 izoformy se liší jen v několika aminokyselinách [17, 21–23].

Fosforylovaný a aktivovaný Akt se odpoutá od cytoplazmatické membrány a přemístí se do různých kompartmentů buňky (Golgiho aparát, jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum). Zde se účastní mnoha buněčných procesů. Akt má vliv na růst buňky skrze aktivaci mTORC1, dále pak zvyšuje proliferaci a přežití buněk, podílí se i na angiogenezi a metabolismu glukosy a lipidů [24].

Amplifikace izoform Akt byla pozorována u některých typů rakoviny. V případě amplifikace Akt1 se jedná o karcinom žaludku. Amplifikace Akt2 byla zjištěna u 10-20% případů s rakovinou pankreatu a jejích podtypů, u 12% s karcinomem vaječníků. Amplifikace izoform Akt1 a Akt2 se vyskytla i u rakoviny prsu [17].

4.5 PTEN

Phosphatase and tensin homolog (fosfatasa a tenzin homologu/PTEN) je lipidová fosfatasa, která negativně reguluje dráhu PI3K/Akt/mTOR. PTEN defosforyluje PIP3 na PIP2 (Obr. 7) [18, 21, 24].



Obr. 7: Fosforylace PIP2 na PIP3 (převzato z Liu et al. 2009) [21]

PTEN funguje jako důležitý nádorový supresor a ztráta jeho funkce může vést ke zvýšené aktivaci dráhy PI3K/Akt/mTOR. Ztráta funkce PTEN a jeho aktivita v rakovině se může projevit díky několika mechanismům, jako je např. mutace, methylace, nestabilita a fosforylace proteinů [17, 21, 25].

Bylo dokázáno, že mutace a delece PTEN se vyskytuje u mnoha typů nádorového onemocnění, jako je karcinom prostaty, prsu, močového měchýře, mozku a děložní sliznice (endometria) [17].

4.6 TSC1/TSC2

Další klíčovou komponentou v signalizaci mTOR je protein TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex 1/tuberous sclerosis complex 2). TSC1/TSC2 je znám jako tumor supresorový komplex a je to heterodimer proteinů hamartinu (TSC1) a tuberinu (TSC2). Ve zdravých buňkách tyto dva proteiny integrují růstové signály a informace o energetickém stavu, aby tak zajistili správný průběh buněčných procesů, jako je například buněčný růst. Proteiny TSC1 a TSC2 kódují geny *TSC1* a *TSC2*. Mutace těchto genů způsobuje dominantně autozomální onemocnění - tuberózní sklerózu. Tato nemoc je charakterizována hamartomy, tzn. benigními tumory (nezhoubné nádory). Hamartomy se vyskytují v orgánových systémech, včetně mozku, srdce, ledvin, plic a kůže. Interakce mTOR s komplexem TSC1/TSC2 vedla ke klinickému použití nepřímých inhibitorů mTOR v terapii léčby tuberózní sklerózy [20, 26–28].

Komplex proteinů TSC1/TSC2 je díky aktivitě GAP (GTPase activating protein) negativním regulátorem mTORC1. Komplex těchto dvou proteinů aktivuje GAP, aktivovaný GAP se naváže na Rheb (ras homolog enriched in brain), vzniká GTP-Rheb protein (GTPázová aktivita Rheb). Nastává hydrolyza, při které Rheb pomocí TSC1/TSC2 mění aktivní guanosintrifosfát (GTP) na neaktivní guanosindifosfát (GDP). Po aktivaci dráhy PI3K fosforyluje Akt tuberin (TSC2), což má za následek narušení komplexu TSC1/TSC2, který ztrácí svou regulační funkci a tímto způsobem dojde k aktivaci mTORC1 pomocí Rheb (Obr. 4 – na obrázku č. 4 vyznačeno červeně) [20, 28].

4.7 S6K1 a 4E-BP1

Pokud dojde k přenesení signálu z mTOR, tak se fosforylují a zároveň i aktivují dva zásadní „downstream“ proteiny, a to S6K1 (S6 kinasa 1) a 4E-BP1 (4E-binding protein 1). 4E-BP1 se podílí na regulaci translace, inhibuje eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eIF4E) a tvoří s ním komplex. Po fosforylaci 4E-BP1 je schopen uvolnit eIF4E. Tento proces vede k přímé iniciaci translace a ovlivňuje tak buněčný růst i celý buněčný cyklus [20, 29].

5 Možnost léčby lidských onemocnění prostřednictvím inhibitorů mTOR

Signální dráha PI3K/Akt/mTOR je hlavním regulátorem buněčného růstu a metabolismu. Deregulace této dráhy se podílí na vzniku řady lidských onemocnění, jako je karcinom plic a ledvin, diabetes, obezita a další neurologická onemocnění a genetické poruchy. Z klinických studií bylo prokázáno, že rapamycin a jeho analogy (tzv. rapalogy) jsou účinné při léčbě těchto onemocnění a mohou ovlivnit i proces stárnutí [4].

5.1 Přímé a nepřímé inhibitory mTOR

mTOR inhibitory lze rozdělit na 2 skupiny: přímé a nepřímé. Mezi nepřímé inhibitory patří rapamycin a jeho analogy, které ovlivňují pouze komplex mTORC1 (rapamycin po navázání se na FKBP12 může alostericky inhibovat mTORC1) oproti přímým inhibitorům TOR kinasy (TOR-KI) blokujícím katalytickou aktivitu obou komplexů (Obr. 3) [6, 7, 18].

Do **nepřímých** inhibitorů řadíme rapamycin (sirolimus) a jeho analogy, což jsou temsirolimus, everolimus, ridaforolimus (dříve nazýván jako deforolimus), zotarolimus a 32-deoxy-rapamycin [2, 18].

Přímé inhibitory jsou nízkomolekulární chemické sloučeniny, konkrétněji ATP-kompetitivní inhibitory TOR kinasy (kompetitivně inhibují vazbu ATP u obou komplexů), kam spadají inhibitory, jako jsou např. *PP242 (Torkinib)*, *Torin 1 a 2*, *inhibitory Ku*, atd. [6, 7, 18, 30].

V další kapitole se podíváme na některé inhibitory a jejich využití v terapii onemocnění.

5.1.1 Nepřímé inhibitory mTOR – Rapamycin a jeho analogy

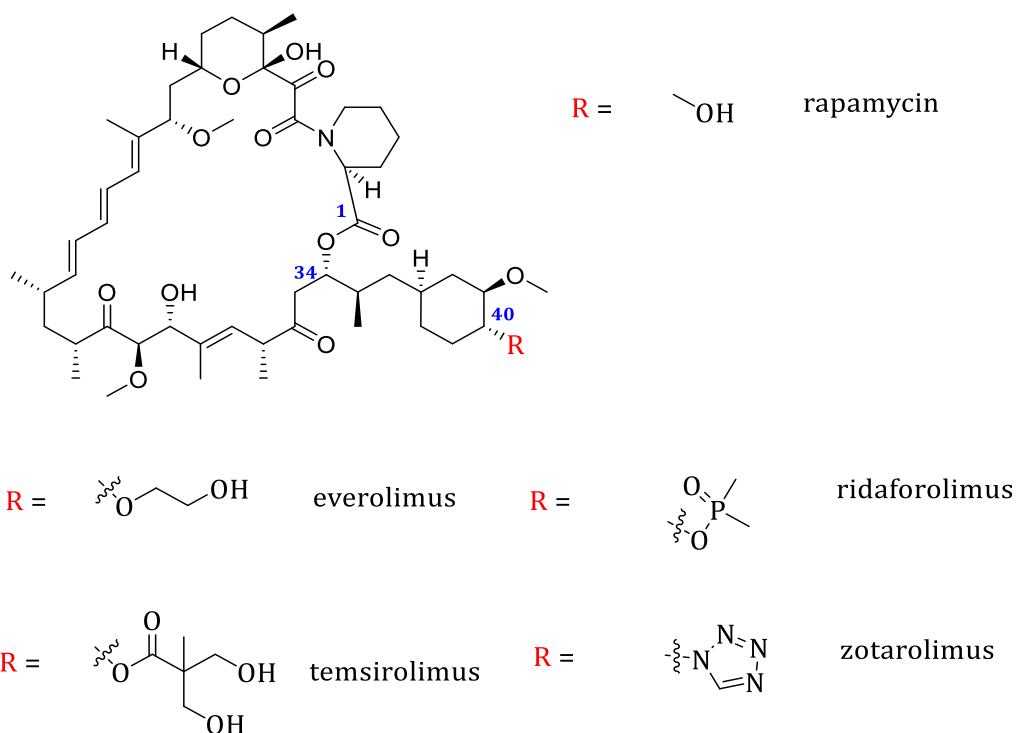
Rapamycin (v klinice nazýván jako sirolimus; obchodní název - Rapamune) je velmi využívaná sloučenina ve výzkumu stárnutí a léčby dalších onemocnění. Pro zlepšení farmakokinetiky léčiva, a také za účelem zvýšení účinnosti a specifiity, bylo syntetizováno několik dalších rapalogů (analogů rapamycinu) [2].

Mechanismus účinku je u všech rapalogů stejný, avšak není zcela znám. Nejprve se rapamycin (sirolimus) naváže v cytoplazmě na intracelulární protein FKBP12, se kterým vytváří inhibiční komplex FKBP12-rapamycin. Tento komplex „obsadí“

oblast C-konec mTOR kinasy v mTORC1, nazývanou jak FRB doména, a dochází tak k selektivní inhibici funkce mTORC1. Inhibiční komplex FKBP12-rapamycin inhibuje fosforylaci vybraných substrátů, které by po fosforylaci přenášely signál dále (tzv. „downstream“ proteiny, např. S6K1 nebo 4E-BP1). Výsledný efekt působí na buněčné funkce, např. zastavení dělení buněk či potlačení syntézy proteinů a iniciace autofagie. Komplex FKBP12-rapamycin se může také vázat na kalcineurin, kdy výsledným efektem je imunosupresivní účinek (využití v transplantacích). Rapamycin a jeho analogy se klinicky využívají buď jako protirakovinná léčiva (působením přes mTOR) nebo častěji jako imunosupresivní léčiva [8, 10, 11, 31–36].

Rapamycin/sirolimus byl původně popsán jako antibiotické činidlo. Jakožto první látka ze skupiny nepřímých mTOR inhibitorů, byl získán z mycelia půdního mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* v roce 1975. Vyznačoval se antifungálními účinky na houby rodu *Candida*, *Trichophyton* a *Microsporum*. Rapamycin je perorální látka s nízkou biologickou dostupností. Vyznačuje se také antiproliferativním účinkem, který byl testován na myších a lidských rakovinných buněčných liniích. Kvůli jeho špatné chemické stabilitě a rozpustnosti ve vodě byl vyloučen z klinického hodnocení jako protirakovinné léčivo a místo něho bylo syntetizováno několik jeho (polosyntetických) analogů [2, 5, 6, 8, 18, 31–33].

Mezi deriváty rapamycinu řadíme everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, zotarolimus a 32-deoxy-rapamycin (Obr. 8). Tyto analogy sdílí centrální makrolidovou chemickou strukturu, liší se pouze substituentem **R** v poloze **C40** struktury rapamycinu (lze vidět na obrázku 8). Mají také stejný mechanismus účinku [2, 18, 27, 31–33].



Obr. 8: Deriváty rapamycinu

Everolimus (RAD001) (obchodní název - Afinitor) je analog rapamycinu, který je v poloze C40 modifikovaný O-(2-hydroxyethyl)ovou skupinou. **Temsirolimus (CCI779)** (obchodní název - Torisel) je ester rapamycinu a dihydroxymethylpropionové kyseliny, který, na rozdíl od ostatních inhibitorů této skupiny, je pro léčivo. Jeho esterová vazba se v organismu rozštěpí a uvolní se tak vlastní účinný rapamycin. Temsirolimus byl navržen k tomu, aby zvyšoval rozpustnost rapamycinu, tudíž může být podáván nejen perorálně, ale i intravenózně. **Ridaforolimus (AP23573)** (dříve nazýván jako deforolimus) je derivát kyseliny fosfinové. Oproti temsirolimu není pro léčivo, má stabilní esterovou vazbu, která se neštěpí. **Zotarolimus** má ve své struktuře molekulu tetrazolu [9, 18, 31–33].

Tyto rapalogy se vyznačují, vůči rapamycinu, vyšší biologickou dostupností, příznivějšími farmakologickými a farmaceutickými vlastnostmi, lepší chemickou stabilitou, zvýšenou rozpustností ve vodě a kratším biologickým poločasem (everolimus 24-35 h, temsirolimus 13-25 h, ridaforolimus 45-74 h, oproti rapamycinu 60 h) [33, 37, 38].

Rapamycin a jeho analogy byly klinicky testovány v mnoha terapeutických oblastech. Rapamycin je sloučenina schválená Food and Drug Administration (FDA), která se (stejně jako ostatní rapalogy) zprvu používala jako vysoce účinná imunosupresivní látka v prevenci **rejekce (nepřijetí transplantátu organismem) transplantovaných orgánů**, např. ledvin, srdce nebo jater. Později tyto látky našly využití i jako **protirakovinné sloučeniny**, v roce 2007 byl temsirolimus schválen FDA a EMA (European Medicines Agency) jako protinádorové léčivo. Například ridaforolimus byl testován proti sarkomům (zhoubný nádor pojivové tkáně) [5, 6, 8, 9, 18, 31, 32, 39].

Nepřímé inhibitory vykazují při podávání poměrně nízkou toxicitu, avšak způsobují i některé **nežádoucí účinky**. Kvůli jejich imunosupresivnímu účinku může dojít k různým infekcím a ke kožním onemocněním. Dále mají rapalogy hepatotoxický účinek, způsobují také únavu, nauzeu, zvracení, hypertenzi, hyperglykemii, průjem, stomatitidu, atd. . Rapalogy jsou spojeny i s plicní toxicitou [31, 32].

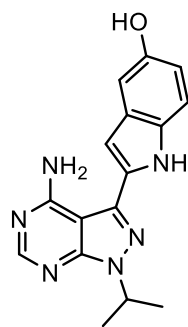
Rapamycin a jeho analogy byly rozsáhle studovány, a i když jsou klinicky slibné, výsledky těchto studií poukazují na určité vážné nevýhody těchto látek, např. že alostericky působí pouze na jeden z mTOR komplexů (mTORC1) v rámci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Jelikož je enzym mTOR součástí signalizační dráhy s PI3K, byly vyvinuty také duální inhibitory PI3K/mTOR. Ty by měly mít teoreticky zvýšenou účinnost, protože tuto signální dráhu blokují na dvou různých místech současně (viz kap. 5.3) [18, 32, 34].

5.1.2 Přímé inhibitory – ATP-kompetitivní inhibitory

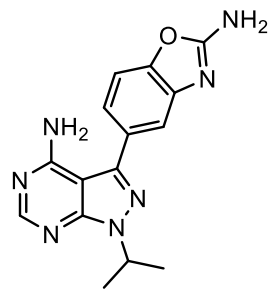
Přímé inhibitory jsou chemicky připravené látky, které (na rozdíl od nepřímých inhibitorů) necílí na FKBP12, ale přímo inhibují katalytickou aktivitu kinasy mTOR v obou komplexech (mTORC1 a mTORC2). Tyto inhibitory se kompetitivně váží na místo ATP v mTOR a vykazují rozsáhlou a selektivní inhibici signálu mTOR. Díky tomu, že blokují i mTORC2, nemůže dojít k deregulaci signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Přímé inhibitory se vyznačují antiproliferativními účinky i v buněčných modelech vykazující necitlivost vůči rapalogům [6, 7, 18, 27, 31, 32].

Mezi nejznámější ATP-kompetitivní inhibitory mTOR patří např. **PP242 (Torkinib)** (Obr. 9), tato pyrazolopyrimidinová sloučenina byla mezi prvními syntetizovanými látkami. Její derivát **INK128** (později přejmenovaný na **MLN0128**) (Obr. 9), vyvinutý firmou Intellikine, je testován ve 25 klinických studiích v terapii pokročilých solidních tumorů. Ve stejné kategorii byly objeveny také **Torin 1** a **Torin 2** (Obr. 9). Tyto sloučeniny syntetizovala chemická laboratoř Nathanael Grey na základě původní struktury chinolonu 1 (chemoterapeutikum), **Torin 2** se vyznačuje lepší stabilitou a biologickou dostupností. Sloučeniny **PP242** a **Torin 1** mají silný inhibiční účinek na buněčnou proliferaci a vykazují mnohem větší účinky než rapamycin. Dále byly připraveny laboratoří KuDOS Pharmaceuticals látky **Ku-0063794** (Obr. 9) a **Ku-0068650** s velkým antiproliferačním potenciálem proti buňkách karcinomu *in vitro*. Do přímých inhibitorů patří také např. sloučeniny **PP30, OSI-027, palomid-529, AZD8055, AZD2014, WAY-001** a jeho deriváty **WAY-600, WYE-687** a **WYE-354, TAK-228** nebo **CC-223**. Některé z nich lze vidět na obrázku č. 9 (Obr. 9). **AZD8055** a **AZD2014** jsou orálně biologicky dostupné sloučeniny odvozené od inhibitorů Ku. Část z výše zmíněných inhibitorů v současné době postoupila do klinického testování fáze I/II u neoplastických (nádorových) onemocnění [18, 30–32, 40, 41].

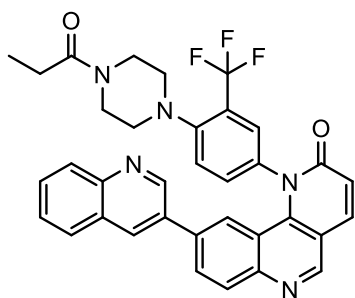
Použití těchto inhibitorů v předklinických a klinických testech ukázalo značný účinek, ale vyvolalo také obavy z **nežádoucích účinků** - toxicity. Tyto inhibitory jsou totiž mnohem toxičtější na buňky slinivky břišní než samotný rapamycin. Některé z ATP-kompetitivních inhibitorů se testují buď v preklinických nebo klinických studiích. Ve studiích fáze I vykazovaly inhibitory tolerovatelnou toxicitu. **INK128** a **AZD2014** byly úspěšné v klinických studiích fáze II při léčbě nádorových onemocnění. Bohužel žádný z těchto inhibitorů doposud nedokončil klinické studie fáze III nebo nebyl schválen k využití v praxi [27, 30, 31, 41].



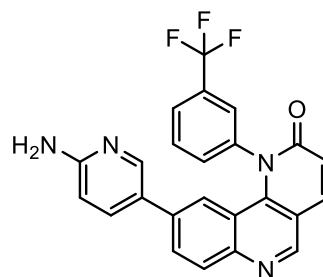
PP242 (Torkinib)



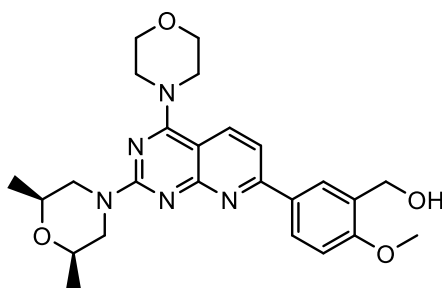
INK128 (MLN0128)



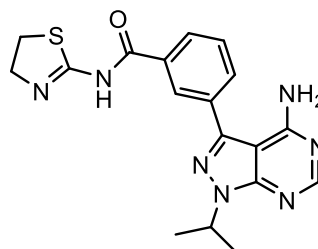
Torin 1



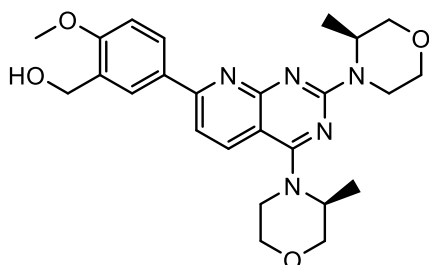
Torin2



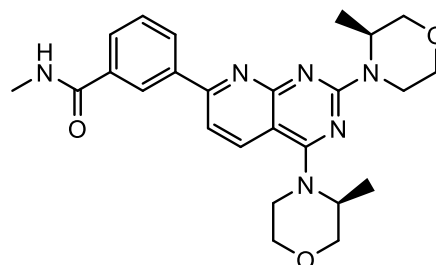
Ku-0063794



PP30



AZD8055



AZD2014

Obr. 9: Přímé inhibitory mTOR

5.2 mTOR inhibitory v terapii stárnutí

Stárnutí je součet onemocnění, která souvisí se zvyšujícím se věkem, od příznaků vrásek a presbyopie („stařecká vetchozrakost“) až po mrtvici a nádorová onemocnění. Stárnutí organismu je spojeno se stárnutím buněk, které je z části závislé na mTOR. Aktivní enzym mTOR způsobuje systémové hyperfunkce, které jsou také spojeny se stárnutím: např. zvýšený krevní tlak (hypertenze), zvýšená agregace krevních destiček (hyperagregace), zvýšená hladina cukru v krvi (hyperglykémie), zvětšení orgánů (hypertrofie) a další. Tyto hyperfunkce poškozují orgány s následkem ztráty některých buněčných funkcí. Dochází tedy tzn. k gerokonverzi, což je přechod organismu z klidového stavu do fáze stárnutí [42–44].

V posledních desetiletích byla klinickými studii ukázána možnost, že rapamycin a jeho deriváty mohou prodloužit život tím, že oddálí nástup onemocnění souvisejících s věkem a také, že zpomalují stárnutí [44, 45].

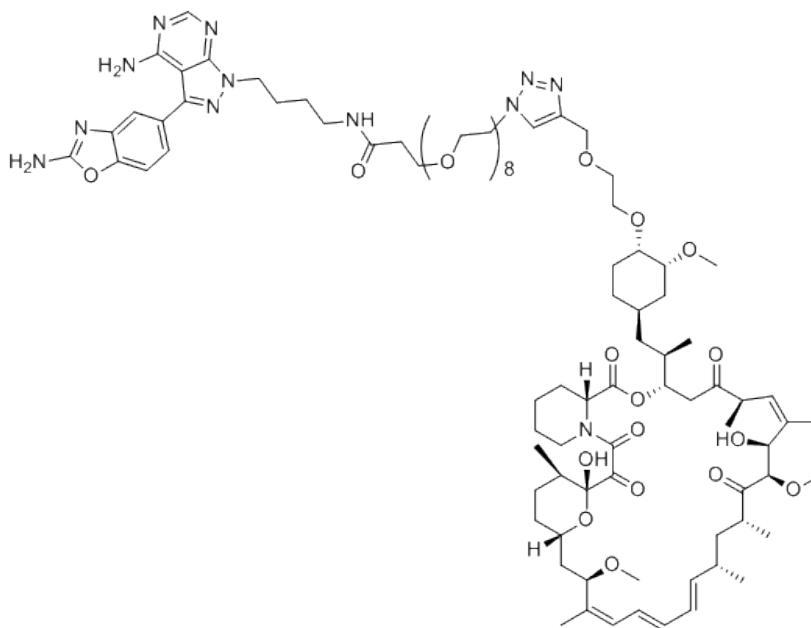
Ruský vědec **Michail Blagosklonnyj** studoval rapamycin v souvislosti se stárnutím. Tvrdil, že pokud rapamycin působí protirakovinně, mohl by zpomalovat i proces stárnutí. Rapamycin a jeho rapalogy testovala v souvislosti se stárnutím také firma **Novartis**. Zjistila, že rapamycin u myší snižuje řídnutí kostí spojené se stárnutím, omlazuje srdce a dokonce dokáže zvrátit průběh Alzheimerovy choroby. V roce 2009 bylo prokázáno, že rapamycin dokáže prodloužit život u myší. Vědci ho během studie podávali myším starším 20 měsíců. Život samců se prodloužil o 9%, u samic o 14% [42, 45, 46].

Překážkou při klinickém testování rapamycinu, jako léčiva na stárnutí, je jeho imunopresivní efekt, tzn. potlačení činnosti imunitního systému, pro který je využíván v transplantacích. Při podávání rapamycinu starším pacientům z hlediska léčby stárnutí se ukázalo, že se starší organismus oslabuje a to může vyvolat životu nebezpečnou infekci. Na druhou stranu, v roce 2014 vyšla studie, která poukazovala na experimenty vykonaných na dobrovolnících v Austrálii a na Novém Zélandu, který spočíval v léčbě pomocí derivátu **everolimu**. Everolimus zlepšil imunitní systém starších pacientů, avšak pokud byl podáván v omezených dávkách. Kromě rapamycinu je jako lék s účinky proti stárnutí zvažován i **metformin**, který pravděpodobně také účinkuje skrze inhibici dráhy PI3K/Akt/mTOR [45].

Metformin je široce používané antidiabetikum schválené FDA k léčbě diabetu typu II. Metformin aktivuje dráhu AMPK, což nakonec způsobuje inhibici dráhy mTOR a inhibici fosforylace „downstream“ proteinů mTORC1, S6K1 a 4E-BP1. Vědecké studie naznačují, že metformin prodlužuje délku života červů, hlodavců a *Caenorhabditis elegans* (hlístice). Zabraňuje také vzniku onemocnění souvisejících se stárnutím u lidí. V dnešní době je tedy zvažován jako možný lék proti stárnutí. Kombinace rapamycinu a metforminu je studována také pro léčbu nádorových onemocnění [18, 42, 43, 47, 48].

5.3 Nová generace: RapaLink-1 a duální inhibitory PI3K/mTOR

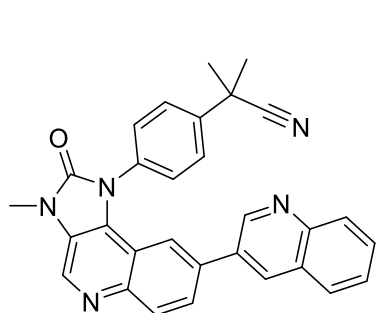
Kromě přímých a nepřímých inhibitorů mTOR byl nedávno vyvinut inhibitor pojmenovaný jako **RapaLink-1**. Jedná se o kombinaci přímého inhibitoru mTOR (ATP-kompetitivního inhibitoru mTOR) a rapamycinu v rámci jedné molekuly (Obr. 10). To umožňuje sloučenině současně interagovat s FRB doménou mTORC1 a i ATP vazebným místem mTOR kinasy. RapaLink-1 má (narozdíl od rapamycinu) také schopnost inhibovat aktivitu kinasy mTOR v komplexu mTORC2, avšak přesné molekulární mechanismy nejsou ještě plně objasněny. Výsledky studií naznačují, že RapaLink-1 je účinnější než přímé i nepřímé inhibitory mTOR. Probíhají ale také preklinické studie s cílem zjistit, zda má či nemá RapaLink-1 imunosupresivní účinky. RapaLink-1 byl také navržen jako možná nová alternativa k léčbě alkoholismu (AUD) [30, 32, 40, 49].



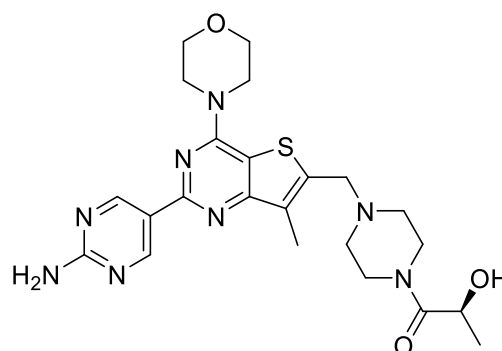
Obr. 10: Molekula RapaLinku-1 [50]

Dalšími inhibitory, které potlačují aktivitu mTOR, jsou **duální inhibitory PI3K/mTOR**, které ale navíc ještě inhibují PI3K. Teoreticky by měly mít zvýšenou účinnost, protože signální dráhu PI3K/Akt/mTOR blokují na dvou různých místech současně. V porovnání s rapalogy by mohly mít lepší účinky v protinádorové léčbě, protože inhibují PI3K zároveň s mTOR. Oba cíle jsou součástí jedné signální dráhy podporující růst rakovinných buněk, a proto je výhodné je obě inhibovat zároveň.

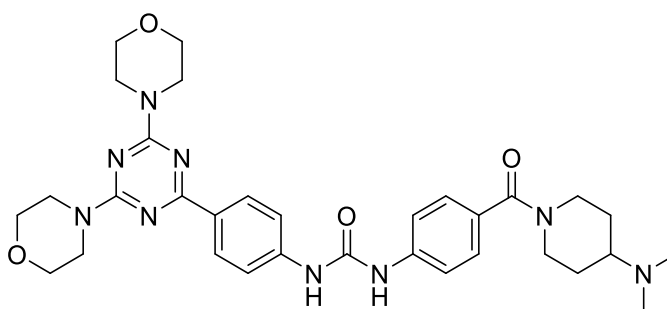
Příkladem duálních inhibitorů může být sloučenina s kódovým názvem **PI-103** (Obr. 12), což je malá syntetická molekula třídy pyridofuopyrimidinu. *PI-103* nikdy nebyl převeden do klinických studií, hlavně díky jeho rychlému metabolismu *in vivo*. Jeho deriváty **PI-450** a **PI-620** vykazují lepší farmakokinetické vlastnosti než původní molekula. Nejúspěšnějším inhibitorem klinických studií, spadající do této skupiny, je asi **NVP-BEZ235 (dactolisib)** (Obr. 11) se strukturou imidazochinolinu, který vykazuje silnou protinádorovou aktivitu *in vivo*. Jeho účinek může být dále zvýšen kombinací s inhibitory *MEK/ERK*. Vykazuje také větší antiproliferační účinky než alosterický inhibitor mTOR everolimus ve všech testovaných rakovinových buněčných liniích. Do klinického hodnocení fáze I/II, stejně jako *dactolisib*, postoupily i sloučeniny **GDC-0980 (apitolisib)** a **PKI-587 (gedatolisib)** (Obr. 11). Dalšími příklady duálních inhibitorů mohou být např. **GSK2126458**, **XL765 (voxtalisib)**, **SF1126**, **WJD008** nebo **GNE477**. *Voxtalisib* (Obr. 12) byl úspěšný v klinickém hodnocení fáze II při léčbě různých typů karcinomů. Navzdory očekávání a i přes to, že *dactolisib* vykazuje vyšší účinnost než everolimus, duální inhibitory PI3K/mTOR ukázaly v klinických studiích omezenou účinnost a obavy z **toxicity**, např. nevolnost, průjem, zvracení, vyrážka, hyperglykémie, selhání jater a další [30–32, 41].



Dactolisib (NVP-BEZ235)

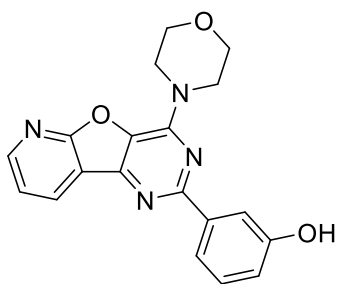


Apitolisib (GDC-0980)

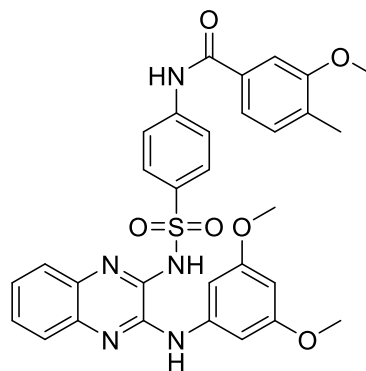


Gedatolisib (PKI-587)

Obr. 11: Duální inhibitory PI3K/mTOR



PI-103



Voxtalisib (XL765)

Obr. 12: Duální inhibitory PI3K/mTOR

6 Diskuze a závěr

Terapeutický potenciál mTOR inhibitorů pro použití v léčbě lidských onemocnění je poměrně široký. Signální dráha PI3K/Akt/mTOR se stala důležitým protinádorovým cílem a v současnosti je vývoj mTOR inhibitorů velkým zájmem pro farmaceutický průmysl. Signální dráha PI3K/Akt/mTOR reguluje buněčný růst a metabolismus a je aberantně aktivována u celé řady nádorů. Příčiny patologické aktivace signální dráhy mohou být různé, důsledkem např. delece PTEN nebo amplifikace Akt [4, 18].

Mezi dosud nejznámější inhibitory mTOR patří rapamycin a jeho rapalogy. Rapamycin je první objevený inhibitor mTOR a spolu s jeho deriváty byl schválen pro využití v praxi jako protirakovinné léčivo, častěji však rapalogy nalezneme v prevenci rejekce transplantovaných orgánů. V současné době jsou zvažovány i jako možná léčiva s účinky proti stárnutí. Naproti tomu ATP-kompetitivní inhibitory jsou stále ještě v klinickém hodnocení. Nedávno byla také objevena nová generace mTOR inhibitorů nazývaná jako RapaLink-1, u které byla prokázána vyšší účinnost vůči rapalogům a ATP-kompetitivním inhibitorům. V rámci signální dráhy byly vyvinuty duální inhibitory PI3K/mTOR, které by teoreticky měly mít zvýšenou účinnost než ostatní inhibitory mTOR, protože signální dráhu PI3K/Akt/mTOR blokují na dvou různých místech zároveň. Některé z nich postoupily do klinického hodnocení, avšak vykazaly omezenou účinnost a nežádoucí účinky. Ačkoliv se může zdát, že je léčba pomocí mTOR inhibitorů velmi efektivní, tak se ale stále nachází v rané fázi vývoje kvůli probíhajícím klinickým studiím [27, 31, 32, 49].

V souvislosti se signální dráhou PI3K/Akt/mTOR byly také objeveny **inhibitory PI3K** a **inhibitory Akt**, které blokují kinasu PI3K a Akt v rámci signální dráhy. První syntetické inhibitory PI3K byly *LY294002* a *wortmannin*, které bohužel nikdy nedosáhly klinického hodnocení kvůli jejich špatným vlastnostem (vysoká jaterní toxicita, nízká rozpustnost, špatná biologická dostupnost). Mezi inhibitory Akt patří např. *perifosin*, který byl z této skupiny nejlépe prozkoumán, nebo *MK-2206* [18, 33].

V rámci této bakalářské práce byly shrnuty poznatky o enzymu mTOR a jeho inhibitech v terapii lidských onemocnění a stárnutí. Je zde podán přehled o objevu rapamycinu a mTOR, struktuře komplexů mTORC1 a mTORC2 a signální dráze PI3K/Akt/mTOR. Dále se práce zabývá inhibitory mTOR. Nalezneme tu jejich rozdělení a vliv v terapii onemocnění a jejich souvislost se stárnutím. V závěru práce popisují také duální inhibitory PI3K/mTOR a nově objevené inhibitory – RapaLink-1.

Použitá literatura

- [1] ŠTUDENTOVÁ, Hana a Bohuslav MELICHAR. Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologie* [online]. 2010, **4**(3), 185–188 [cit. 2018-08-15].
- [2] ARRIOLA APELO, Sebastian I. a Dudley 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* [online]. 2016, **71**(7), 841–849 [cit. 2018-08-16]. ISSN 1079-5006. Dostupné z: doi:10.1093/gerona/glw090
- [3] KENNEDY, Brian K. a Juniper K. PENNYPACKER. Mammalian Target of Rapamycin: A Target for (Lung) Diseases and Aging. *Annals of the American Thoracic Society* [online]. 2016, **13**(Suppl 5), S398–S401 [cit. 2018-08-16]. ISSN 2329-6933. Dostupné z: doi:10.1513/AnnalsATS.201609-680AW
- [4] LI, Jing, Sang Gyun KIM a John BLENIS. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism* [online]. 2014, **19**(3), 373–379 [cit. 2018-08-16]. ISSN 1550-4131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001
- [5] LAMMING, Dudley W. Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)–Rapamycin and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, **6**(5) [cit. 2018-08-16]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a025924
- [6] HARE, Stephen H a Amanda J HARVEY. mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2017, **7**(3), 383–404 [cit. 2018-09-09]. ISSN 2156-6976.
- [7] KIM, Laura C., Rebecca S. COOK a Jin CHEN. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* [online]. 2017, **36**(16), 2191–2201 [cit. 2018-09-09]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2016.363
- [8] MILAN KŘUPKA A KOLEKTIV. *Základy imunofarmakologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2017. ISBN 978-80-244-5097-1.
- [9] BEATA, Mladosičovičová a a KOLEKTIV. *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. 2. přeprac. vyd. . Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4838-2.
- [10] OSHIRO, Noriko, Ken-ichi YOSHINO, Sujuti HIDAYAT, Chiharu TOKUNAGA, Kenta HARA, Satoshi EGUCHI, Joseph AVRUCH a Kazuyoshi YONEZAWA. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* [online]. 2004, **9**(4), 359–366 [cit. 2019-02-13]. ISSN 1356-9597. Dostupné z: doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00727.x
- [11] EHNINGER, Dan, Frauke NEFF a Kan XIE. Longevity, aging and rapamycin. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2014, **71**(22), 4325–4346 [cit. 2018-09-11]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-014-1677-1
- [12] YANG, Haijuan, Derek G. RUDGE, Joseph D. KOOS, Bhamini VAIDIALINGAM, Hyo J. YANG a Nikola P. PAVLETICH. mTOR kinase structure, mechanism and regulation by the rapamycin-binding domain. *Nature* [online]. 2013, **497**(7448), 217–223 [cit. 2018-09-19]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12122

- [13] BERRIDGE, Michael. Introduction. *Cell Signalling Biology* [online]. 2014, **2014**(1), 1–69 [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: doi:10.1042/csb0001001
- [14] ONDŘEJ SLABÝ ET AL. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- [15] DANCEY, Janet. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology* [online]. 2010, **7**(4), 209–219 [cit. 2019-01-05]. ISSN 1759-4782. Dostupné z: doi:10.1038/nrclinonc.2010.21
- [16] KARAR, Jayashree a Amit MAITY. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2011, **4** [cit. 2019-01-31]. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2011.00051
- [17] HASSAN, Burhan, Argun AKCAKANAT, Ashley M. HOLDER a Funda MERIC-BERNSTAM. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Surgical oncology clinics of North America* [online]. 2013, **22**(4) [cit. 2019-01-31]. ISSN 1055-3207. Dostupné z: doi:10.1016/j.soc.2013.06.008
- [18] JR, Klener Pavel a Klener PAVEL. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4171-0.
- [19] SASAKI, Takehiko, Shunsuke TAKASUGA, Junko SASAKI, Satoshi KOFUJI, Satoshi EGUCHI, Masakazu YAMAZAKI a Akira SUZUKI. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in Lipid Research* [online]. 2009, **48**(6), 307–343 [cit. 2019-02-01]. ISSN 1873-2194. Dostupné z: doi:10.1016/j.plipres.2009.06.001
- [20] POLIVKA, Jiri a Filip JANKU. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2014, **142**(2), 164–175 [cit. 2019-01-06]. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.004
- [21] LIU, Pixu, Hailing CHENG, Thomas M. ROBERTS a Jean J. ZHAO. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* [online]. 2009, **8**(8), 627–644 [cit. 2019-02-01]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2926
- [22] CAMERON, Angus J.M., Selvaraju VEERIAH, Jacqueline J.T. MARSHALL, Elizabeth R. MURRAY, Banafshé LARIJANI a Peter J. PARKER. Uncoupling TORC2 from AGC kinases inhibits tumour growth. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(49), 84685–84696 [cit. 2019-02-03]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.20086
- [23] SZYMONOWICZ, Klaudia, Sebastian OECK, Nathalie M. MALEWICZ a Verena JENDROSSEK. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. *Cancers* [online]. 2018, **10**(3) [cit. 2019-02-03]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers10030078
- [24] PIGUET, Anne-Christine a Jean-François DUFOUR. PI(3)K/PTEN/AKT pathway. *Journal of Hepatology* [online]. 2011, **54**(6), 1317–1319 [cit. 2019-02-04]. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2010.12.013
- [25] CARRACEDO, A. a P. P. PANDOLFI. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* [online]. 2008, **27**(41), 5527–5541 [cit. 2019-02-04]. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2008.247
- [26] SARBASSOV, Dos D., Siraj M. ALI a David M. SABATINI. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2005, **17**(6), 596–603 [cit. 2019-01-06]. ISSN 0955-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009

- [27] MACKEIGAN, Jeffrey P. a Darcy A. KRUEGER. Differentiating the mTOR inhibitors everolimus and sirolimus in the treatment of tuberous sclerosis complex. *Neuro-Oncology* [online]. 2015, **17**(12), 1550–1559 [cit. 2019-01-08]. ISSN 1522-8517. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/nov152
- [28] HUANG, Jingxiang a Brendan D. MANNING. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical journal* [online]. 2008, **412**(2), 179–190 [cit. 2019-05-01]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20080281
- [29] CHANG, Wenteh, Ke WEI, Lawrence HO, Gerald J. BERRY, Susan S. JACOBS, Cheryl H. CHANG a Glenn D. ROSEN. A Critical Role for the mTORC2 Pathway in Lung Fibrosis. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(8) [cit. 2019-01-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0106155
- [30] XIE, Jianling, Xuemin WANG a Christopher G. PROUD. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Research* [online]. 2016, **5** [cit. 2019-04-08]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.9207.1
- [31] ZHOU, Hongyu, Yan LUO a Shile HUANG. Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2010, **10**(7), 571–581 [cit. 2019-04-02]. ISSN 1871-5206.
- [32] VIANA, Sofia D., Flávio REIS a Rui ALVES. Therapeutic Use of mTOR Inhibitors in Renal Diseases: Advances, Drawbacks, and Challenges. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2018, **2018** [cit. 2019-04-05]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3693625
- [33] BALLOU, Lisa M. a Richard Z. LIN. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology* [online]. 2008, **1**(1–4), 27–36 [cit. 2019-04-03]. ISSN 1864-6158. Dostupné z: doi:10.1007/s12154-008-0003-5
- [34] MARTELLI, Alberto M., Francesca BUONTEMPO a James A. MCCUBREY. Drug discovery targeting the mTOR pathway. *Clinical Science (London, England: 1979)* [online]. 2018, **132**(5), 543–568 [cit. 2019-04-05]. ISSN 1470-8736. Dostupné z: doi:10.1042/CS20171158
- [35] WALLER, Derek G. a Tony SAMPSON. *Medical Pharmacology and Therapeutics E-Book*. B.m.: Elsevier Health Sciences, 2013. 4. edice. ISBN 978-0-7020-5503-4.
- [36] DOWD, Frank J., Bart JOHNSON a Angelo MARIOTTI. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry - E-Book*. B.m.: Elsevier Health Sciences, 2016. 7. edice. ISBN 978-0-323-44595-5.
- [37] AUGUSTINE, J. J. a D. E. HRICIK. Experience with everolimus. *Transplantation Proceedings* [online]. 2004, **36**(2 Suppl), 500S-503S [cit. 2019-04-03]. ISSN 0041-1345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2004.01.059
- [38] KIRCHNER, Gabriele I., Ivo MEIER-WIEDENBACH a Michael P. MANN. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2004, **43**(2), 83–95 [cit. 2019-04-03]. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200443020-00002
- [39] ZDENĚK ADAM, MARTA KREJČÍ, JIŘÍ VORLÍČEK ET AL. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-715-8.
- [40] RODRIK-OUTMEZGUINE, Vanessa S., Masanori OKANIWA, Zhan YAO, Chris J. NOVOTNY, Claire MCWHIRTER, Arpitha BANAJI, Helen WON, Wai WONG, Mike BERGER, Elisa DE STANCHINA, Derek G. BARRATT, Sabina COSULICH, Teresa KLINOWSKA, Neal ROSEN a Kevan M. SHOKAT. Overcoming mTOR Resistance Mutations with a New Generation mTOR Inhibitor. *Nature* [online]. 2016,

- 534(7606), 272–276 [cit. 2019-04-08]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature17963
- [41] *Inhibitory mTOR na první pohled* [online]. [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849280/>
- [42] BLAGOSKLONNY, Mikhail V. From rapalogs to anti-aging formula. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(22), 35492–35507 [cit. 2019-04-02]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.18033
- [43] LAMMING, Dudley W., Lan YE, David M. SABATINI a Joseph A. BAUR. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2013, **123**(3), 980–989 [cit. 2019-04-20]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI64099
- [44] BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Rapamycin extends life- and health span because it slows aging. *Aging (Albany NY)*. 2013, **5**(8), 592–598 [cit. 2019-04-02]. ISSN 1945-4589.
- [45] *Does a Real Anti-Aging Pill Already Exist? - Bloomberg* [online]. [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.bloomberg.com/news/features/2015-02-12/does-a-real-anti-aging-pill-already-exist->
- [46] HARRISON, David E., Randy STRONG, Zelton Dave SHARP, James F. NELSON, Clinton M. ASTLE, Kevin FLURKEY, Nancy L. NADON, J. Erby WILKINSON, Krystyna FRENKEL, Christy S. CARTER, Marco PAHOR, Martin A. JAVORS, Elizabeth FERNANDEZ a Richard A. MILLER. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* [online]. 2009, **460**(7253), 392–395 [cit. 2019-04-20]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08221
- [47] SOLIMAN, Ghada A, Sharalyn M STEENSON a Asserewou H ETEKPO. Effects of Metformin and a Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ATP-Competitive Inhibitor on Targeted Metabolomics in Pancreatic Cancer Cell Line. *Metabolomics: open access* [online]. 2016, **6**(3) [cit. 2019-04-20]. ISSN 2153-0769. Dostupné z: doi:10.4172/2153-0769.1000183
- [48] RENA, Graham, D. Grahame HARDIE a Ewan R. PEARSON. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* [online]. 2017, **60**(9), 1577–1585 [cit. 2019-04-26]. ISSN 0012-186X. Dostupné z: doi:10.1007/s00125-017-4342-z
- [49] FAN, QiWen, Ozlem AKSOY, Robyn A. WONG, Shirin ILKHANIZADEH, Chris J. NOVOTNY, William C. GUSTAFSON, Albert Yi-Que TRUONG, Geraldine CAVANAN, Erin F. SIMONDS, Daphne HAAS-KOGAN, Joanna J. PHILLIPS, Theodore NICOLAIDES, Masanori OKANIWA, Kevan M. SHOKAT a William A. WEISS. A Kinase Inhibitor Targeted to mTORC1 Drives Regression in Glioblastoma. *Cancer cell* [online]. 2017, **31**(3), 424–435 [cit. 2019-04-23]. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2017.01.014
- [50] *RapaLink-1 CAS: 1887095-82-0 Probechem Biochemicals* [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: http://www.probechem.com/products_RapaLink-1.aspx