



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ mTOR ΣΑΝ ΠΙΘΑΝΟΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ»**

**ΤΣΟΓΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**  
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΛΑΡΙΣΑ**  
**ΙΟΥΛΙΟΣ ,2014**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
*ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Επιβλέπων :** ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ

**Συνεπιβλέπουσα:** ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

**Συνεπιβλέπουσα:** ΓΚΡΕΤΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ΄ ΕΚΕΤΑ

Αφιερωμένη στην μητέρα και τον πατέρα μου που πάντα με στηρίζουν,

ιδιαίτερα όμως την αφιερώνω στον σύζυγό μου Γιώργο, που είναι ο άνεμος κάτω από τα φτερά μου.

Σας ευχαριστώ....

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>8</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>10</b>
<b>ΡΟΛΟΣ -ΔΡΑΣΗ ΜΤΟΡ</b> .....	<b>11</b>
<b>ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΜΤΟΡ</b> .....	<b>13</b>
<b>ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΤΟΡC1 ΚΑΙ ΜΤΟΡC2</b> .....	<b>16</b>
mTORC1 .....	17
ΔΟΜΗ mTORC1.....	18
mTORC2 .....	21
<b>ΑΝΩΡΟΪΚΗ ΚΑΙ ΚΑΤΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΤΟΡC1</b> .....	<b>23</b>
<b>ΑΝΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΤΟΡC1</b> .....	<b>24</b>
<i>Ενεργότητα λόγω αυξητικών παραγόντων. (Ενεργοποίηση PI3K/Akt)</i> .....	26
<i>Ενεργότητα επαγόμενη από τα αμινοξέα</i> .....	27
<i>Ενεργότητα λόγω ενεργειακών επιπέδων (ενεργοποίηση AMPK)</i> .....	29
<i>Ενεργότητα επαγόμενη από τα επίπεδα O<sub>2</sub></i> .....	29
<i>Ενεργότητα επαγόμενη από κυτταρική βλάβη ή βλάβη DNA</i> .....	31
<i>Ενεργότητα επαγόμενη από φλεγμονή</i> .....	31
<b>ΚΑΤΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΤΟΡC1</b> .....	<b>32</b>
<i>Ρύθμιση κυτταρικής αύξησης και ανάπτυξης</i> .....	32
<i>Μετάφραση</i> .....	33
<i>Μεταγραφή και βιογένεση Ριβοσωμάτων</i> .....	34
<i>Σύνθεση Πυριδιμίνων</i> .....	34
<i>Αγγειογένεση</i> .....	35
<i>Αυτοφαγία</i> .....	35
<i>Απόπτωση</i> .....	36
<i>Γήρας και μνήμη</i> .....	37
<b>ΜΤΟΡC1 ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΝΟΣΟΙ</b> .....	<b>38</b>
<b>ΜΤΟΡ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b> .....	<b>39</b>
<b>ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΤΟΡ</b> .....	<b>41</b>
<b>ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ</b> .....	<b>42</b>

DEPTOR .....	42
FKBP38 .....	43
<b>ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....</b>	<b>44</b>
ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗ .....	45
<i>Sirolimus - Rapamune</i> .....	48
ΑΝΑΛΟΓΑ ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗΣ.....	51
<i>CCI779 (Temsirolimus-Torisel)</i> .....	52
<i>RAD001 (everolimus-Afinitor)</i> .....	54
<i>ABT-578 (zotarolimus-Endeavor)</i> .....	57
<i>AP23573 (ridaforolimus-Jenzyl)</i> .....	58
<i>SAR943 ( 32 deoxy-rapamycin)</i> .....	59
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ mTORC1/mTORC2 TOR-KIs.....	60
ΔΙΠΛΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ PI3K-mTOR (PI3K/TOR-KIs).....	63
<i>Wortmannin</i> .....	65
<i>PI-103</i> .....	66
<i>BEZ235/NVP-BEZ235</i> .....	67
<i>GSK2126458</i> .....	68
<i>LY294002</i> .....	68
ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ .....	69
<i>Epigallocatechin gallate (EGCG)</i> .....	70
<i>Resveratrol</i> .....	70
<i>Κουρκουμάς</i> .....	70
<i>Theophylline και Καφεΐνη</i> .....	70
BENZYL ISOTHIOCYANATE (BITC) .....	71
METFORMIN.....	71
FTS .....	72
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ .....</b>	<b>73</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>74</b>

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανακάλυψη του βακτηρίου *Streptomyces Hygroscopicus* στα Νησιά του Πάσχα οδήγησε στην ανακάλυψη της Ραπαμυκίνης, μιας λακτόνης με κυτταροστατικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Ο στόχος της Ραπαμυκίνης αναγνωρίστηκε πρώτη φορά στους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και το 1994 ανακαλύφθηκε ο στόχος της Ραπαμυκίνης των θηλαστικών, mTOR.

Η mTOR είναι κινάση με δράση σερίνης - θρεονίνης που δρα εντός των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2. Τα δύο αυτά σύμπλοκα παρευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες και τον πυρήνα και φωσφορυλιώνουν άμεσα ή έμμεσα περίπου 800 πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με 964 μόρια και λαμβάνουν μέρος σε 777 αντιδράσεις. Μέσω των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2, η κινάση ελέγχει πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών μέσω ρύθμισης της σύνθεσης βιομορίων και οργανιδίων.

Η ενεργοποίηση της mTOR επάγεται κατά την παρουσία θρεπτικών συστατικών καθώς και κατά την παρουσία αυξητικών παραγόντων, ενώ μειώνεται κατά την ένδοια ενέργειας και οξυγόνου, ούτως ώστε να κύτταρα να πολλαπλασιάζονται μόνο υπό ιδανικές συνθήκες.

Η απορύθμιση της σηματοδότησης της mTOR και η υπερέκφραση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 οδηγεί σε ποικίλα νοσήματα συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, της παχυσαρκίας, του διαβήτη, τις νευρολογικές διαταραχές αλλά και την φλεγμονή.

Η Θεραπευτική προσέγγιση επιτυγχάνεται με χρήση ουσιών που αναστέλλουν είτε την ίδια την κινάση mTOR, είτε άλλα μόρια υπεύθυνα για την ρύθμιση της ενεργότητάς της. Αρκετοί από τους αναστολείς της mTOR βρίσκονται ήδη στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται συστηματικά, είτε ως ανοσοκατασταλτικά είτε ως ογκοκατασταλτικά, ενώ άλλοι δοκιμάζονται σε κλινικές μελέτες.

Εκτός από την Ραπαμυκίνη που είναι ο πρώτος γνωστός αναστολέας και κυκλοφορεί υπό την επωνυμία Rapamune, διατίθενται και τα ανάλογά της, γνωστά και ως Rapalogs που είναι τα Torisel, Afinitor, Endeavor και Jenzyl.

Η Ραπαμυκίνη και τα ανάλογά της με την αδρανοποίηση του mTORC1, προκαλούν την αναδραστική ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K, αλλά είναι ανάκαινα να αναστείλουν το mTORC2 καθώς δεν μπορούν να προσδέσουν πάνω του.

Οι εκλεκτικοί αναστολείς της mTOR, τα TOR-KIs, δρουν στην καταλυτική περιοχή της κινάσης επιδρώντας τόσο στο mTORC1 όσο και στο mTORC2, προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, καθώς και αναστολή της κυτταροκίνησης και συνεπώς μείωση των μεταστάσεων.

Οι διπλοί αναστολείς PI3K-mTOR προσδένουν στην καταλυτική περιοχή της mTOR με ταυτόχρονη αδρανοποίηση και του PI3K, επιτυγχάνοντας μη ενεργοποίηση της AKT, συμβάλλοντας στην αργή εξέλιξη του όγκου.

Τέλος, ακόμα μία ομάδα αναστολέων είναι οι διατροφικοί που συναντώνται στις κατεχίνες, τα κόκκινα σταφύλια, τον κουρκουμά και τον καφέ, με αμφίβολη ή ασήμαντη θεραπευτική αξία.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1970, σε εδαφικό δείγμα προερχόμενο από τα Νησιά του Πάσχα (Ραπα-Νουι κατά την τοπική διάλεκτο) στον Βόρειο Ειρηνικό, ανιχνεύτηκε το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces hygroscopicus*, το οποίο παρουσίαζε αντιμυκητιστακή δράση. Κατόπιν απομόνωσης, βρέθηκε ότι ο υπεύθυνος μεταβολίτης, ήταν μια μακροκυκλική λακτόνη που ονομάστηκε Ραπαμικίνη (Rapamycin) προς τιμήν του τόπου ανακάλυψης και παρουσίαζε κυτταροστατικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (Vezina et al, 1975).

Είκοσι χρόνια αργότερα, ο στόχος της Ραπαμικίνης ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ως αποτέλεσμα μετάλλαξης των γονιδίων *TOR1* και *TOR2*, που προσέδωσαν αντίσταση στην ανασταλτική δράση της Ραπαμικίνης και έτσι πήρε το όνομα TOR (Target Of Rapamycin)(Kunz et al, 1993). Λόγω του ότι η δράση της Ραπαμικίνης εξαρτάται από την immunophilin FK506-binding protein 12 (FKBP12) που είναι ενδοκυτταρικός υποδοχέας peptidyl-prolylcis/trans ισομεράση, η TOR αναφέρεται και ως as FKBP12-rapamycin associated protein (FRAP) (Choi et al, 1996).

Οι πρωτεΐνες Tor1p και Tor2p του ζυμομύκητα, έχουν διαφορετικές λειτουργίες και αποτελούν στόχους της Ραπαμικίνης. Διαγραφή του *TOR2* είναι θανατηφόρος λόγω αναστολής όλων των σταδίων του κυτταρικού κύκλου (Kunz et al, 1993), ενώ η διαγραφή του *TOR1* προκαλεί μέτρια μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού (Helliwell et al, 1994). Διαγραφή και των δύο γονιδίων ομοιάζει με την δράση της Ραπαμικίνης, προκαλώντας αναστολή της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου (Helliwell et al, 1994; Kunz et al, 1993). Η θανατηφόρος διαγραφή του *TOR2* δεν ισοσταθμίζεται από την υπερέκφραση του *TOR1*. Οι φαινότυποι που προκύπτουν από τις αμφότερες διαγραφές, σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα της ζύμης στην Ραπαμικίνη λόγω σημειακής μετάλλαξης, είτε στο ένα είτε στο άλλο γονίδιο, υποδεικνύουν ότι η λειτουργία της Tor2p σχετίζεται τόσο με την αντοχή στην Ραπαμικίνη, όσο και με την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Schmidt et al, 1996).

Την αναγνώριση των γονιδίων *TOR1* και *TOR2* του ζυμομύκητα, ακολούθησε η ανακάλυψη του *TOR* γονιδίου των ανώτερων ευκαρυωτικών και θηλαστικών που κωδικοποιεί την στόχο Ραπαμικίνης των Θηλαστικών, mTOR (mammalian Target Of



Rapamycin). Η mTOR συναντάται εντός δύο συμπλόκων, του mTORC1 και mTORC2 (Sabatini et al, 1994).

Η υψηλού βαθμού συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των ειδών, αλλά και ο συντηρημένος μηχανισμός αναστολής της TOR από την Ραπαμυκίνη υποδεικνύουν την ουσιώδη δράση της mTOR στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης (Chiu et al, 1994; Sabatini et al, 1994).

## ΡΟΛΟΣ -ΔΡΑΣΗ mTOR

Ο στόχος της Ραπαμυκίνης των θηλαστικών αποτελεί κομβικό σημείο σε ένα δαιδαλώδες σύστημα σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται τόσο σε φυσιολογικές διεργασίες όσο και παθολογικές. Η σηματοδότηση μέσω mTOR έχει αποδειχτεί ότι προάγει την ογκογένεση μέσω της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, του μεταβολισμού και τους μεταγραφικούς παράγοντες στην ογκογένεση (Dobashi et al, 2011).

Η mTOR άμεσα ή έμμεσα ρυθμίζει την φωσφορυλίωση τουλάχιστον 800 πρωτεϊνών του κυτταρικού μεταβολισμού, της ανάπτυξης και της επιβίωσης του κυττάρου υπό την επίδραση ορμονών, αυξητικών παραγόντων, θρεπτικών στοιχείων, και άλλων μορίων που επάγονται κατά το στρες ή κατά τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας.. Επιπλέον ρυθμίζει την μεταγραφή, την μετάφραση, την πρωτεϊνική σταθερότητα, την οργάνωση του κυτταροσκελετού, την de novo σύνθεση πυριμιδίνων, την βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων, λυσοσωμάτων, μιτοχονδρίων και αδιποκυττάρων, τον μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, την αγγειογένεση, την επιβίωση, την απόπτωση και την αυτοφαγία (Kim et al, 2002; Nakashima et al, 2013).

Συνοπτικά η σηματοδότηση της mTOR εμπλέκει 964 μόρια που λαμβάνουν μέρος σε 777 αντιδράσεις. Τα μόρια αυτά είναι 380 πρωτεΐνες, 319 σύμπλοκα, 20 απλά μόρια, 80 γονίδια, 87 RNA, 2 ιόντα, 24 προϊόντα αποικοδόμησης, 6 άγνωστα μόρια και 46 φαινότυπους. Από αυτά, τα 602 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, 298 στον πυρήνα, 22 στις ενδομεμβράνες, 17 στα

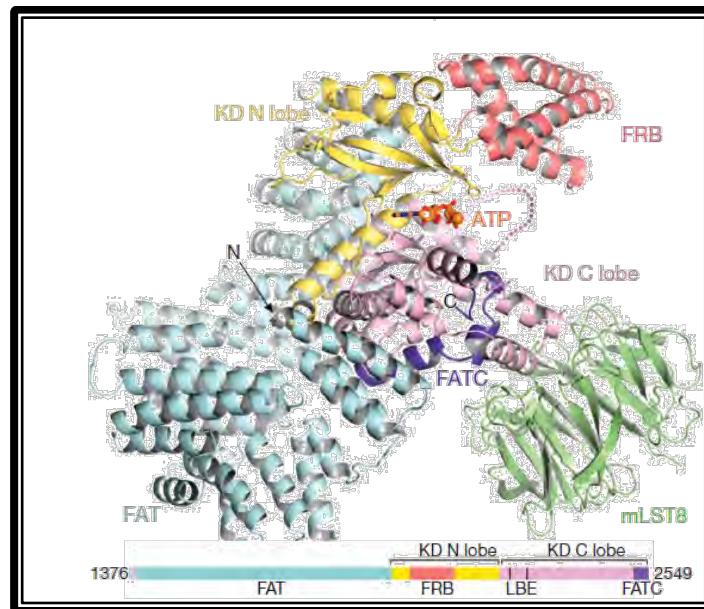
μιτοχόνδρια, 12 στον Rab7 κυστικό μεταφορέα, 6 στο εξωκυττάριο περιβάλλον, 4 στο κεντρόσωμα και 3 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το Golgi. (Caron et al, 2010).

Η κινάση mTOR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, των λυσοσωμάτων, στο σωμάτιο Golgi, και στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Επιπλέον μετακινείται και εντοπίζεται εντός του πυρήνα κατά την υποξία, όταν δεν μπορεί να διορθωθεί η βλάβη του DNA και για την ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων που μετέχουν στην σύνθεση των μιτοχονδρίων (Desai et al, 2002; Drenan et al, 2004).

Συναντάται ως βασικό μόριο σε δύο σύμπλοκα διαφορετικής μορφολογίας και λειτουργίας, το mTORC1 και το mTORC2 (Hara et al, 2002). Η ενεργοποίηση των συμπλόκων ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα την *de novo* σύνθεση πυριδιμίνων, την πρωτεϊνοσύνθεση, την κυτταρική ανάπτυξη, την μετάφραση, την αυτοφαγία, την απόπτωση, την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων, την λιπιδική σύνθεση καθώς και άλλα (Guertin & Sabatini, 2007).

Το mTORC1 αποτελεί τον κύριο εναρκτήριο παράγοντα της μετάφραση του κυττάρου και κατ'επέκταση ρυθμίζει την χρονική στιγμή της κυτταρικής αύξησης, ενώ το mTORC2 προάγει την διαδικασία αύξησης του κυτταρικού μεγέθους μέσω αναδιάταξης του δικτύου ακτίνης (Guertin & Sabatini, 2005; Wullschleger et al, 2006).

# ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ mTOR



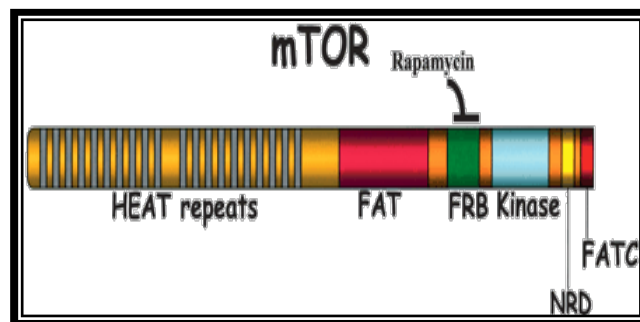
εικ.1 Δομή της κινάσης mTOR. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η περιοχή FAT ενώ με πορτοκαλί η περιοχή FRB. Με κίτρινο και ροζ χρώμα απεικονίζεται η περιοχή κινάσης στην οποία φαίνεται προσδεμένο ένα μόριο ATP και τέλος ακολουθεί με μοβ χρώμα η FATC. Στην εικόνα φαίνεται και η πρόσδεση της πρωτεΐνης mLST8 χρώματος πράσινου. (Yang et al, 2013)

Οι πρωτεΐνες TOR κατατάσσονται στην οικογένεια των φωσφατιδυλινοσιτόλης- κινάσης - σχετιζόμενων κινασών (PIKK) και χαρακτηρίζονται από την παρουσία COOH-τελικού άκρου με δράση σερίνης-θρεονίνης κινάσης. (Hynes & Lane, 2005).

Τα έζυμα της φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάσης (PI3K) διαχωρίζονται σε 3 τάξεις και επάγουν δευτερεύοντες λιπιδικούς αγγελιοφόρους, που μεσολαβούν στην μεταγωγή σήματος κατά την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, επιβίωση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, μεταβολισμό και μετάσταση (Bader et al, 2005). Στις PIKK

περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ataxia- and Rad3-related), PRKDC (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), SMG1 (suppressor of morphogenesis in genitalia) και TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein)(Lempiainen & Halazonetis, 2009).

Ο στόχος της Ραπαμυκίνης των θηλαστικών mTOR, είναι μια σερίνη/θρεονίνη κινάση, 2549 αμινοξέων και μοριακού βάρους 290 kDa (Fingar & Blenis, 2004; Wullschleger et al, 2006) που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *MTOR* στο χρωμόσωμα 1p36.2 (Moore et al, 1996).



εικ2. Γραμμική αναπαράσταση της mTOR κινάσης. Φαίνονται οι επαναλήψεις HEAT και οι περιοχές FAT, FRB η περιοχή κινάσης, η NRD και η FATC (Hay & Sonenberg, 2004).

Από το NH<sub>2</sub>-τελικό προς το COOH-τελικό άκρο, παρεμβάλλονται οι περιοχές **HEAT**, **FAT**, **FRB**, η **καταλυτική περιοχή** με δράση κινάσης, η περιοχή **αρνητικής ρύθμισης NRD**, η περιοχή **FATC** και τέλος η περιοχή **mLST8** (Sekulic et al, 2000).

Η περιοχή **HEAT** αποτελείται από δύο γεινιάζουσες ομάδες των 10 επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών HEAT (παρουσία σε **Huntigtin**, **Elongation factor 3 (EF3)**, φωσφατάση **2A PP2A** ή **PR65/A** και **TOR1**) (Hay & Sonenberg, 2004). Κάθε HEAT αποτελείται από 40 αμινοξέα και σχηματίζει δύο αντιπαράλληλες α-έλικες που αλληλεπιδρούν (Loewith & Hall, 2011).

Ακολουθεί η περιοχή στόχευσης εστιών προσκόλλησης **FAT** (Focal Adhesion Target ) με 28 α-έλικες, που συναντάται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας των PIKK. Το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της FAT είναι απαραίτητο για την σύνδεση των RAPTOR και RICTOR1 στα σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2 (Yang et al, 2013). Η FAT αποτελεί συντηρημένη περιοχή των κινασών FAK (focal adhesion kinases) οι οποίες σχετίζονται άμεσα με την επικοινωνία του κυτταρού με την εξωκυττάρια ουσία μέσω των Ιντεγκρίνων (Bosotti et al, 2000).

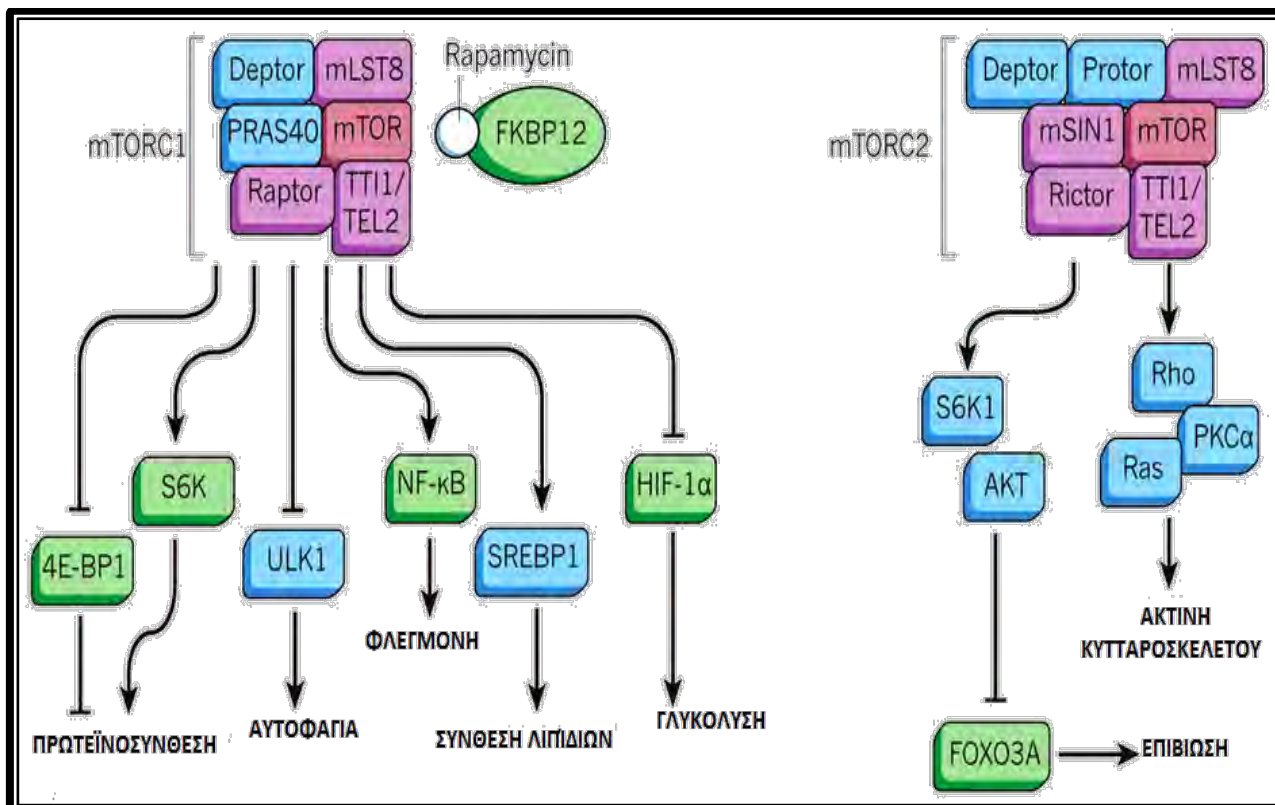
Μετά την FAT, βρίσκεται η περιοχή **FRB** μεγέθους 100 αμινοξέων, όπου στο σύμπλοκο mTORC1 συνδέεται ο ενδογενής αναστολέας FKBP38. Όταν το σύμπλοκο είναι σε ενεργή κατάσταση ο FKBP38 απουσιάζει. Σε αυτή την περιοχή γίνεται η σύνδεση του συμπλόκου Ραπαμυκίνης/FKBP12 που προκαλεί τη απενεργοποίηση της mTOR (Bosotti et al, 2000).

Η **καταλυτική περιοχή** αποτελείται από 282 κατάλοιπα PIKK ενεργότητας κινάσης σερίνης/θρεονίνης, όπου προσδένονται μόρια ATP ενεργοποιώντας την mTOR. Όπως θα δούμε στην συνέχεια η καταλυτική περιοχή αποτελεί στόχο αναστολέων που ανταγωνίζονται την προσκόλληση του ATP (Long et al, 2005; Soliman, 2005).

Επόμενη είναι η περιοχή **NRD**, η διαγραφή της οποίας προκαλεί ενεργοποίηση της mTOR in vitro και in vivo (Sekulic et al, 2000).

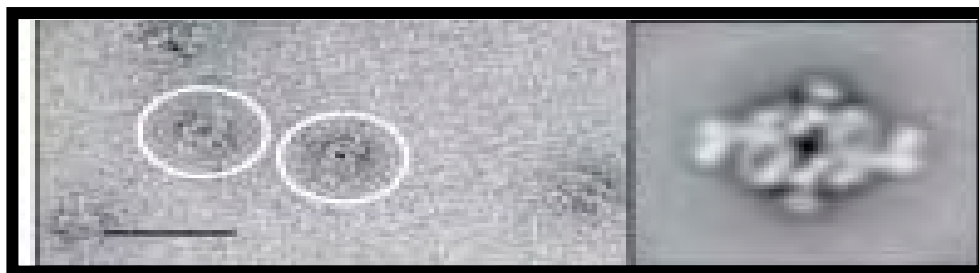
Τέλος, στο COOH-τελικό άκρο της mTOR, εδράζει ακόμα μια FAT περιοχή, η **FATC** (Chiu et al, 1994). Θεωρείται ότι οι περιοχές FATC και FAT αλληλεπιδρούν ώστε να αλλάξει η στερεοδιάταξη της mTOR και να αποκαλυφθεί η καταλυτική της περιοχή (Sekulic et al, 2000). Η διαγραφή έστω και ενός αμινοξέος από την περιοχή FATC, έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη κατάργηση της δράσης της mTOR (Peterson et al, 2000; Takahashi et al, 2000).

# ΣΥΜΠΛΟΚΑ mTORC1 και mTORC2

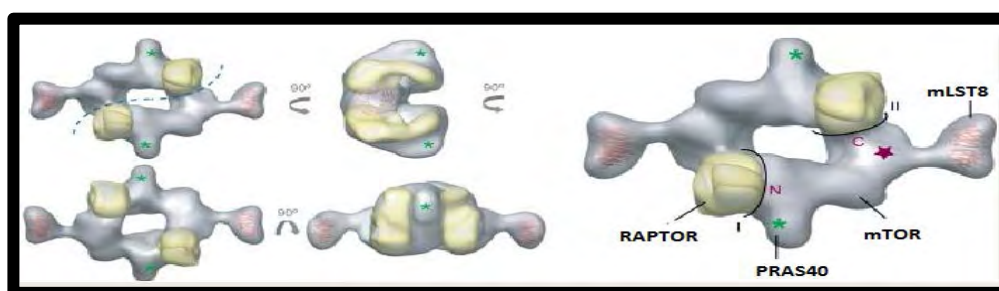


εικ.3 Σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2 με τις πρωτεΐνες που τα αποτελούν και τους κατωροϊκούς στόχους τους (Johnson et al, 2013)

# *mTORC1*



εικ.4 Σύμπλοκο mTORC1, Απεικόνιση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η γραμμή της κλίμακας αντιπροσωπεύει τα 50nm (Yip et al, 2010)

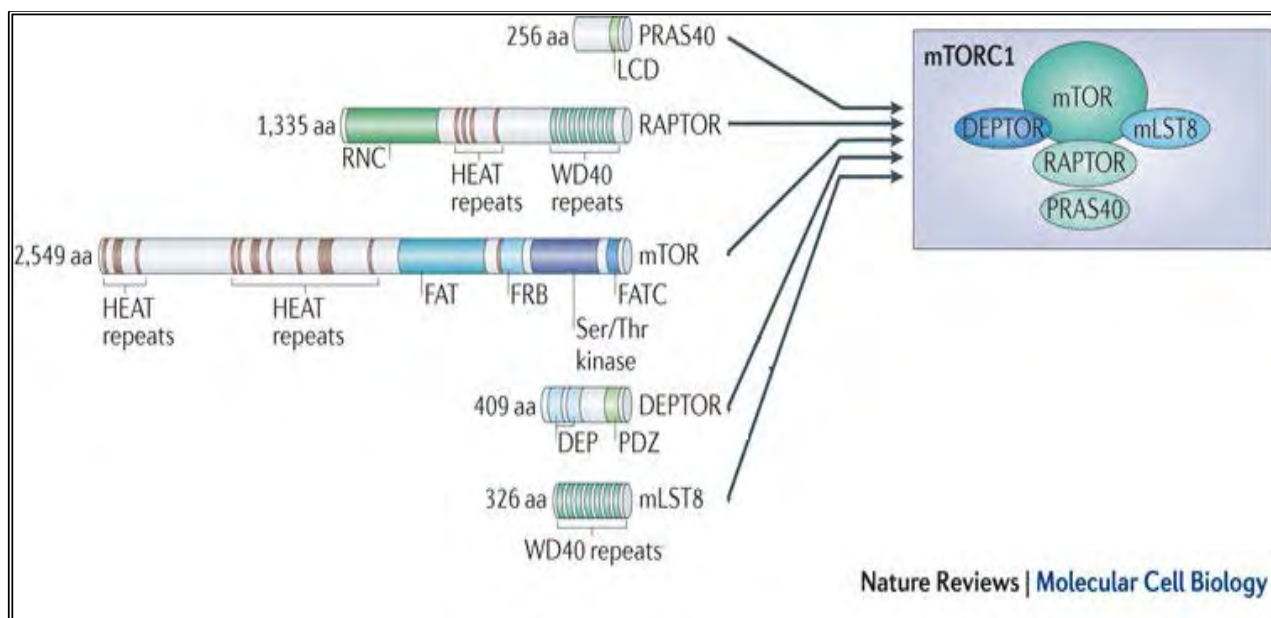


εικ.5 Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου mTORC1 όπου φαίνεται η θέση πρόσδεσης της κάθε πρωτεΐνης. (Yip et al, 2010)

Το mTORC1, ως αισθητήρας θρεπτικών και ενεργειακών επιπέδων, ρυθμίζει την αυτοφαγία, την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων, την λιπιδική σύνθεση, την βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων, την κυτταρική ανάπτυξη, την μετάφραση, γενικά την ομοιόσταση του κυτάρου καθώς και άλλες διεργασίες, προκαλούμενες από στρεσογόνες καταστάσεις, όπως η ελάτωση ενεργειακών επιπέδων, επιπέδων οξυγόνου ή θρεπτικών συστατικών (Yang et al, 2013; Zoncu et al, 2011).

Το ενεργοποιημένο mTORC1 αυξάνει την πρωτεϊνοσύνθεση, μέσω της φωσφορυλίωσης κύριων ρυθμιστών της μετάφρασης και της σύνθεσης των ριβοσωμάτων. Επίσης, επάγει την αγγειογένεση, και αποτρέπει την απόπτωση και την αυτοφαγία (Dobashi et al, 2011).

## ΔΟΜΗ mTORC1



εικ.6 Σύμπλοκο mTORC1. Δομή, σύνθεση και αριθμός αμινοξέων των επιμέρους πρωτεϊνών PRAS40, RAPTOR, DEPTOR και mLST8 που απαρτίζουν το σύμπλοκο. (Zoncu et al, 2011)

Το mTORC1 έχει μέγεθος ~1 MDa και αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες (Εικ.6) που συνενούνται σε ρομβοειδές σχήμα, με κοιλότητα στο μέσον και διαστάσεις 290 Å × 210 Å × 135 Å (Yip et al, 2010). Η κάθε υπομονάδα του mTORC1 αποτελείται από την κινάση **mTOR**, την **RAPTOR** (regulatory associated protein of mTOR), την **PRAS40** (proline-rich AKT substrate 40 kDa) την **DEPTOR** και την **mLST8** (Nakashima et al, 2013; Sarbassov et al, 2005). Στο σύμπλοκο προσδένουν και οι **Tti1** και **Tel2** που μαζί με τις DEPTOR και mLST8 είναι κοινές και για το mTORC2.

Η **RAPTOR** έχει μέγεθος 150- kDa και κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 17q25.3. Η σύνδεση της στην mTOR γίνεται μέσω κοινών HEAT αλληλουχιών. Ο ρόλος της είναι η



ρύθμιση της συναρμολόγησης του συμπλόκου mTORC1, η προσέλκυση των υποστρωμάτων της mTOR, S6K και 4E-BP1 και η ρύθμιση της υποκυττάριας θέσης του συμπλόκου (Hara et al, 2002). Η RAPTOR καταστέλλεται από την AMPK και ενεργοποιείται από την RSK ρυθμίζοντας έτσι την δράση του mTORC1.

Για την συναρμολόγηση του mTORC1, η RAPTOR της κάθε υπομονάδας αλληλεπιδρά και με την mTOR της άλλης υπομονάδας (Εικ ΤΑΔΕ). Σε αντίθεση η mLST8 συνδέεται μόνο σε μια mTOR και δεν αλληλεπιδρά με την άλλη (Yip et al, 2010). Η ισχύς της αλληλεπίδρασης μεταξύ mTOR και RAPTOR μπορεί να τροποποιηθεί τόσο από θρεπτικά συστατικά όσο και από σήματα που ρυθμίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTORC1 (Efeyan & Sabatini, 2013).

Η απουσία της RAPTOR από το mTORC1 επηρεάζει την διαδικασία της μετάφρασης, παρεμποδίζοντας την φωσφορυλίωση του 4E-BP1, αλλά επιτρέποντας την φωσφορυλίωση του S6K1, βασικά μόρια της κυτταρικής μεταφραστικής μηχανής. (Hara et al, 2002). Επιπλέον η δράση του ελεύθερου από RAPTOR, mTORC1, συνεχίζει να παρεμποδίζεται από το σύμπλοκο Ραπαμυκίνη/FKBP12, υποδεικνύοντας ότι η RAPTOR είναι επουσιώδης για την φωσφορυλίωση του S6K1 από το mTORC1 (Yip et al, 2010). Θεωρείται ότι η 4E-BP1 προσδένει στην RAPTOR του ενός μονομερούς και φωσφορυλιώνεται από την mTOR κινάση του άλλου μονομερούς. Ως εκ τούτου, σε απουσία διμερισμού, η 4E-BP1 δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί (Yip et al, 2010).

Η πρόσδεση της RAPTOR με το S6K1 και το 4E-BP1 επιτυγχάνεται με την αναγνώριση αλληλουχίας 5 αμινοξικών μοτίβων TOS (TOR Signaling motif), που εδράζουν στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο των 4E-BP1 και S6K1 (Schalm et al, 2003). Μετάλλαξη στην αλληλουχία TOS των S6K1 και 4E-BP1, αποτρέπει την πρόσδεσή τους στην RAPTOR και κατά συνέπεια την φωσφορυλίωσή τους από την mTOR (Nojima et al, 2003).

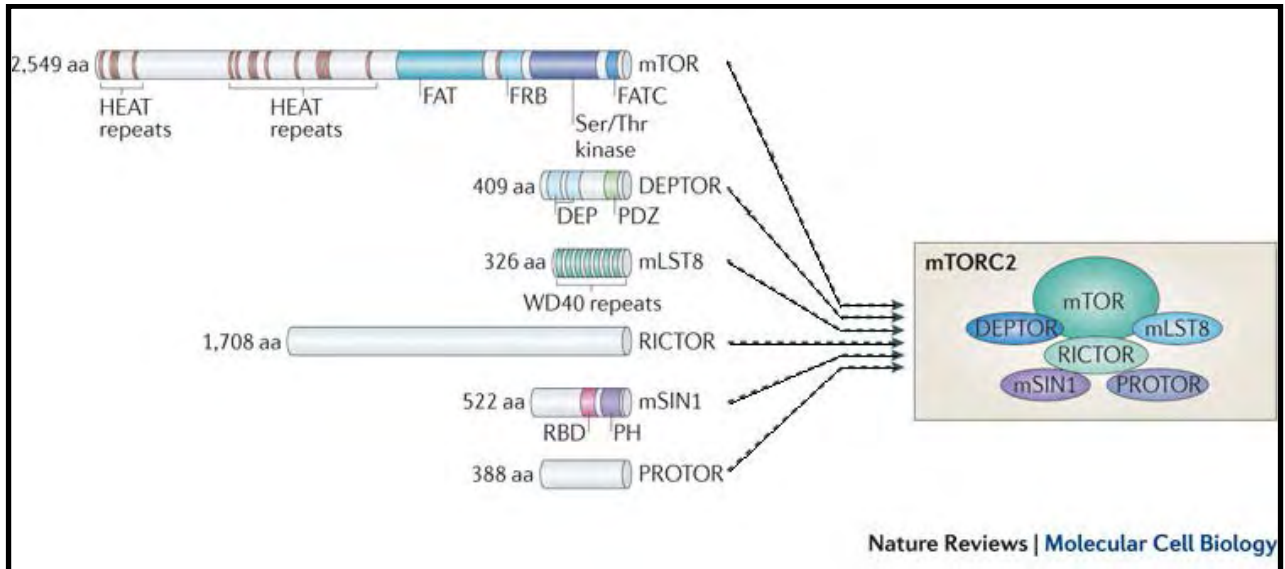
Η **PRAS40** κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 19q13.33 (Wiza et al, 2012), συνδέεται στην RAPTOR και γεινιάζει με την mTOR. Είναι αρνητικός ρυθμιστής του mTORC1 εμποδίζοντας την σύνδεση των υποστρωμάτων της mTOR στην RAPTOR. Το ενεργοποιημένο mTORC1 καθώς και η ενεργή Akt φωσφορυλιώνουν και αδρανοποιούν την PRAS40 (Sancak et al, 2007; Wang et al, 2007).

Η περιοχή **mLST8** (mammalian lethal with sec-13) ή αλλιώς **GβL**, κωδικοποιείται από το γονίδιο *mLST8* στο χρωμόσωμα 16p13, έχει μέγεθος 36-kDa. και αποτελείται από 7 επαναλήψεις WD40 (δομές αποτελούμενες από 40 αμινοξέα και κατάληξη διπεπτιδίου τρυπτοφάνης-ασπαρτικού οξέως) (Sarbasov et al, 2004; Yang et al, 2013) Η mLST8

προσδένει στο COOH-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής της mTOR (Kim et al, 2002), σταθεροποιεί την σύνδεση της RAPTOR με την mTOR (Dobashi et al, 2011) και συμμετέχει στην είσοδο των υποστρωμάτων στην καταλυτική περιοχή του συμπλόκου (Yip et al, 2010).

Οι πρωτεΐνες **Tti1** και **Tel2** αλληλεπιδρούν με όλα τα μέλη της οικογένειας των PIKKs (mTOR, ATM, ATR, DNA-PKcs, SMG-1, and TRRAP) και τα σταθεροποιούν. Knockdown είτε της Tti1 είτε της Tel2 προκαλεί αποσυναρμολόγηση των TORC συμπλόκων (Kaizuka et al, 2010; Takai et al, 2007).

# mTORC2



εικ.7 Σύμπλοκο mTORC2. Δομή, σύνθεση και αριθμός αμινοξέων των επιμέρους πρωτεϊνών PRAS40, RAPTOR, DEPTOR και mLST8 που απαρτίζουν το σύμπλοκο. (Zoncu et al, 2011)

Το σύμπλοκο mTORC2 σε αντίθεση με το mTORC1 δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην Ραπαμυκίνη. Αποτελείται από την **mTOR** και τις πρωτεΐνες **Rictor** (rapamycin-insensitive companion of mTOR), **Sin1**, **Deptor**, **mLST8**, **Tti1** και **Tel2** (Nave et al, 1999).

Η Rictor έχει μέγεθος 190 kDa και στο N-τελικό της άκρο διαθέτει συντηρημένες αλληλουχίες που πιθανώς συμμετέχουν στην συναρμολόγηση του mTORC2 (Guertin et al, 2009).

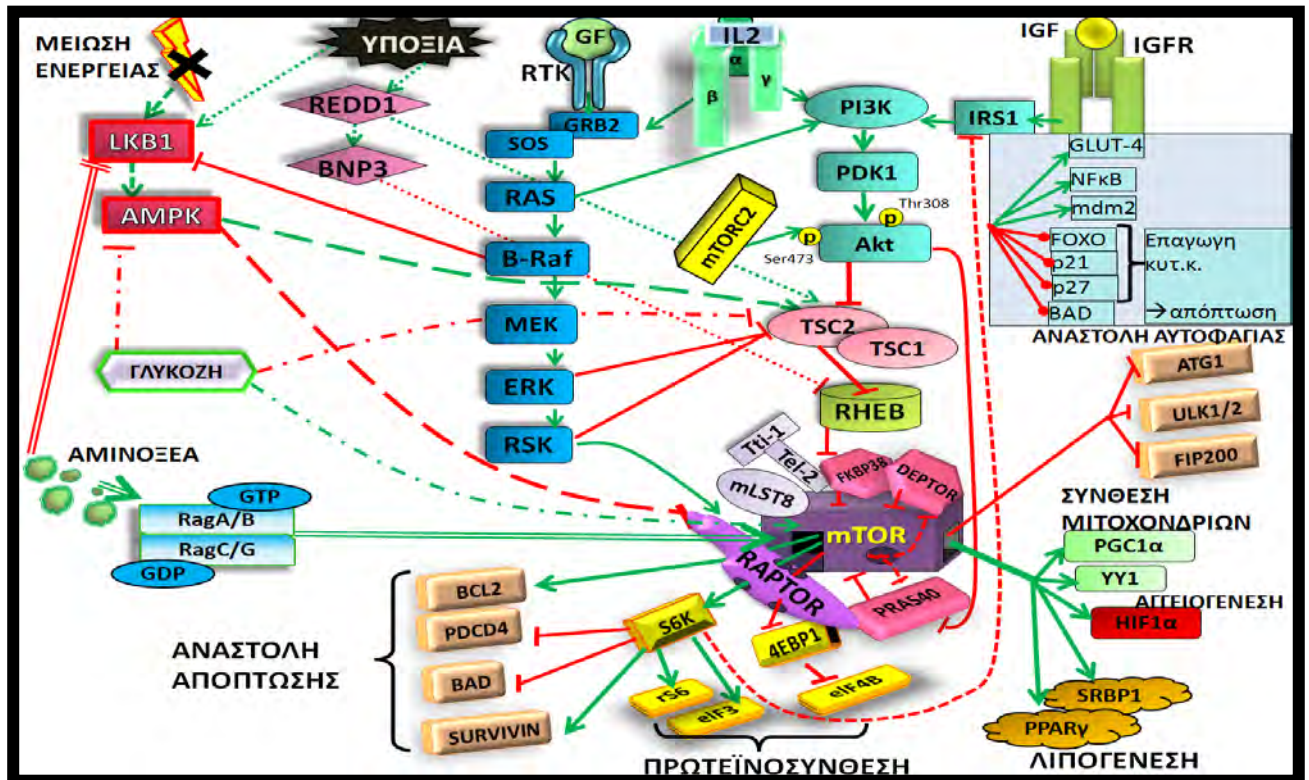
Ρόλος του συμπλόκου είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η έμμεση ρύθμιση του πολλαπλασιασμού μέσω φωσφορυλίωσης της ημιενεργής Akt στην θέση Ser473, με αποτέλεσμα την πλήρη ενεργοποίησή της (Jacinto et al, 2004).

Η ενεργή mTORC2 φωσφορυλιώνει την PKCα που με την σειρά της αφενός φωσφορυλιώνει τις Rho και Rac1 (G πρωτεΐνες) που ρυθμίζουν την κυτταροσκελετική

ακτίνη, αφετέρου φωσφορυλιώνει την paxillin και ρυθμίζει τις εστιακές συνδέσεις του κυττάρου (focal adhesions) (Saci et al, 2011; Sarbassov et al, 2004). Επειδή η χρήση Ραπαμυκίνης προκαλεί αναστολή της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων, εκτός από το mTORC1, έμμεσα καταστέλλει και το Ραπαμυκίνη-μη -ευαίσθητο mTORC2 (Dobashi et al, 2011)

Ένας άλλος ρόλος της mTORC2 είναι ότι πέραν της φωσφορυλίωσης της Akt, φωσφορυλιώνει και την SGK1 με αποτέλεσμα την αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων FOXO. Οι πρωτεΐνες FOXO ανήκουν στην οικογένεια Forkhead, που είναι απαραίτητοι ρυθμιστές της αναστολή του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωση και της επιδιόρθωση του DNA. Επιπλέον, επάγουν την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την βελτίωση της κλινικής εικόνας σε νοσήματα που η κλινική εικόνα επηρεάζεται από την ηλικία, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη, του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών παθήσεων (Lieberthal & Levine, 2012).

# ΑΝΩΡΟΪΚΗ ΚΑΙ ΚΑΤΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ mTORC1



εικ.8 Σηματοδοτικά μονοπάτια του mTORC1 επαγόμενα από αυξητικούς παράγοντες, ινσουλίνη, φλεγμονή, θρεπτικά συστατικά, υποξία και μείωση ενεργειακών επιπέδων και συνέπεια της κάθε σηματοδότησης στην ομοίωση του κυττάρου.

# ΑΝΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ mTORC1

Το σύμπλοκο mTORC1 ενεργοποιείται κυρίως από την επίδραση αυξητικών παραγόντων, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του PI3K. Επίσης, ενεργοποιείται από την αύξηση της επάρκειας αμινοξέων μέσω των RAG πρωτεϊνών, καθώς και αύξησης των επιπέδων παραγωγής ενέργειας μέσω του μονοπατιού AMPK. Οι παράγοντες που ενεργοποιούν το mTORC1 είναι το οξυγόνο, ο IGF-1 (insulin like growth factor 1) (Avruch et al, 2005; Dickson et al, 2001), ο EGF (Chiu et al, 2005) και θρεπτικά στοιχεία όπως τα αμινοξέα, η γλυκόζη (Beugnet et al, 2003; Gulati et al, 2008).

Οι βασικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν το mTORC1 είναι η **Rheb** (Ras homologue enriched in brain) και το σύμπλοκο **TSC1/2** (Tuberous Sclerosis Complex-σύνδρομο οζώδους σκλήρυνσης).

Η Rheb βρίσκεται πάνω στο λυσόσωμα, είναι G-πρωτεΐνη με ενεργότητα GTP-ασης και είναι άμεσος ανωροϊκός ρυθμιστής του mTORC1. Όταν συνδέεται με GDP είναι ανενεργή, ενώ όταν συνδέεται με GTP ενεργοποιείται και μπορεί να ενεργοποιήσει το mTORC1 απομακρύνοντας τον αναστολέα FKBP38 από την FRB περιοχή της mTOR (Stocker et al, 2003). Επιπλέον ρυθμίζει αρνητικά την κινάση B-Raf, η οποία συμμετέχει στις διεργασίες διαφοροποίησης (Zhang et al, 2003).

Το σύμπλοκο **TSC1/2** προέρχεται από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *TSC1* και *TSC2* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αμαρτίνη και οζωδίνη αντίστοιχα, οι οποίες συν-εντοπίζονται και σχηματίζουν ετεροδιμερή (Huang et al, 2008). Ρυθμίζει αρνητικά την Rheb αφού η TSC2 διαθέτει περιοχή GAP (GTPase-activating protein) που καταλύει την μετατροπή της Rheb από ενεργή (GTP) σε ανενεργή (GDP), ενώ η TSC1 είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία της GAP του TSC2 (Foster & Fingar, 2010).

Η μεσολάβηση του TSC1/2 στην ρύθμιση της Rheb αποτελεί κοινό και τελικό στάδιο όλων των ανωροϊκών σηματοδοτήσεων του mTORC1 με εξαίρεση το PA (Phosphatidic acid) που προσδένει απευθείας στο mTORC1 και το ενεργοποιεί, καθώς και την επαγόμενη από αμινοξέα σηματοδότηση που ενεργοποιεί την Rheb παρακάμπτοντας το TSC1/2. Επειδή το TSC1/2 είναι αρνητικός ρυθμιστής της Rheb, οι ενεργοποιητές του mTORC1 (αυξητικοί παράγοντες) αναστέλλουν το TSC και αντιστρόφως οι αναστολείς του mTORC1 (μείωση ενέργειας, υποξία, βλάβη DNA) ενεργοποιούν το TSC. (Foster & Fingar, 2010; Laplante & Sabatini, 2009b).

<b>Αγωνιστές/Ανταγωνιστές</b>	<b>mTORC1 ενεργοποίηση</b>	<b>Εμπλεκόμενα μονοπάτια/μόρια</b>
<b>Αυξητικοί παράγοντες</b> EGF - PDGF- IGF Insulin	↑	Akt, PI3K, Erk, Rsk
<b>Υποξία</b>	↓	RTP801/Redd1, HIF-1
<b>Υπεροσμωτικό stress</b> Sorbitol- NaCl	↓	άγνωστο
<b>Ελεύθερες ρίζες</b> Peroxide - Thiol oxidants- UV irradiation	↑ & ↓	Raptor, mTORC1
<b>Ανεπάρκεια αμινοξέων</b>	↓	Rheb, Raptor, hVps34, hVPS15
<b>Ανεπάρκεια ενέργειας</b>	↓	LKB1, AMPK
<b>Ιική λοίμωξη</b> HCMV - Adenovirus- Retroviruses/HIV Hepatitis C	↑ & ↓	Adenovirus: E4-ORF1, E4-ORF4 HCMV: EGFR
<b>DNA damaging agents</b> Etoposide Methyl methane-sulfonate Many others	↓	p53, RTP801/Redd1

## Ενεργότητα λόγω αυξητικών παραγόντων.

### (Ενεργοποίηση PI3K/Akt)

Η ενεργοποίηση του PI3K/Akt γίνεται κατόπιν πρόσδεσης αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στους υποδοχείς αυτούς περιλαμβάνονται οι IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), και η οικογένεια των Her. Εναλλακτικά το μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω παραγόντων που ενεργοποιούν το Ras (Nobukuni et al, 2005).

Εκτός των αυξητικών παραγόντων, το μονοπάτι PI3K/Akt ενεργοποιείται μέσω του IRS1/2 (Insulin Receptor Substrate-1/2) με την πρόσδεση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη προσδένει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα της IR (Insulin Receptor) και εν συνεχεία ενεργοποιείται η IRS1 ή η IRS2. Η ενεργή IRS προσδένει στην p85 ρυθμιστική υπομονάδα της Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 κινάσης (PI3K) και την ενεργοποιεί, φωσφορυλιώνοντάς την. (Lempiainen & Halazonetis, 2009).

Η ενεργή PI3K, με την σειρά της φωσφορυλιώνει την PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) σε PIP<sub>3</sub> (Inoki et al, 2006). Η φωσφορυλίωση της PIP<sub>3</sub> αναστέλλεται από την δράση του PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome 10) που την αποφωσφορυλιώνει σε PIP<sub>2</sub> (Harrington et al, 2005).

Η PIP<sub>3</sub> προσελκύει την PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1) και την Akt (γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) στην μεμβράνη και ενεργοποιεί την PDK1 που με την σειρά της ενεργοποιεί μερικώς την Akt, φωσφορυλιώνοντάς στην θέση Thr 308 (Stephens et al, 1998).

Ο συντοπισμός των Akt και PDK1 προσελκύει το mTORC2 που φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473, οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίησή της, συμβάλλοντας έτσι και αυτό στην ενεργοποίηση του mTORC1 (Wan & Helman, 2007).

Η πλήρως ενεργοποιημένη Akt, καταστέλλει την TSC2 του συμπλόκου TSC1/TSC2 μέσω φωσφορυλίωσης, δημιουργώντας της θέσεις για την πρόσδεσης των αναστολέων 14-3-3. Η αναστολή της TSC2 επιτρέπει την απελευθέρωση της Rheb και συνεπώς την ενεργοποίηση του mTORC1 (Li et al, 2002b; Zhang et al, 2003).



Επιπλέον, η ενεργή Akt δύναται να ενεργοποιήσει το mTORC1, μέσω φωσφορυλίωσης του αναστολέα PRAS40, παρακάμπτοντας την φωσφορυλίωση του TSC1/2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την δημιουργία θέση πρόσδεσης των 14-3-3 πρωτεϊνών στον αναστολέα, εξασθενώντας την αλληλεπίδρασή του με την Raptor και την απομάκρυνσή του από το mTORC1 (Sancak et al, 2007).

Η ενεργή Akt συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως η αναστολή της απόπτωσης, της λιπόλυσης και της πρωτεϊνικής αποδόμησης. Επιπλέον προάγει την μετάφραση και αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης και θρεπτικών στοιχείων μέσω αναστολής του GSK3β, ενώ μέσω της αρνητικής ρύθμισης του TSC2 άρει την ανασταλτική σηματοδότηση του mTORC1 (Sarbasov et al, 2005) όπως θα δούμε παρακάτω.

Αδρανοποίηση της TSC2 επιτυγχάνεται και κατόπιν ενεργοποίησης του RAS μονοπατιού, μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (extracellular-signal-regulated 1/2) (Ma et al, 2005), RSK1 (p90 ribosomal S6 kinase 1) (Roux et al, 2004) και MK2.

Η αναστολή της TSC2 είτε μέσω του RAS είτε μέσω του PI3K, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της Rheb-GDP η οποία συνδέεται με GTP (Hay & Sonenberg, 2004). Η ενεργή πλέον Rheb-GTP, προσδένει στον ενδογενή αναστολέα FKBP38, τον αποσπά από την FRB περιοχή και φωσφορυλιώνει την mTOR στην Ser2448, με αποτέλεσμα την συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του mTORC1 (Bai et al, 2007; Guertin et al, 2006).

## **Ενεργότητα επαγόμενη από τα αμινοξέα**

Τα υψηλά επίπεδα αμινοξέων ρυθμίζουν θετικά το mTORC1 και η ενεργοποίησή του γίνεται ανεξάρτητα από το σύμπλοκο TSC1/2 και το μονοπάτι του PI3K (Nobukuni et al, 2005). Στην αντίθετη περίπτωση, μέσω της GCN2 κινάσης, τα κύτταρα αισθάνονται την μείωση των αμινοξέων λόγω της συσσώρευσης των μη φορτισμένων tRNA (Dong et al, 2000). Αυτό συνεπάγεται την ενεργοποίηση της διαδικασίας της αυτοφαγίας (Kroemer et al, 2010).

Βασικός μεσολαβητής της ενεργοποίησης του mTORC1 από τα αμινοξέα είναι οι πρωτεΐνες Rag, που βρίσκονται πάνω στο λυσόσωμα και είναι μικρές GTP-άσες που ανήκουν στην οικογένεια των Ras πρωτεϊνών. Απαντώνται σε τέσσερεις μορφές, τις RagA και RagB που είναι παρόμοιες μεταξύ τους και τις RagC και RagD που επίσης είναι παρόμοιες μεταξύ τους. Σχηματίζουν ετεροδιμερή όπου οι A και B συνδυάζονται με τις C

και D προς τέσσερις πιθανούς συνδυασμούς (RagA/RagC, RagA/RagD, RagB/ RagC RagB/RagD,) (Sekiguchi et al, 2001).

Σε απουσία αμινοξέων, η RagB συνδέεται με GDP, η RagD με GTP (RagB/GDP-RagD/GTP) και στο σύμπλοκο προστίθεται η SH3BP4 (SH3 domain-binding protein 4) που αποτρέπει την ενεργοποίηση των Rag (Kim et al, 2012). Στην ανενεργή αυτή κατάσταση, το ετεροδιμερές παραμένει πάνω στο λυσόσωμα, προσδεμένο στην πρωτεΐνη Ragulator (σύμπλοκο των p14, p18, and MP1) χωρίς δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το mTORC1, το οποίο παραμένει κατεσταλμένο (Nada et al, 2009).

Όταν τα επίπεδα των αμινοξέων αυξηθούν, η RagB συνδέεται με GTP και η RagD με GDP (RagB/GTP-RagD/GDP), η στερεοδιάταξη της Ragulator αλλάζει και το σύμπλοκο RagB/GTP-RagD/GDP απελευθερώνεται. Κατόπιν, το εν λόγω σύμπλοκο, εντοπίζει το mTORC1 του οποίου η ακριβής θέση παραμένει άγνωστη, προσδένει πάνω στην Raptor και το μεταφέρει στο λυσόσωμα όπου και αλληλεπιδρά με την Rheb (Efeyan et al, 2012; Kim et al, 2008; Sancak et al, 2008). Η ενεργοποιημένη Rheb προσδένει στην FKBP38, την απομακρύνει από την mTOR, ενεργοποιώντας το mTORC1 και επιτρέπει την σύνδεση της FKBP38 με τις αντι αποπτωτικές BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> για την μεταφορά τους στο μιτοχόνδριο (Zou et al, 2013).

Η μετακίνηση του mTORC1 στο λυσόσωμα παρατηρείται μόνο κατά την σηματοδότηση μέσω αμινοξέων και είναι απαραίτητη η παρουσία της Rheb για την ενεργοποίησή του (Sancak et al, 2010). Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι ενεργοποιητές της Rheb, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν το mTORC1 σε απουσία αμινοξέων (Laplante & Sabatini, 2009b).

Τέλος, όταν υπάρχει επάρκεια αμινοξέων, η αλληλεπίδραση μεταξύ RAPTOR και PRAS-40 εξασθενεί και η τελευταία αποσυνδέεται από το mTORC1 με συνέπεια την ενεργοποίησή του (Wiza et al, 2012).

## **Ενεργότητα λόγω ενεργειακών επιπέδων** **(ενεργοποίηση AMPK)**

Η AMPK (AMP-activated protein kinase) είναι ανιχνευτής της διακύμανσης του λόγου AMP:ATP μεταξύ ηρεμίας και διέγερσης. Το ATP υδρολύεται προς ADP και αναπληρώνει τα επίπεδα ATP προσφέροντας μια φωσφορική ομάδα σε άλλο ADP, σχηματίζοντας ένα ATP και ένα AMP (Gowans & Hardie, 2014; Zhao et al, 2014). Καθώς παράγεται όλο και περισσότερο AMP, ο λόγος AMP:ATP αυξάνει προκαλώντας την αλόστερική ενεργοποίηση της AMPK (Gowans & Hardie, 2014)

Η μείωση της ενέργειας, ενεργοποιεί το σύμπλοκο LKB1 που με την σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AMPK. Αποτέλεσμα αυτού είναι η φωσφορυλίωση της RAPTOR και η δημιουργία θέσεων προσκόλλησης της 14-3-3, που προκαλεί την αναστολή της και την αποκόλλησή της από το mTORC1 με συνέπεια την απενεργοποίησή του (Gwinn et al, 2008). Επιπλέον φωσφορυλιώνει και αυξάνει την GAP ενεργότητα του TSC2, αποτρέποντας την αποδέσμευση της Rheb, οπότε δεν προσδένει στο mTORC1 και έτσι δεν μπορεί να το ενεργοποιήσει (Inoki et al, 2003).

Με την ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού, καταστέλλεται η δράση του mTORC1 και αυξάνονται τα κυτταρικά επίπεδα ενέργειας, λόγω καταστολής των ενεργοβόρων αναβολικών διεργασιών του κυττάρου (πρωτεϊνοσύνθεση, σύνθεση λιπαρών οξέων κ.τ.λ) και αυξάνεται η παραγωγή ενέργειας μέσω καταβολικών οδών (οξειδωση λιπαρών οξέων, μεταφορά γλυκόζης κ.τ.λ.) (Gowans & Hardie, 2014).

Στο μελάνωμα, η ενεργοποίηση του MEK/MAPK από το BRAF, αποτρέπει την πρόσδεση του LKB1 στο AMPK με αποτέλεσμα αυτό να παραμένει ανενεργό οπότε ενεργοποιείται το TSC1/2 και υπερδιεγείρεται το mTORC1 (Zheng et al, 2009).

## **Ενεργότητα επαγόμενη από τα επίπεδα O<sub>2</sub>**

Υπό συνθήκες υποξίας, η μείωση των επιπέδων ATP ενεργοποιεί το AMPK, που με την σειρά του ενεργοποιεί το TSC1/2 και αναστέλλει το mTORC1 (Arsham et al, 2003; Liu et al, 2006).

Κατά την υποξία, σε επάρκεια θρεπτικών συστατικών, ενεργοποιείται το REDD1 (transcriptional regulation of DNA damage response 1) που με την σειρά του απομακρύνει τις 14-3-3 από την TSC2, ενεργοποιώντας την. Συνεπώς διατηρείται ανενεργή η Rheb και έτσι παραμένει ανενεργή και η mTOR (Brugarolas et al, 2004; DeYoung et al, 2008).

Επιπρόσθετα σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιείται η BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) που παρακάμπτοντας το TSC1/TSC2, μειώνει τα επίπεδα της Rheb-GTP η οποία πλέον αδυνατεί να ενεργοποιήσει την mTOR. Τέλος μια άλλη μεταβολή που παρατηρείται κατά τα μειωμένα επίπεδα O<sub>2</sub> είναι η πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής PML (promyelocytic leukemia) στην mTOR όπου και την αδρανοποιεί (Bernardi et al, 2006; Li et al, 2007; Liu et al, 2006).

Όλα τα παραπάνω ως αποτέλεσμα της αδρανοποίησης του mTORC1, οδηγούν στην ανεξαρτήτου-καλύπτρας μετάφραση (cap-independent translation) και την ενεργοποίηση των HIF1a και HIF2a. (Wilson & Hay, 2011). Η έκφραση του HIF1a εξαρτάται και από το mTORC1 και από το mTORC2, ενώ η έκφραση του HIF2a εξαρτάται μόνο από το mTORC2 (Toschi et al, 2008).

Υπό συνθήκες νορμοξίας, ο HIF1a ουβικουτινιλιώνεται από το παράγωγο του γονιδίου *VHL* (Von Hippel-Lindau) και αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Υπό υποξία, ο HIF1a ετεροδιμερίζεται με τον HIF1β, και ρυθμίζουν την μεταγραφή παραγόντων αγγειογένεσης όπως την παραγωγή του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF, (vascular endothelial growth factor) , καθώς και την μεταγραφή εκατό και παραπάνω λοιπών γονιδίων (Hickey & Simon, 2006; Semenza, 2001).

## **Ενεργότητα επαγόμενη από κυτταρική βλάβη ή βλάβη DNA**

Η καταστροφή της τουμπουλίνης λόγω του taxol, προκαλεί αποφωσφορυλίωση της Ser2448 του mTORC1 και ενεργοποίησή του. Το mTORC1 με την σειρά του προκαλεί ανασταλτική φωσφορυλίωση της BCL-2 και φωσφορυλιώνει την S6K1 στις θέσεις Thr421 και Ser424, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε απόπτωση (Asnaghi et al, 2004; Calastretti et al, 2001).

Η βλάβη του DNA ενεργοποιεί την p53, που με την σειρά της προκαλεί την ενεργοποίηση του AMPK το οποίο ενεργοποιεί το TSC1/TSC2 και έτσι αναστέλλεται η δράση του mTORC1. Αυτό προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου ώστε το κύτταρο να προβεί στις απαραίτητες διορθώσεις (Feng et al, 2005). Εάν η βλάβη δεν διορθώνεται τότε το mTORC1 μεταβαίνει από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει την p53 στην Ser15 και επάγεται η μεταγραφή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bax και το κύτταρο οδηγείται στην διαδικασία της απόπτωσης (Castedo et al, 2002).

## **Ενεργότητα επαγόμενη από φλεγμονή**

Στην φλεγμονή κατά την ανοσοαπόκριση, απελευθερώνεται η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-2 (Interleukin 2). Η IL-2 προσδένει στον υποδοχέα IL-2R (Interleukin 2 Receptor) και ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K και RAS ενεργοποιώντας το mTORC1 (Delgoffe et al, 2009) (Davies et al, 1993; Kahan, 1993; Trepanier et al, 1998).

Το ένζυμο IKK-β αποτελεί υπομονάδα της IκB κινάσης, η οποία ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB (Nuclear Transcription factor kappa-B). Οι ενεργοποιημένοι NF-κB εισέρχονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται στην φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Επιπρόσθετα το IKK-β, μέσω φωσφορυλίωσης απενεργοποιεί το σύμπλοκο TSC1/2 που είναι αναστολέας του mTORC1 και κατά συνέπεια ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του (Lee & Hung, 2007)

# **ΚΑΤΩΡΟΪΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ mTORC1**

Το mTORC1 αφότου ενεργοποιηθεί, όταν επάγει την απόπτωση φωσφορυλιώνει την S6K1 στις θέσεις Thr421 και Ser411, ενώ όταν επάγει την επιβίωση, φωσφορυλιώνει την S6K1 στις θέσεις Thr389 και Ser424 και την 4E-BP1 στις θέσεις Thr37/46/65/70/, και Ser65/83/110/112 (Asnaghi et al, 2004; Harris & Lawrence, 2003).

## **Ρύθμιση κυτταρικής αύξησης και ανάπτυξης.**

Η mTOR ρυθμίζει θετικά τον κυτταρικό κύκλο κατά το μεταβατικό στάδιο της φάσης G1/S, μέσω καταστολής της κυκλίνης D1, επαγωγή της κυκλίνης E και αποδόμησης των CIP αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p27 και p21 (Petroulakis et al, 2007; Takuwa et al, 1999).

Επίσης, ρυθμίζει την μετάφραση των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση της τροφοβλαστικής και γι' αυτό mTOR-knock out ποντίκια δεν ξεπερνούν αυτό το στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αναγκαιότητα της φυσιολογικής λειτουργίας της mTOR (Martin & Sutherland, 2001; Murakami et al, 2004a).

Επιπλέον το mTORC1 συμβάλλει στην διαφοροποίηση και ανάπτυξη του πνευμονικού κυψελιδικού επιθηλίου, των χονδροκυττάρων, των μυοκυττάρων και αδυποκυττάρων (Fingar et al, 2004; Otulakowski et al, 2009; Phornphutkul et al, 2008). Σε αυτούς τους ιστούς η mTOR ρυθμίζει την ενεργοποίηση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1α και συντονίζει την δράση των γλυκολυτικών ενζύμων οδηγώντας στην αύξηση της γλυκόλυσης (Pouyssegur et al, 2006; Shaw & Cantley, 2006). Από τα παραπάνω φαίνεται πως η mTOR συμβάλλει στην παθολογία μεταβολικών νοσημάτων όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης.

Ο έλεγχος της λιπιδικής βιοσύνθεσης γίνεται μέσω ενεργοποίησης των PPAR-γ και SREBP-1, δύο μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση πολλών λιπογενετικών γονιδίων (Laplane & Sabatini, 2009a). Επιπλέον το mTORC1 ρυθμίζει την Lipin1 που έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αδιπογένεσης επάγοντας την σύνθεση τριγλυκεριδίων και συμμετέχει στην ενεργοποίηση του PPAR-γ (Laplane & Sabatini, 2009a).

## Μετάφραση

Το mTORC 1, μέσω της κατωροϊκής σηματοδότησής του ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση καθώς ενεργοποιεί τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την συναρμολόγηση του μεταφραστικού μηχανισμού και την επιμήκυνση της μετάφρασης.

Οι S6K1 και 4E-BP1 περιέχουν συντηρημένη αλληλουχία πέντε αμινοξέων που ονομάζεται TOS motif (Tor signaling motif) και στο μεν S6K1 βρίσκεται στο NH<sub>3</sub>-τελικό του άκρο, ενώ στο 4E-BP1 εντοπίζεται στο COOH-τελικό του άκρο (Schalm & Blenis, 2002). Στην S6K1, η δράση της αλληλουχίας TOS εξυπηρετεί στην πρόσδεση της mTOR του mTORC1 ή κάποιου άλλου ανωροϊκού ενεργοποιητή κοινού και για την 4E-BP1. Διαγραφή ή μετάλλαξη στην TOS προκαλεί την αναστολή της S6K1 (Schalm & Blenis, 2002).

Όταν το σύμπλοκο mTORC1 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει την S6K1 στις θέσεις Thr389 και Ser424 και την ενεργοποιεί (Asnaghi et al, 2004).

Η S6K1 φωσφορυλιώνει την rS6 (Ribosomal Protein S6 ή 40S ribosomal protein S6). Αυτό οδηγεί στην αύξηση μετάφρασης της κατηγορίας των mRNA που περιέχουν 5' tract of oligopyrimidine (TOP) και που κωδικοποιούν τα στοιχεία του μεταφραστικού μηχανισμού όπως οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες και οι παράγοντες επιμήκυνσης (Wang et al, 2001).

Η ενεργή S6K1 απελευθερώνει τον παράγοντα επιμήκυνσης eIF3, φωσφορυλιώνει το eIF4B και αναστέλλει με φωσφορυλίωση την προ-αποπτωτική PDCD4 (Programmed cell death protein 4). Η φωσφορυλίωση των eIF4B και PDCD4 συνεπάγεται την ενεργοποίηση της eIF4A που είναι RNA-ελικάση και ξεδιπλώνει τις δευτεροταγείς δομές του 5' αμετάφραστου mRNA. Η απελευθέρωση του eIF3 προκαλεί την έλξη της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας (Ma & Blenis, 2009).

Η S6K1 ελέγχει την επιμήκυνση της μετάφρασης, αναστέλλοντας μέσω φωσφορυλίωσης την eEF2K. Αυτό συνεπάγεται την απελευθέρωση του eEF2 που προσδένει στην 40S υπομονάδα του ριβοσώματος (Ma & Blenis, 2009).

Επιπλέον η S6K1 μαζί με τις RSK (ribosomal s6 kinase), φωσφορυλιώνουν την β-υπομονάδα του CCT (Chaperonin Containing TCP-1) που είναι τμήμα του δικτύου σαπερόνων, υπεύθυνο για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Abe et al, 2009).

Σε συνθήκες ανενεργού mTORC1, το 4E-BP1 διμερίζεται με το eIF4E και εμποδίζει την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση. Όταν ενεργοποιείται το mTORC1 η RAPTOR έλκει την 4E-BP1 και διαμεσολαβεί στην πρόσδεση της στην mTOR μέσω των αλληλουχιών TOS (Fingar et al, 2004; Wang et al, 2003).

Η φωσφορυλίωση από το mTORC1 απενεργοποιεί το 4E-BP1 και έτσι αποδεσμεύεται το eIF4E προάγοντας την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση (Armengol et al, 2007). Ο ελεύθερος εναρκτήριο παράγοντας μετάφρασης eIF4E, προσδένει στον eIF4G που είναι προσδεμένος στον eIF4A και σχηματίζεται το eIF4F (Ma & Blenis, 2009). Στην συνέχεια στο σύμπλοκο eIF4F συνδέεται η eIF4B και ο eIF3 που φέρνει την 40S ριβοσωμική υπομονάδα (Schalm et al, 2003).

Αν και η 4E-BP1 και η S6K1 ελέγχουν την πρωτεϊνοσύνθεση, η 4E-BP1 ελέγχει κυρίως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η S6K1 ρυθμίζει κυρίως το μέγεθος του κυττάρου (Dowling et al, 2010).

## **Μεταγραφή και βιογένεση Ριβοσωμάτων**

Η πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητα ενός κυττάρου εξαρτάται από τον αριθμό των ριβοσωμάτων και των tRNA που διαθέτει. Η μεταγραφή των ριβοσωμικών RNA (rRNA) και tRNA εξαρτάται άμεσα από την σηματοδότηση του μονοπατιού mTOR (Tsang et al, 2010).

Η δραστηριότητα πολλών επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων, ιδιαίτερα όσων εμπλέκονται στα μεταβολικά και βιοσυνθετικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των επαγωγέων και ενεργοποιητών της μεταγραφής -1 και -2 (Stat -1 και Stat-3) και του πυρηνικού υποδοχέα PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ), εξαρτώνται από την φωσφορυλίωση της mTOR (Kim & Chen, 2004; Kristof et al, 2003).

## **Σύνθεση Πυριδιμίνων**

Η πολυλειτουργική πρωτεΐνη CAD, αποτελείται από 3 διακριτές περιοχές, που καταλύουν καθ' ένα από τα τρία εναρκτήρια στάδια της de novo σύνθεσης πυριμιδίων (Evans & Guy, 2004; Huang & Graves, 2003).



Όταν το σύμπλοκο mTORC1 ενεργοποιείται, τότε φωσφορυλώνει και ενεργοποιεί την S6K1. Το CAD ωστόσο, δημιουργεί ένα πολυμερικό σύμπλοκο με την mLST8 και έτσι με την σειρά του φωσφορυλιώνεται από την S6K1 με αποτέλεσμα την έναρξη της σύνθεσης πυριμιδίων (Ben-Sahra et al, 2013; Nakashima et al, 2013).

## **Αγγειογένεση**

Η mTOR έχει αποδειχτεί ότι προάγει την αγγειογένεση. Κατωροϊκά του TSC1/2, το mTORC1 ενεργοποιεί τον HIF-1α και ως εκ τούτου αυξορυθμίζει την παραγωγή του παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) (Janus et al, 2005). Αυτοί οι διαδοχικοί σηματοδοτικοί καταρράκτες παρατηρούνται τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα και τελικά οδηγούν στην νεοαγγειογένεση (Dobashi et al, 2011).

## **Αυτοφαγία**

Σε συνθήκες ασπίας αλλά και για την ανακύκλωση των οργανιδίων του, το κύτταρο διασπά το κυτταροπλασματικό του περιεχόμενο μέσω της αυτοφαγίας, όπου μακρομοριακές ενώσεις ανακυκλώνονται εντός ενός κενοτοπίου που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα (Lum et al, 2005).

Η mTOR μέσω του mTORC1, ρυθμίζει αρνητικά αυτή την καταβολική διεργασία μέσω μερικής αναστολής της ανακύκλωσης των αμινοξέων και των μεταφορέων γλυκόζης Glut. (Mamane et al, 2006; Vignot et al, 2005). Η ενεργοποιημένη mTOR αποτρέπει την αυτοφαγία ενώ η ανενεργή την προάγει. (Lum et al, 2005; Mamane et al, 2006).

Η μακροαυτοφαγία ελέγχεται μέσω του συμπλόκου ULK1- ATG13-FIP200 (Jung et al, 2009). Όταν τα θρεπτικά αποθέματα επαρκούν, το FIP200 αδρανοποιεί το TSC1/2 με συνέπεια την ενεργοποίηση του mTORC1 που με την σειρά του φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί τα ULK1/2 και ATG13, με τελικό στόχο την καταστολή της αυτοφαγίας (Gan et al, 2005). Όταν όμως τα αποθέματα μειωθούν ή μετά την έκθεση σε Ραπαμυκίνη, η αδρανοποίηση του mTORC1 προκαλεί την ενεργοποίηση του ULK1/2 που φωσφορυλιώνει το FIP200 και επάγει την μακροαυτοφαγία (Jung et al, 2009).

Σε πολλά καρκινικά κύτταρα το μονοπάτι PI3K/Akt/mTORC1 παραμένει ενεργό με συνέπεια την καταστολή της αυτοφαγίας. Η διαδικασία της αυτοφαγίας έχει ρόλο προστατευτικό για το κύτταρο, αλλά μπορεί να προστατεύσει και το καρκινικό κύτταρο από το μεταβολικό στρες. Τα καρκινικά κύτταρα της περιφέρειας ενός όγκου, που

βρίσκονται πλησίον αγγείων, διατηρούν κατεσταλμένη την αυτοφαγία, εκείνα όμως που βρίσκονται στον πυρήνα του όγκου την ενεργοποιούν ώστε να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες υποξίας και υποσιτισμού. Η καταστολή της αυτοφαγίας οδηγεί σε συσσώρευση κατεστραμμένων οργανιδίων, που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες και οδηγούν σε επιπλέον μεταλλάξεις. Η αναστολή της mTOR επάγει την αυτοφαγία και σε συνδυασμό με άλλες αντικαρκινικές θεραπείες προκαλούν υπερδιέγερση της αυτοφαγίας οδηγώντας το κύτταρο σε αυτοφαγικό θάνατο (Mathew et al, 2007).

## **Απόπτωση**

Η mTOR μέσω του συμπλόκου mTORC1 ελέγχει την διαδικασία της απόπτωσης. Κατά την φάση G1 ως επί το πλείστον επάγεται η επιβίωση του κυττάρου και το ενεργό mTORC1 ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση και τις άλλες μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου. Κατά την φάση G2 εάν κριθεί απαραίτητη η διενέργεια της απόπτωσης, το mTORC1 ενεργοποιείται, επάγοντας όμως αυτή την φορά την απόπτωση (Asnaghi et al, 2004).

Όταν το κύτταρο επάγει την επιβίωσή του, οι αντί-αποπτωτικές BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου με σκοπό την αποτροπή του ολιγομερισμού των προ-αποπτωτικών Bax και Bak και την απελευθέρωση των κασπασών. Η μετακίνησή τους στο μιτοχόνδριο επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης με την FKBP38. Για την ακρίβεια οι BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> ανταγωνίζονται την mTOR για την σύνδεση τους με την FKBP38. Η υπερέκφραση της FKBP38, αυξάνει τα επίπεδα των BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> στο μιτοχόνδριο αποτρέποντας την απόπτωση. Αντιθέτως, όταν η FKBP38 μειώνεται, μειώνονται και τα επίπεδα των BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> και επάγεται η απόπτωση (Zou et al, 2013).

Η απομάκρυνση της FKBP38 επιτρέπει την ενεργοποίηση της mTOR του mTORC1 και αποτρέπεται η απόπτωση μέσω της φωσφορυλίωσης της S6K1 στις θέσεις Thr389 - Ser411. Η ενεργή S6K1 προσδένει στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και προκαλεί ανασταλτική φωσφορυλίωση της προ-αποπτωτικής BAD (Li et al, 2002a), αυξάνει την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Survivin (IAP) (Vaira et al, 2007) και ενισχύει την αποικοδόμηση της προ-αποπτωτικής PDCD4 (programmed cell death 4) (Hwang et al, 2010).

Έμμεσα αναστέλλεται η απόπτωση και μέσω του eIF4E που είναι θετικός ρυθμιστής της επιβίωσης. Όταν η mTOR είναι ενεργή, φωσφορυλιώνει και καταστέλλει τον 4E-BP1, που αποσπάται από το eIF4E το οποίο μετατρέπεται σε λειτουργικά ενεργό. (Schalm et al, 2003)

Κατά την απόπτωση, ο μη φωσφορυλιωμένος υποκινητής της απόπτωσης 4E-BP1, μέσω των κασπασών, διασπάται και προσκολλάται στο eIF4E αναστέλλοντας την δράση του και προάγοντας την απόπτωση. (Mamane et al, 2006; Proud, 2005).

## **Γήρας και μνήμη**

Η Ραπαμυκίνη ανταγωνίζεται την μακροπρόθεσμη μνήμη στα ποντίκια και την κυτταρική γήρανση στις κυτταροκαλλιέργειες. Ως εκ τούτου η mTOR φυσιολογικά είναι πιθανόν να προάγει την μακροπρόθεσμη μνήμη και το κυτταρικό γήρας (senescence) (Wullschleger et al, 2006).

# mTORC1 και Ανθρώπινες Νόσοι

Μεταλλάξεις των γονιδίων που ρυθμίζουν τα ανωροϊκά μονοπάτια της mTOR οδηγούν σε πληθώρα συνδρόμων με κοινό χαρακτηριστικό την απορύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης.

Μεταλλάξεις που αδρανοποιούν τις TSC1 ή TSC2 οδηγούν στην Οζώδη Σκλήρυνση, νόσο που προκαλεί καλοήθεις όγκους γνωστούς ως αγγειομυολιπώματα (καλοήθες νεόπλασμα, αποτελούμενο από ποικίλα ποσά ώριμου λιπώδους ιστού, λείες μυϊκές ίνες και ανώμαλα αγγεία με παχιά τοιχώματα με συχνότερη εντόπιση στον νεφρό, ήπαρ και πνεύμονα) ή λεμφαγγειολειομυοματώματα (απαντώνται, σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα, στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας). Επίσης παρατηρείται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ινών στους βρόγχους, τους πνεύμονες, τα μάτια, τους νεφρούς και επιπλέον συνοδεύεται από νοητική υστέρηση και σπασμούς (van Slegtenhorst et al, 1997).

Τα σύνδρομα Peutz–Jeghers και PMSE (polyhydramnios, megalencephaly, and symptomatic epilepsy) προκαλούνται από την αδρανοποίηση της LKB1 ή της STRAD (ανωροϊκοί ενεργοποιητές του AMPK), αδρανοποιώντας το AMPK. Οι ασθενείς με Peutz–Jeghers παρουσιάζουν γαστρεντερικά αμαρτώματα και αυξημένη προδιάθεση ανάπτυξης κακοηθειών, ενώ οι πάσχοντες από PMSE υποφέρουν από σοβαρές νευρολογικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες (Hemminki et al, 1998; Orlova et al, 2010).

Η νευροϊνομάτωση τύπου I είναι μία αυτοσωμική επικρατής νόσος που οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου NF1 της νευροϊνομίνης. Η νευροϊνομίνη φυσιολογικά απενεργοποιεί το μονοπάτι RAS, διατηρώντας ανενεργό το mTORC1 (Xu et al, 1990). Όταν υπάρχει μετάλλαξη στο NF1, η RAS-GTP αυξάνεται, ενεργοποιούνται η MEK/MAPK και η RSK1 που με τη σειρά τους προκαλούν αδρανοποίηση του συμπλόκου TSC1/2 με συνέπεια την ενεργοποίηση του mTORC1 (Johannessen et al, 2005). Οι ασθενείς παρουσιάζουν νευρινώματα και πολυσυστηματική διαταραχή με νευρολογικές, μυοσκελετικές, οφθαλμολογικές και δερματικές ανωμαλίες και προδιάθεση για νεοπλασία.

Στην νορμοξία, οι ενεργές PHDs 1,2 και 3 (Prolyl Hydroxyl Dehydrogenases 1-3), μέσω της ουβικουιπίνης λιγάσης pVHL (Von Hippel-Lindau), προκαλούν την αποικοδόμηση του

HIF1-α. Μετάλλαξη στο γονίδιο *VHL* αντιτάσσεται στην απενεργοποίηση του mTORC1 από το HIF1-α με αποτέλεσμα την εξάπλωση αιμαγγειωμάτων, την εκδήλωση καρκίνου νεφρών και παγκρέατος και την εμφάνιση φαιοχρωμοκυττωμάτων (Efeyan et al, 2012).

Μεταλλάξεις που εμποδίζουν την δράση του PTEN προκαλούν τη νόσο Cowden (αυτοσωμική επικρατής νόσος με ανάπτυξη αμαρτωμάτων και ανάπτυξη καρκίνου) (Liaw et al, 1997), την πάθηση Proteus (συγγενής ανωμαλία με δυσπλασία οστών και ανάπτυξη όγκων) (Zhou et al, 2001), καθώς και το σύνδρομο Bannayan–Riley–Ruvalcaba (μακροκεφαλία, μακροσωμία και αμαρτώματα) (Marsh et al, 1997).

Μετάλλαξη του *Akt* προκαλεί σύνδρομο χαρακτηρισμένο από σοβαρή υπογλυκαιμία, ασύμμετρη ανάπτυξη και παχυσαρκία (Hussain et al, 2011).

Μετάλλαξη του γονιδίου *Ragulator* προκαλεί απορύθμιση της επαγόμενης από αμινοξέα σηματοδότησης του mTORC1 και οι ασθενείς παρουσιάζουν καθυστέρηση της ανάπτυξης και ανοσοκαταστολή (Bohn et al, 2007).

Παρά το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις των ρυθμιστών της mTOR προκαλούν τόσα πολλά σύνδρομα, μέχρι στιγμής και εξαιρουμένων των σποραδικών καρκίνων, δεν έχει βρεθεί μετάλλαξη που να αφορά την ίδια την mTOR. Πιθανή εξήγηση είναι ότι μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο *mTOR* είναι ασύμβατες με την ζωή κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Το 2004 η ομάδα του Murakami δημιούργησε χιμαιρικά ποντίκια με ετερόζυγη μετάλλαξη στην mTOR. Οι μεταξύ τους διασταυρώσεις που ακολούθησαν, απέδειξαν ότι η απουσία της mTOR προκαλεί εμβρυικό θάνατο 6,5-7,5 ημέρες μετά την σύλληψη λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης της γαστριδίωσης (στάδιο δημιουργίας των τριών βλαστικών στοιβάδων) (Gerlinger et al, 2012; Murakami et al, 2004b; Sato et al, 2010).

## mTOR και καρκίνος

Η απορύθμιση των αρνητικών ρυθμιστών της mTOR (TSC1/2, LKB1 και PTEN) οδηγεί σε ογκογένεση. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR εμπλέκεται σε πληθώρα καρκίνων όπως των ωθηκών, του πνεύμονα, του παγκρέατος, λευχαιμία, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού (Dobashi et al, 2011). Μεγάλη συσχέτιση έχει η φωσφορυλίωση της mTOR με το μέγεθος του όγκου και την μεταστατική του ικανότητα (Feng et al, 2011).

Η ενεργοποίηση του S6K είναι θεμελιώδης για τον καρκίνο των ωθηκών και του μαστού (Wong et al, 2001), ενώ η ενεργοποίηση του eIF4E παρατηρείται αυξημένη στους καρκίνους του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου, του ήπατος, του εντέρου και του μαστού (Dobashi et al, 2011). Επιπλέον, η mTOR έχει βρεθεί να εμπλέκεται και στον καρκίνο των οστών, καθώς και στο σάρκωμα (Dobashi et al, 2009).

Σε καρκινικά κύτταρα που έχουν βλάβη του p53, παρά την βλάβη στο DNA που προκαλείται από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, το mTORC1 παραμένει ενεργό, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται παρά τις σοβαρότατες γονιδιακές βλάβες. Καθώς η επιβίωση αυτών των κυττάρων εξαρτάται από την ενεργότητα του mTORC1, ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και αναστολέων mTOR, αποτελεί αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση (Wander et al, 2011).

Άλλο ένα φαινόμενο που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα και εμπλέκεται η mTOR, είναι το φαινόμενο Warburg όπου παρά την επάρκεια σε οξυγόνο, το ενεργό mTORC1 φωσφορυλιώνει τον HIF1α και τελικά γίνεται αερόβια γλυκόλυση. (Vander Heiden et al, 2009)

Αν και δεν έχει ξεκαθαριστεί αν η καρκινογένεση ξεκινά ή προκαλείται από τροποποιήσεις της mTOR σηματοδότησης, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι στην πλειονότητα των όγκων, η δραστηριότητα του mTORC1 είναι αυξημένη και η αναστολή του αποτελεί πολλά υποσχόμενη θεραπεία (Meric-Bernstam & Gonzalez-Angulo, 2009).

# ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ mTOR

Η φυσιολογική ή η επαγόμενη από μεταλλάξεις αυξορύθμιση της mTOR, αποτελεί κοινό φαινόμενο σε πολλούς καρκινικούς όγκους.

Η mTOR έχει δύο ενδοκυττάριους αναστολείς, την DEPTOR και την FKBP38

Έως αυτή την στιγμή η αναστολή του mTOR επιτυγχάνεται με την χρήση Ραπαμυκίνης και των αναλόγων της temsirolimus, everolimus, και deforolimus (Borders et al, 2010). Οι παράγοντες αυτοί έχουν μελετηθεί τόσο μόνοι τους όσο και σε συνδυασμούς (Borders et al, 2010). Υπό μελέτη είναι και άλλα υποψήφια μόρια.

Η δράση των αναστολέων της mTOR ως ογκοκατασταλτικά είναι πιο αξιοσημείωτη σε καρκινικά κύτταρα με έντονο ρυθμό πολλαπλασιασμού νευροεκτοδερματικής προέλευσης όπως του νευροβλαστώματος, καθώς και σε κύτταρα με υψηλή έκφραση IGF όπως απαντώνται στο φατνιακό ραβδομυοσάρκωμα (Hosoi et al, 1999).

# ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

## **DEPTOR**

Η **DEPTOR** (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, μέσω ρύθμισης πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η ανάπτυξη, η απόπτωση, η αυτοφαγία, το EMT και η φαρμακευτική αντίσταση. Επιπλέον έχει διπλό ρόλο ως ογκοκατασταλτικό ή ογκογονίδιο αναλόγως του τύπου του όγκου και του ιστού (Chen et al, 2012b).

Κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 8q24.12 (Sabatini, 2006) και αποτελεί ενδογενή αναστολέα της mTOR (Peterson et al, 2009).

Κατόπιν επίδρασης αυξητικών παραγόντων, ενεργοποιείται η RSK και προκαλεί την ενεργοποίηση της mTOR, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την DEPTOR. Η φωσφορυλιωμένη DEPTOR οδηγείται στο πρωτεάσωμα από τον επαγωγέα του κυτταρικού κύκλου SCFβ-TrCP, που έχει δράση E3 ουβικουπίνης λιγάσης. Η απομάκρυνσή της από την mTOR οδηγεί σε ενεργοποίηση και των δύο mTORC συμπλόκων (Duan et al, 2011).

Επειδή η mTOR εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο και η πρόσδεση της DEPTOR την αναστέλλει, η τελευταία θεωρείται ογκοκατασταλτική και μάλιστα σε πολλά καρκινικά κύτταρα παρουσιάζει μειωμένη ρύθμιση (Duan et al, 2011).

Ο λόγος που ταυτόχρονα θεωρείται και ογκογονίδιο είναι διότι προκαλεί αναδραστική ενεργοποίηση του PI3K/Akt και παραδόξως έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα, του θυρεοειδούς και στην χρόνια μυελοειδή λευχαιμία (Chin et al, 2007; Pei et al, 2011). Επιπρόσθετα η έκφραση της DEPTOR σχετίζεται με την μετάσταση σε απομακρυσμένους ιστούς (Pei et al, 2011).



## ***FKBP38***

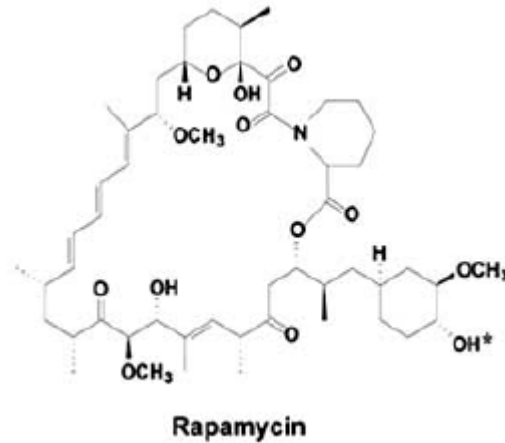
Η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη FKBP38, είναι ενδογενής αναστολέας μόνο του mTORC1 καθώς προσδένει στην FRB περιοχή της mTOR και αλληλεπιδρά με τις Raptor, και mLST8 (Bai et al, 2007). Ο μηχανισμός της αναστολής που προκαλεί, είναι παρόμοιος με του συμπλόκου Ραπαμυκίνη/FKBP12 και επειδή μεταξύ τους δρουν ανταγωνιστικά για την πρόσδεση στην mTOR, τα κύτταρα που εκτίθενται στην Ραπαμυκίνη έχουν μειωμένα επίπεδα πρόσδεσης FKBP38 (Bai et al, 2007).

Η απενεργοποίηση του TSC2, όπως είδαμε νωρίτερα, απελευθερώνει ενεργοποιημένη Rheb-GTP που προσδένει στην FKBP38 και την αποσπά από την mTOR ενεργοποιώντας το σύμπλοκο mTORC1. Μετά την αποδέσμευσή της από την mTOR, μεταφέρει τις BCL-2 και BCL-X<sub>L</sub> στο μιτοχόνδριο. (Bai et al, 2007).

## ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η φαρμακολογική αναστολή της mTOR περιορίζει τα καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν ενεργό PI3K/Akt λόγω απώλειας του PTEN, υπερέκφρασης της Akt ή ενεργοποίησής του Akt μέσω αυξητικών παραγόντων (Neshat et al, 2001). Το ενεργό μονοπάτι PI3K/Akt/mTORC1 προκαλεί την καταστολή της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα την εξέλιξη του όγκου (Kondo et al, 2005). In vitro δοκιμές, σε κύτταρα μαστού με υψηλή έκφραση Akt και αντοχή στην θεραπεία με tamoxifen, έδειξαν ότι η χρήση αναστολέων mTOR αντισταθμίζει την αντίσταση έναντι του tamoxifen (deGraffenried et al, 2004). Επίσης το ίδιο παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα μαστού με υπερνεργό τον ER (estrogen receptor), όπου εμφανίζουν αντίσταση στα letrozole και fulvestrant (Beeram et al, 2007). Τέλος καλύτερη είναι και η ανταπόκριση όταν τα doxorubicin (McCubrey et al, 2008), paclitaxel, imatinib και carboplatin χορηγούνται μαζί με αναστολείς mTOR όπου συμβάλλουν στην εξουδετέρωση της αντίστασης του κυτταρού στη θεραπεία με τα αυτά τα φάρμακα (Mondesire et al, 2004).

# ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗ



(Vilar et al, 2011)

Η Ραπαμυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό (carbocyclic lactone-lactam-macrolide) με ογκοκατασταλτική και ανοσοκατασταλτική δράση, 100 φορές ισχυρότερη από την Κυκλοσπορίνη (Yatscoff et al, 1995). Αρχικώς χορηγούνταν ως αντιμυκητιστακή αγωγή έναντι των *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, και *Aspergillus fumigatus* (Singh et al, 1979; Vezina et al, 1975).

Τα δύο βασικά χαρακτηριστικά της, είναι η μεγάλη ειδικότητα στο mTORC1 και η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης ορισμένων στόχων του (Ballou & Lin, 2008). Απενεργοποιώντας το mTORC1, σταματά τόσο η σηματοδότηση επιβίωσης όσο και η σηματοδότηση απόπτωσης και το κύτταρο παραμένει σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης (senescence) (Asnaghi et al, 2004).

Δυνητικά μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση σηματοδοτικού μονοπατιού επιβίωσης, επαγόμενο από την mTOR, με συνέπεια την θεραπευτική αποτυχία (Ballou & Lin, 2008). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποτραπεί από μόρια ανταγωνιστές του ATP, που εδράζει στην καταλυτική περιοχή της mTOR προκαλώντας την απενεργοποίησή της mTOR δίχως να επάγεται σηματοδότηση επιβίωσης (Ballou & Lin, 2008). Παρόλο που εδώ και δύο δεκαετίες είναι γνωστό ότι η Ραπαμυκίνη παρεμβαίνει στην κυτταρική λειτουργία που σχετίζεται με την mTOR, παραμένει ακόμα ασαφής ο λεπτομερής τρόπος που ασκεί την δράση της καθώς και το ότι απαιτείται 50 φορές μεγαλύτερη δοσολογία Ραπαμυκίνης in

in vitro για την αναστολή της mTOR, σε σχέση με την in vivo εφαρμογή της (Wang & Proud, 2011). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες μελέτες που πραγματεύονται τον τρόπο σύνδεσης του συμπλόκου Ραπαμυκίνης/FKBP12 στην FRB της mTOR του mTORC1. Ειδικότερα, οι Kim D.H. και Sarbassov D. στην μελέτη τους, υποστηρίζουν ότι η πρόσδεση του συμπλόκου Ραπαμυκίνης/FKBP12 αποσταθεροποιεί την σύνδεση mTOR-Raptor χωρίς όμως την διάσπαση του mTORC1 (Kim et al, 2002). Από την άλλη, η ομάδα του Jacinto E. παρουσίασε ότι το Ραπαμυκίνη/FKBP12 και η Raptor προσδένουν ταυτόχρονα πάνω στην FRB της mTOR, χωρίς το mTORC1 να χάνει την δομή του (Jacinto et al, 2004). Τέλος, η ηλεκτρονική μικροσκόπηση του mTORC1 υπέδειξε ότι in vitro, η παρατεταμένη έκθεση του συμπλόκου σε Ραπαμυκίνη/FKBP12 προκαλώντας τον κατακερματισμό του (Yip et al, 2010).

Όταν το σύμπλοκο Ραπαμυκίνη/FKBP12 προσδέσει στην FRB της mTOR, οδηγεί σε αδυναμία της RAPTOR να αναγνωρίσει τις αλληλουχίες TOS των S6K1 και 4EBP1, με αποτέλεσμα την αδυναμία πρόσδεσής τους και φωσφορυλίωσης από την mTOR (Lee et al, 2008; Nojima et al, 2003).

Η αδυναμία αδρανοποίησης του mTORC2 σχετίζεται με το ότι η FRB περιοχή του είναι απροσπέλαστη από το σύμπλοκο Ραπαμυκίνη/FKBP12. Παρόλο αυτά έχει δείχτεί ότι η παρατεταμένη έκθεση στην Ραπαμυκίνη, μειώνει τα επίπεδα της de novo συναρμολόγησης mTORC2 (Sabatini, 2006; Sarbassov et al, 2006).

Η Ραπαμυκίνη προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, λόγω αύξησης του p27 και επιπλέον προκαλεί τριπλασιασμό των επιπέδων BCL-2, αναστέλλοντας την απόπτωση. Η αύξηση των επιπέδων της BCL-2 οφείλεται στην αναστολή της φωσφορυλίωσής της, εξαιτίας της Ραπαμυκίνης (Calastretti et al, 2001). Το Taxol προκαλεί καταστροφή της τουμπουλίνης, ενεργοποιεί την mTOR, και προκαλεί την ανασταλτική φωσφορυλίωση στην BCL-2, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν ήδη εκτεθεί σε Ραπαμυκίνη, τότε η απόπτωση αποτρέπεται (Asnaghi et al, 2004; Calastretti et al, 2001).

Η Ραπαμυκίνη αναστέλλοντας το mTORC1, παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση της p53 και έτσι αναστέλλεται η απόπτωση. Επιπλέον αναστέλλει την επαγόμενη UVA-UVB ενεργοποίηση της S6K1 (Asnaghi et al, 2004).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η mTOR ελέγχει τη μετάφραση των επαγομένων από την υποξία παραγόντων HIF-1α και HIF-2α που ρυθμίζουν την προσαρμογή και αγγείωση των όγκων στην υποξία. Η αντικαρκινική δράση του Ραπαμυκίνης, σε αυτή την περίπτωση,

έγκειται στην ικανότητά της να καταστέλλει τα επίπεδα των HIF και VEGF στον όγκο ή στο μικροπεριβάλλον του και επομένως να διαταράσσει την ανάπτυξη των αγγείων (Chen et al, 2012a). Επιπλέον η Ραπαμυκίνη προκαλεί μείωση των επιπέδων της survivin με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού απόπτωσης των κυττάρων υπό ένδεια οξυγόνου (Chen et al, 2012a).

Η θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου με Ραπαμυκίνη, αυξάνει την ρύθμιση της Akt, με αποτέλεσμα την προαγωγή της επιβίωσης του κυττάρου, όταν κανονικά θα ήταν αναμενόμενη η απόπτωσή του (O'Reilly et al, 2006).

Η ομάδα της O'Reilly έδειξε ότι η αναστολή του mTORC1 από την Ραπαμυκίνη, προκαλεί αναδραστική ενεργοποίηση του PI3K/Akt. Όταν το mTORC1 είναι ενεργό, φωσφορυλιώνει την S6K1, η οποία εκτός των άλλων λειτουργιών της, αναστέλλει το IRS-1 και κατ' επέκταση σταματάει το PI3K/Akt. Υπό την δράση Ραπαμυκίνης, η S6K1 είναι ανενεργή και συνεπώς δεν μπορεί να σταματήσει την IRS-1, με αποτέλεσμα να το PI3K/Akt να ενεργοποιείται και μαζί με αυτό και το mTORC1 (O'Reilly et al, 2006). Οι καρκινικές σειρές που είχαν PTEN-wt ή PTEN-mutated παρουσίασαν αύξηση της δραστηριότητας της Akt κατόπιν έκθεσης στην Ραπαμυκίνη (O'Reilly et al, 2006). Επιπλέον, οι καρκινικές σειρές μαστού MCF-7 (μετάλλαξη PI3K) (Bachman et al, 2004), SkBR3 και BT474 (μετάλλαξη EGFR2) (O'Reilly et al, 2006), η κυτταρική σειρά προστάτη DU-145 (PTEN wild-type) και η σειρά Rh30 του ραβδομυοσαρκώματος (O'Reilly et al, 2006), μετά από παρατεταμένη έκθεση στην Ραπαμυκίνη παρουσίασαν αυξημένη φωσφορυλίωση της Akt στην S473 (O'Reilly et al, 2006; Sun et al, 2005). Τέλος έδειξαν ότι ο IGF-I ανταγωνίζεται την κατασταλτική δράση της Ραπαμυκίνης ενώ η αναστολή του IGF-IR καθιστά τα καρκινικά κύτταρα ευαίσθητα στην δράση της Ραπαμυκίνης (O'Reilly et al, 2006).

Κατά την φλεγμονή προκαλείται πολλαπλασιασμός των T-λεμφοκυττάρων. Η Ραπαμυκίνη μέσω αναστολής του mTORC1 αναστέλλει την φωσφορυλίωση του p70S6K και συνεπώς μειώνεται η σύνθεση mRNA των ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων. (Kuo et al, 1992; Terada et al, 1995).

Μεταλλάξεις στην α-συνουκλεΐνη (Πάρκινσον) ή την Χαντικτίνη (νόσος Huntington) οδηγούν στην συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων (Kegel et al, 2000). Η αυτοφαγία είναι πιθανόν να προστατεύει από τις τοξικές συνέπειες της συσσώρευσης βλαμμένων πρωτεϊνών. Σε κυτταρικές σειρές με τις ανωτέρω μεταλλάξεις, η χρήση Ραπαμυκίνης

έδειξε να επάγει την αυτοφαγία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών προκαλώντας την μείωση της συσσώρευσής τους (Ravikumar et al, 2002)

## **Sirolimus - Rapamune**

Το sirolimus™ ή Rapamune® (παραγωγή από Wyeth, PA, USA) που είναι Ραπαμυκίνη, πήρε άδεια κυκλοφορίας από το FDA στις 15 Σεπτεμβρίου 1999 και είναι εγκεκριμένο ανοσοκατασταλτικό σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού (Gallant-Haidner et al, 2000).

Σοβαρή επιπλοκή μετά από μεταμόσχευση ενός οργάνου, είναι η εμφάνιση κακοήθειας. Για τον λόγο αυτό, προτιμάται η χρήση αναστολέων της mTOR, σε σχέση με τους αναστολείς καλσινευρίνης (η καλσινευρίνη ενεργοποιεί τα T-λεμφοκύτταρα), μιας και εκτός από τις ανοσοκατασταλτικές της ιδιότητες, προσφέρει και ογκοκατασταλτική δράση (Gutierrez-Dalmau & Campistol, 2007). Βεβαίως, η ταυτόχρονη χρήση του Rapamune με έναν αναστολέα καλσινευρίνης δεν επιτρέπεται, καθώς ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου ή θρομβωτικής θρομβοκυττοπενικής πορφύρας και θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας εξαιτίας του αναστολέα καλσινευρίνης (Ekberg et al, 2007).

Λόγω της ανοσοκαταστολής που προκαλείται από την λήψη του sirolimus, αυξάνεται η πιθανότητα λοιμώξεων καθώς και της σηψαιμίας. Στις λοιμώξεις αυτές συμπεριλαμβάνεται η σχετιζόμενη νεφροπάθεια από πολυομαϊό BK, και η προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια (PML) σχετιζόμενη με τον ιό JC (Hirsch et al, 2002). Επίσης λόγω εμφάνισης πνευμονίας από *Pneumocystis carinii* πρέπει να λαμβάνεται η απαιτούμενη προστασία (Oz & Hughes, 1997)

Σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης ήπατος, η χρήση του sirolimus σε συνδυασμό με Κυκλοσπορίνη ή tacrolimus έχει συσχετιστεί με την αύξηση της συχνότητας θρόμβωσης της ηπατικής αρτηρίας, με συνέπεια την απώλεια του μοσχεύματος έως και τον θάνατο (Trotter, 2003).

Σε ασθενείς με μεταμόσχευση πνευμόνων, η χρήση sirolimus ως μέρος του ανοσοκατασταλτικού σχήματος, μπορεί να προκαλέσει διάσπαση της βρογχικής

αναστόμωσης με θανατηφόρο συνέπεια. Η επιπλοκή αυτή φαίνεται να οφείλεται στην διατάραξη της επούλωσης τραυμάτων που σχετίζεται με την Ραπαμυκίνη και η χρήση του sirolimus απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή (Groetzner et al, 2004; Stuckey et al, 2013).

Υψηλές δόσεις Ραπαμυκίνης αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών και λείων μυϊκών κυττάρων αλλά και την μετανάστευσή τους μετά από μηχανική βλάβη, όπως είναι η τοποθέτηση stent ή η αποβολή μοσχεύματος (Ochiai et al, 1993). Η θεραπεία της στεφανιαίας αρτηριακής νόσου με BMS (bare-metal stent) θεωρείται αποτελεσματική αλλά στο 15-35% των περιστατικών παρουσιάζεται επαναστένωση και η θεραπεία πρέπει να επαναληφθεί (Ardissino et al, 2004). Τα stent με επικάλυψη Ραπαμυκίνης RES (rapamycin-eluting stent), που πήραν άδεια κυκλοφορίας από το FDA το 2003, μειώνουν τον σχετικό κίνδυνο επαναστένωσης μετά από 24 μήνες κατά 82% (Guo et al, 2013; Moses et al, 2003).

Η επίδραση του sirolimus μειώνει την ηπατική ίνωση κυρίως λόγω αναστολής πολλαπλασιασμού των κυττάρων stellate. Επιπλέον, το sirolimus αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών (Trotter, 2003).

Στο παιδικό ραβδομυοσάρκωμα, το sirolimus προτρέπει την ανεξάρτητη από p53 απόπτωση (Hosoi et al, 1999), όμως αναστέλλει την δράση του taxol πιθανώς εμποδίζοντας την αδρανοποίηση του BCL-2 (Calastretti et al, 2001).

Το sirolimus μεταβολίζεται πλήρως στο ήπαρ και στο εντερικό τοίχωμα και αποτελεί υπόστρωμα του ισοένζυμου CYP3A4 και της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (αντλία εκροής φαρμάκων) που εδράζουν εκεί. In vitro αναστέλλει το ανθρώπινο ηπατικό μικροσωμιακό κυτόχρωμα P450, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 και CYP3A4/5, όμως για να παρατηρηθεί κάτι τέτοιο in vivo, απαιτούνται πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου από εκείνες που λαμβάνουν οι ασθενείς στα πλαίσια της θεραπείας με sirolimus.

Οι αναστολείς του CYP3A4 (γκρέιπφρουτ, ρόδι, φάρμακα) μειώνουν τον μεταβολισμό του sirolimus και έτσι τα επίπεδά του αυξάνονται στο αίμα, ενώ αντιθέτως οι επαγωγείς του CYP3A4 αυξάνουν τον μεταβολισμό του φαρμάκου προκαλώντας μείωση των επιπέδων του (Gallant-Haidner et al, 2000).

## Παρενέργειες

Από τις πιο κοινές παρενέργειες του sirolimus κατά την νεφρική μεταμόσχευση είναι η δυσλιπιδαιμία και η υπερλιπιδαιμία, που όμως οφείλονται κυρίως στην ταυτόχρονη λήψη sirolimus με cyclosporine A και prednisone (Trotter, 2003).

Στις παρενέργειες του φαρμάκου έχουν αναφερθεί το περιφερικό οίδημα, το λεμφοίδημα, η υπεζωκοτική συλλογή και η συλλογή περικαρδίου (Merkel et al, 2006).

Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου είναι η θρομβοκυττοπενία, η αναιμία, η πυρεξία, η υπέρταση, η υποκαλιαιμία, η υποφωσφοραιμία, η λοίμωξη των ουροφόρων οδών, η υπερχοληστεριναιμία, η υπεργλυκαιμία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, το κοιλιακό άλγος, η λεμφοκίλη, το περιφερικό οίδημα, η αρθραλγία, η ακμή, η διάρροια, το άλγος, η δυσκοιλιότητα, η ναυτία, η κεφαλαλγία, η αυξημένη κρεατινίνη αίματος, και η αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση αίματος (LDH) (Merkel et al, 2006).

Προσοχή χρειάζεται κατά την χρήση Ραπαμυκίνης μιας και η ανοσοκαταστολή αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης λεμφώματος και άλλων κακοηθειών, ιδιαίτερα στο δέρμα (Euvrard et al, 2003).

Τέλος όπως προαναφέρθηκε χρήση sirolimus, ταυτόχρονα με αναστολέα καλσινευρίνης, επιφέρει σοβαρότατες παθολογικές καταστάσεις σχετιζόμενες με θρόμβωση (Ekberg et al, 2007).



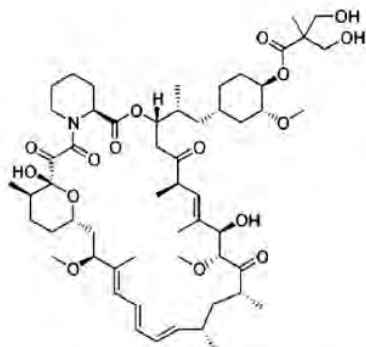
## ΑΝΑΛΟΓΑ ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗΣ

Ανάλογα Ραπαμυκίνης	Δομή	Μηχανισμός δράσης
CCI779 (Temsirolimus)	Μακρολιδικός εστέρας	Πρόσδεση στην FKBP12
RAD001 ( Everolimus)		
AP23573 (Ridaforolimus)		
SAR943 (32 deoxy rapamycin)		
ABT578 (Zotarolimus)		

(Zhou et al, 2010)

Εκτός από την Ραπαμυκίνη-sirolimus™, στον άνθρωπο χρησιμοποιούνται και τρία ανάλογά της (Rapalogs), το **everolimus**™ (RAD001 Afinitor®, Novartis, NJ, USA), το **zotarolimus** (ABT-578 Endeavor® Medtronic, MI, USA) και **temsirolimus**™ (CCI779, Torisel® Wyeth-Pfizer, PA, USA). Το **ridaforolimus**™ (AP23573, Jenzyl® Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) αν και πολλά υποσχόμενο στην αρχή, αποσύρθηκε από την ίδια την εταιρία λόγω αμφίβολων αποτελεσμάτων (Ballou & Lin, 2008; Krakstad & Chekenya, 2010).

## **CCI779 (Temsirolimus-Torisel)**



**Temsirolimus**

(Vilar et al, 2011)

Το CCI779 (Temsirolimus) έχει μοριακό τύπο  $C_{56}H_{87}NO_{16}$  και είναι 2-υδροξυμεθυλοπροπιονικός οξικός εστέρας που δρα ως προφάρμακο της Ραπαμυκίνης και ανακαλύφθηκε το 1990. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι 13–25 h και έχει δράση αντιμυκητisiaκή, ανοσοκατασταλτική και ογκοκατασταλτική. Επειδή είναι υδατοδιαλυτό, χορηγείται ενδοφλέβια και μετατρέπεται ταχέως σε Ραπαμυκίνη όπου και συνδέεται με την FKBP12 (Ballou & Lin, 2008; Boulay et al, 2004). Επιδεικνύει ογκοκατασταλτική δράση είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με κυτταροτοξικούς παράγοντες, σε πλειάδα ανθρώπινων καρκίνων μοντέλων, συμπεριλαμβανομένων του γλοιώματος, του ραβδομυοσαρκώματος, του νευροεκτοδερμικού όγκου όπως το νευροσπογγιοβλάστωμα της κεφαλής, του λαιμού, του προστάτη, του μαστού, και του παγκρέατος. (Georger et al, 2001; Yu et al, 2001).

Όπως και με το Sirolimus, οι ανθρώπινοι όγκοι που είναι πιο ευαίσθητοι στην δράση του Temsirolimus, είναι αυτοί που τα κύτταρά τους παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του PTEN, είναι θετικά για ER(estrogen receptor) και/ή υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο Her2/Neu. In vitro δοκιμές έχουν δείξει ότι μεγαλύτερη ευαισθησία στην δράση του φαρμάκου εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα με θετικό ER, υπερέκφραση του HER-2/Neu ή ανεπάρκεια έκφρασης PTEN (Yu et al, 2001).

Στον άνθρωπο το Torisel ενδείκνυται ως θεραπεία πρώτης γραμμής των ενηλίκων ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC-Renal Cell Carcinoma) . Επιπλέον, ενδείκνυται για τη θεραπεία των ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον και/ή ανθεκτικό στη θεραπεία λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (MCL-Mantle Cell Lymphoma)(καρκίνος λεμφικού ιστού) (Argyriou et al, 2012).

Τέλος, δεν πρέπει να γίνεται παράλληλη κατανάλωση χυμού γκρέιπφρουτ λόγω αναστολής του CYP3A4. (FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER) – June 2011).

### **Παρενέργειες**

Η συχνότητα και η σοβαρότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών είναι δόσο-εξαρτώμενη.

Οι κύριες παρενέργειες του CCI779 είναι κυρίως δερματικές με έκζεμα, ερυθρομάτωση, ξηροδερμία και ανωμαλίες νυχιών, καθώς επίσης και έξαψη, θωρακικό άλγος, δύσπνοια, υπόταση και άπνοια. Επιπλέον, μπορεί να παρουσιαστεί υπεργλυκαιμία, υπερχοληστεριναιμία, αναστρέψιμη μείωση τεστοστερόνης ορού και ασυμπτωματική υποκαλιαιμία. Σε υψηλές δόσεις μπορεί να προκληθεί ήπια θρομβοπενία και διπολικές συμπεριφορές σε άτομα χωρίς προηγούμενο ιστορικό ψυχιατρικών διαταραχών (Huang & Houghton, 2002; Kwitkowski et al, 2010).

Οι ηλικιωμένοι ασθενείς ( $\geq 65$  ετών) είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν συγκεκριμένες ανεπιθύμητες ενέργειες συμπεριλαμβανομένων της υπεζωκοτικής συλλογής, άγχους, κατάθλιψης, αϋπνίας, δύσπνοιας, λευκοπενίας, λεμφοπενίας, μυαλγίας, αρθραλγίας, απώλειας γεύσης, ζάλης, λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, βλεννογονίτιδας και ρινίτιδας (Madison, NJ Wyeth Pharmaceuticals).

Η θεραπεία ασθενών με ηπατική δυσλειτουργία χρήζει προσοχής καθώς το Temsirolimus αποβάλλεται κυρίως από το ήπαρ και σε μέτρια ή σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία μπορεί να επιφέρει τον θάνατο (Zaza et al, 2013).

Ασθενείς με όγκους κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (πρωτοπαθείς όγκοι ΚΝΣ ή μεταστάσεις) και/ή που λαμβάνουν αντιπηκτική θεραπευτική αγωγή βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (συμπεριλαμβανομένων θανατηφόρων εκβάσεων) καθώς λαμβάνουν θεραπεία με temsirolimus διότι είναι αναστολέας του CYP2C9 (μείωση μεταβολισμού warfarin) (Kwitkowski et al, 2010).

Επιπλέον ο συνδυασμός temsirolimus και ιντερφερόνης-α έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση καταρράκτη (Hudes et al, 2007).

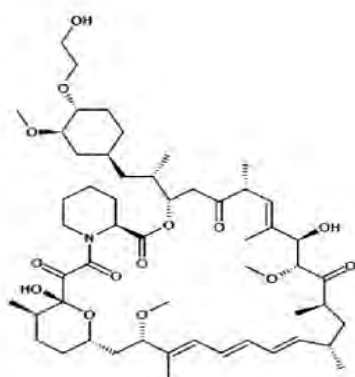
Η χρήση του Torisel έχει συσχετισθεί με μη φυσιολογική επούλωση τραύματος, και επομένως θα πρέπει να δίδεται προσοχή στη χρήση του κατά την περί-εγχειρητική περίοδο (Dar; Kwitkowski et al, 2010)

Επιπλέον λόγω της ανοσοκατασταλτικής του δράσης, οι ασθενείς είναι πιο ευάλωτοι στις λοιμώξεις και η χρήση ζωντανών εμβολίων θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Torisel (εμβόλια ιλαράς, παρωτίτιδας, ερυθράς, πολιομυελίτιδας, φυματίωσης (BCG), κίτρινου πυρετού, ανεμοβλογιάς και TY21a τυφοειδούς πυρετού) (Kwitkowski et al, 2010) .

Το temsirolimus προκαλεί καταστολή των υποστρωμάτων της ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Kwitkowski et al, 2010).

Τέλος σε μελέτες *in vitro*, σε μικροσώματα ανθρώπινου ήπατος, το temsirolimus ανέστειλε την καταλυτική δραστηριότητα των CYP3A4/5, CYP2D6, και CYP2C8 (Kwitkowski et al, 2010) .

## **RAD001 (everolimus-Afinitor)**



**Everolimus**

(Vilar et al, 2011)

Το RAD001 (everolimus- Afinitor) έχει μια αντικατάσταση O-(2-hydroxyethyl) στην θέση C-40 της Ραπαμυκίνης και κατασκευάστηκε με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας

της Ραπαμυκίνης διαμέσου της στοματικής οδού. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής 24–35 h, σημαντικά μικρότερο από της Ραπαμυκίνης που είναι 60h, και μειώνει την τοξικότητα της Κυκλοσπορίνης (Boulay et al, 2004; Kirchner et al, 2004; Vignot et al, 2005). Υπό την εμπορική ονομασία Afinitor, πήρε άδεια κυκλοφορίας από το FDA το 2009 (Wander et al, 2011).

Ο μηχανισμός δράσης του είναι ίδιος με της Ραπαμυκίνης, δηλαδή προσδένει μέσω της FKBP12 στην FRB της mTOR και την αναστέλλει (Ballou & Lin, 2008). Η αναστολή του mTORC1 συνεπάγεται αναστολή της ενεργοποίησης της S6K1, η οποία στην ενεργή της κατάσταση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον τομέα 1 των υποδοχέων οιστρογόνων, που είναι υπεύθυνος για την ανεξάρτητη από προσδέτη, ενεργοποίηση του υποδοχέα. Επιπλέον, το everolimus μειώνει τα επίπεδα του VEGF, που ενισχύει τις διαδικασίες αγγειογένεσης νεοπλασιών. Τέλος το everolimus είναι ισχυρός αναστολέας της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού νεοπλασματικών κυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών και σχετιζόμενων με αιμοφόρα αγγεία λείων μυϊκών κυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη γλυκόλυση σε συμπαγείς όγκους in vitro και in vivo (Curran, 2012; Hughes, 2010).

Το Afinitor ενδείκνυται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου όταν είναι θετικός σε ορμονικούς υποδοχείς (HR+) και αρνητικός σε HER2/neu. Χρησιμοποιείται στην θεραπεία ανεγχείρητου ή μεταστατικού, πολύ έως μετρίως διαφοροποιημένου παγκρεατικού νευροενδοκρινικού όγκου σε ενήλικες με προϊούσα νόσο. Τέλος ενδείκνυται για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνωμα νεφρών, η νόσος των οποίων έχει εξελιχθεί υπό ή μετά από θεραπεία με VEGF-στοχευόμενη θεραπεία (Curran, 2012; Daily & Alert).

Λόγω των ανοσοκατασταλτικών του ιδιοτήτων, το Afinitor προδιαθέτει τους ασθενείς σε λοιμώξεις από βακτήρια, ιούς, μύκητες, πρωτόζωα και λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα. Ορισμένες από αυτές τις λοιμώξεις είναι σοβαρές και σε κάποιες περιπτώσεις θανατηφόρες. Η χρήση εμβολίων με ζώντες μικροοργανισμούς θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη θεραπεία με Afinitor όπως και με την θεραπεία με Torisel (Curran, 2012).

Το everolimus είναι υπόστρωμα του CYP3A4 και επίσης υπόστρωμα και μέτριος αναστολέας της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp). Συνεπώς, η απορρόφηση και η επακόλουθη αποβολή του φαρμάκου επηρεάζεται από προϊόντα που επηρεάζουν το CYP3A4 και/ή

την Pgp. Θα πρέπει λοιπόν να αποφεύγεται η παράλληλη χορήγηση Afinitor με αναστολείς και επαγωγείς του CYP3A4 και/ή της P-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp)(Curran, 2012).

Αναστολείς του CYP3A4 ή της Pgp μπορεί να αυξήσουν τις συγκεντρώσεις του everolimus στο αίμα μέσω μείωσης του μεταβολισμού ή της εκροής του από εντερικά κύτταρα και αντιστρόφως επαγωγείς των CYP3A4 και Pgp μπορεί να μειώσουν τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου λόγω αύξησης του μεταβολισμού ή της εκροής του από τα εντερικά κύτταρα (Kuhn et al, 2001).

Η κλινική μελέτη RADIANT-3 (φάσης III, πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή) για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του Afinitor σε προχωρημένους παγκρεατικούς νευροενδοκρινικούς όγκους (pNET), παρουσίασε στατιστικά σημαντικό κλινικό όφελος του Afinitor σε σχέση με το placebo με παράταση κατά 2,4 φορές της μέσης επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (95% CI: 0,27- 0,45,  $p < 0,0001$ ) (Home; Hughes, 2010)

In vitro, στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, όταν χορηγηθεί το everolimus σε συνδυασμό με αναστολείς EGFR, καταπολεμάται η αντίσταση στο Gefitinib (La Monica et al, 2009).

Στα νεφρικά καρκινικά κύτταρα, ο συνδυασμός everolimus με τον αναστολέα τυροσίνης κινάσης AEE788, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. (Juengel et al, 2009)

## **Παρενέργειες**

Συχνές παρενέργειες είναι η δυσγευσία, τα στοματικά έλκη, η στοματίτιδα και η στοματική βλεννογονίτιδα, η δυσλιπιδαιμία, η υπεργλυκαιμία, η μειωμένη αιμοσφαιρίνη, και η μείωση των λεμφοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων. Επιπλέον όπως και στην χρήση Torisel, παρουσιάζεται διαταραγμένη επούλωση τραύματος (Porta et al, 2011).

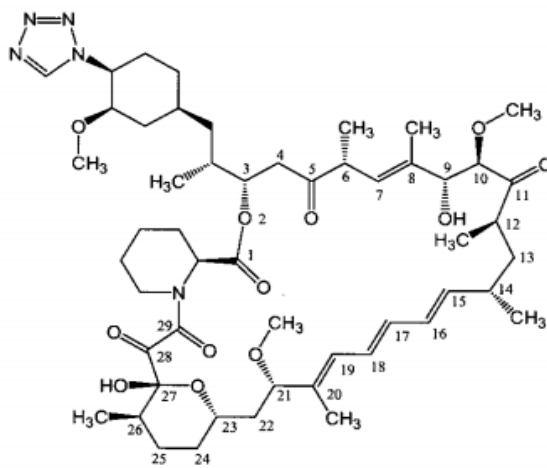
Επίσης, μπορεί να παρουσιαστεί νεφρική και οξεία νεφρική ανεπάρκεια ορισμένες φορές με θανατηφόρα έκβαση (Porta et al, 2011).

Δεν επιτρέπεται η λήψη του Afinitor από ασθενείς με σπάνια κληρονομικά προβλήματα δυσανεξίας στη γαλακτόζη, έλλειψη λακτάσης Lapp ή κακή απορρόφηση γλυκόζης-γαλακτόζης (Home; Hughes, 2010)

Όταν η λήψη του φαρμάκου γίνεται από γυναίκες, πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερα αποτελεσματικές μέθοδοι αντισύλληψης έως και 8 εβδομάδες μετά την λήξη της

θεραπείας, καθώς πειράματα σε επίμυες έδειξαν ότι το Afinitor διαπερνά τον πλακούντα και είναι εμβρυοτοξικό. Οι άνδρες υπό θεραπεία μπορούν να τεκνοποιήσουν χωρίς να προκληθούν ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Curran, 2012).

## **ABT-578 (zotarolimus-Endeavor)**

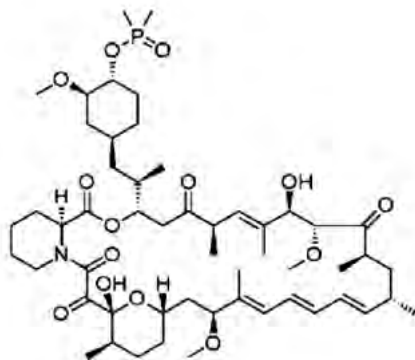


Το ABT-578 είναι ανοσοκατασταλτικό ημισυνθετικό παράγωγο της Ραπαμυκίνης που πήρε άδεια κυκλοφορίας από το FDA το 2008 (FDA, 2008).

Έχει δημιουργηθεί από την αντικατάσταση της υδροξυλομάδας στην θέση 42 της Ραπαμυκίνης από δακτύλιο τετραζόλης. Λόγω της μικρής του διαλυτότητας στο νερό, απελευθερώνεται αργά στον οργανισμό και για αυτό χρησιμοποιείται ως επικάλυψη των stent για την αποφυγή της επαναστένωσης (Eisenstein et al, 2009; FDA, 2008).

Το zotarolimus in vitro συνδέεται στην FKBP12, αναστέλλοντας το mTORC1 και αναστέλλει τον επαγόμενο από αυξητικούς παράγοντες, πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των στεφανιαίων αρτηριών (FDA, 2008).

## **AP23573 (ridaforolimus-Jenzyl)**



**Ridaforolimus**

(Vilar et al, 2011)

Το AP23573 (ridaforolimus) παρουσιάζει μια αντικατάσταση οξειδίου της φωσφίνης στην θέση του δακτυλίου λακτόνης της Ραπαμυκίνης. Είναι το πιο πρόσφατο Rapalog που όμως δεν είναι προφάρμακο της Ραπαμυκίνης. Παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες, υδατικά διαλύματα, στο πλάσμα αλλά και στο ολικό αίμα *in vitro* και *in vivo* (Mita et al, 2008; O'Hare et al, 2004).

Το ridaforolimus σε κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης του S6 και την μείωση της φωσφορυλίωσης του 4E-BP1 κατά 54%, λόγω του ότι μπορεί να φωσφορυλιωθεί και από οδό ανεξάρτητη της mTOR. Σε άλλες κυτταρικές σειρές όπως στην MCF-7 (κύτταρα μαστού) τα S6 και 4E-BP1 αναστέλλονται πλήρως και τα δύο (Rivera et al, 2011).

Στις 27 Νοεμβρίου 2012, η Merck Sharp & Dohme Limited επισήμως ενημέρωσε την Επιτροπή Φαρμάκων για Ανθρώπινη Χρήση (CHMP : Committee for Medicinal Products for Human Us), την πρόθεσή της να αποσύρει την αίτηση για χορήγηση αδειας κυκλοφορίας του Jenzyl, για τη θεραπεία συντήρησης ασθενών με μεταστατικό σάρκωμα μαλακών μορίων ή με σάρκωμα οστών οι οποίοι είχαν, κατά το παρελθόν, υποβληθεί σε χημειοθεραπεία. Στις 14 Δεκεμβρίου 2012, η CHMP κατέληξε ότι τα οφέλη του Jenzyl δεν υπερτερούν των κινδύνων που συνδέονται με αυτό και με απόφαση του Ευρωπαϊκού οργανισμού φαρμάκων, (European medicines agency) (EMA/20327/2013 EMEA/H/C/2259) κοινοποιήθηκε η απόσυρση της δανειοδότησής του.



## **SAR943 ( 32 deoxy-rapamycin)**

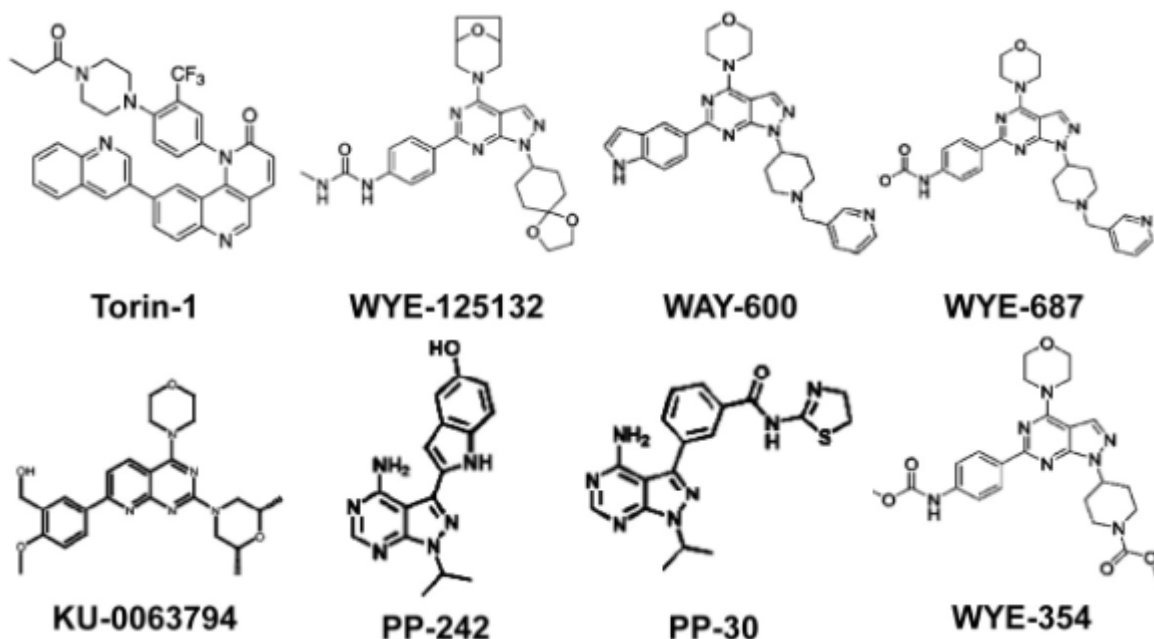
Το SAR943 είναι το τελευταίο παράγωγο Ραπαμυκίνης που όπως και τα προηγούμενα, συνδέεται στην FKBP12 προκαλώντας την αναστολή του mTORC1 και οδηγεί σε ανοσοκαταστολή. Σε πειραματική μελέτη με μύες επέδειξε αναστολή του πολλαπλασιασμού των δομικών κυττάρων μετά από αλλεργιογόνο πρόκληση (Fujitani & Trifilieff, 2003).

# ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

## *mTORC1/mTORC2 TOR-KIs*

Αναστολείς mTORC1/2	Δομή	Μηχανισμός δράσης
PP242	Πυραζολοπυριμιδίνη	Αναστολέας mTOR κινάσης
PP30		
Torin 1		
WYE354		Ανταγωνιστής πρόσδεσης ATP στην mTOR
WAY600		
WYE678		
Ku006374	Πυριδοπυρημιδίνη	Ειδικός αναστολέας mTORC1 και mTORC2

(Zhou et al, 2010)



(Vilar et al, 2011)

Η Ραπαμυκίνη και τα ανάλογά της αφενός στοχεύουν μόνο το mTORC1, αφετέρου προκαλούν αναδραστική ενεργοποίησή του μέσω του mTORC2. Αυτό οδήγησε στην ανάγκη ανεύρεσης μορίων που θα μπορούν να καταστείλουν την mTOR ώστε να μπλοκάρουν και τα δύο σύμπλοκα.

Για να μπορέσουν μικρά μόρια να αναστείλουν την δράση της mTOR, θα πρέπει να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις Leu2186, Ile2237 και Ile2356. Επιπλέον, πρέπει να προσδένονται με την Lys2166 και/ή την Val2240 (Tobak, 2007).

Οι καταστολείς κινάσης ή αλλιώς TOR-KIs είναι μόρια που ανταγωνίζονται την πρόσδεση του ATP στην καταλυτική περιοχή της mTOR, με αποτέλεσμα την καταστολή και των δύο mTORC συμπλόκων χωρίς όμως να επηρεάζεται η ενεργότητα άλλων κινασών (Feldman et al, 2009; Wander et al, 2011).

Σε αυτούς του αναστολείς ανήκουν τα μόρια **PP242**, **PP30**, **Torin1**, **WYE354**, **WAY600**, **WYE678** και **Ku006374** και σε κλινικές μελέτες φάσης I και II δοκιμάζονται οι **WYE354** και **WYE132** (Pfizer) (Yu et al, 2009), **PP30** και **PP242 (INK-128**, Interllikine) (Feldman et al, 2009), **AZD8055** (AstraZeneca) (Chresta et al, 2010) και **Torin 1** (Thoreen et al, 2009). Όλα τα παραπάνω αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την βιοσύνθεση των λιπιδίων, την αγγειογένεση και ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, λόγω καταστολής της mTOR (Xue et al, 2008).

Οι PP242 και Torin1 αναστολείς μειώνουν την έκφραση των κυκλινών D1 και D3 καθώς και την έκφραση της p27. Οι Ku006374, WAY600, WYE678 και WYE354 επίσης αναστέλλουν τα mTORC1 και mTORC2 προκαλώντας αναστολή του κύκλου στην G1 φάση (Feldman et al, 2009).

Στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται υπερενεργοποίηση των επαγόμενων από την Akt, μεταφορέα γλυκόζης Glut1, ώστε να αυξηθεί η γλυκόλυση και να ανταπεξέλθει το κύτταρο στις συνθήκες υποξίας και αυξημένων αναγκών σε ενέργεια. Οι TOR-KIs αντιτίθενται στην γλυκόλυση περισσότερο από ότι η Ραπαμυκίνη, διότι δεν υφίσταται η αναδραστική ενεργοποίηση του PI3K/Akt και επιπλέον γίνεται άμεση αναστολή του mTORC2 οδηγώντας στην μείωση της συγκέντρωσης των εξαρτώμενων από την Akt, Glut1 (Yu et al, 2009).

Επιπλέον, οι TOR-KIs είναι πιο αποτελεσματικοί στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, σε σχέση με την Ραπαμυκίνη και τα παράγωγά της, διότι πρωτίστως αναστέλλουν την

μετάφραση της κυκλικής D1 και επιπλέον μπλοκάρουν και την επαγόμενη από την Akt μεταγραφή της D1 (Yu et al, 2009).

Σημαντικό πλεονέκτημα της αναστολής mTORC1/ mTORC2 είναι η ελάττωση της μεταναστευτικής και μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή της επαγόμενης από την Akt/SGK1/RSK1 φωσφορυλίωσης του p27, από ένα TOR-KIs αποκαθιστά τον πυρηνικό εντοπισμό της p27, και προκαλεί αποσταθεροποίηση της ακτίνης, καταστέλλοντας έτσι την δυνατότητα του κυττάρου για μετανάστευση (Larrea et al, 2009).

Σε αντίθεση με την Ραπαμυκίνη και τα ανάλογά της, οι TOR-KIs επάγουν την αυτοφαγία και την απόπτωση (Chresta et al, 2010).

Παρά τα υποσχόμενα πλεονεκτήματα των TOR-KIs υπάρχουν και μειονεκτήματα. Πράγματι, λόγω αναστολής του mTORC2, η Akt δεν φωσφορυλιώνεται στην Ser473, παρόλο αυτά όμως φωσφορυλιώνεται κανονικά από την PDK1 στην Thr308 και αυτό τελικά προκαλεί αναδραστική ενεργοποίηση του PI3K μειώνοντας έτσι τις θεραπευτικές δυνατότητες των TOR-KIs (Feldman et al, 2009). Χάρη στο παραπάνω φαινόμενο, αναπτύχθηκαν οι **διπλοί αναστολείς** κινασών PI3K/TOR-KIs, που παρουσιάζουν σημαντική δράση σε xenograft μοντέλα καρκίνου του μαστού, του παγκρέατος, του πολλαπλού μυελώματος, του μελανώματος, του γλοιώματος και της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (Wander et al, 2011).

# ΔΙΠΛΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ PI3K-mTOR (PI3K/TOR-KIs)

Διπλοί αναστολείς PI3K/TOR-KIs	Δομή	Μηχανισμός δράσης
GNE477	Thienopyrimidine	Διπλός αναστολέας PI3K/TOR-KIs
NVP-BEZ-235	Imidazoquinazoline	
PI103	Tricyclic pyridofuopyrimidine	
XL765		
WJD008	5-cyano-6-morpholino-4-substituted-pyrimidine analogue	
NVP-BGT226		
GDC-0980		
GSK2126458		
PF-04691502		
PF-05212384		
Wortmannin		
LY294002		

(Zhou et al, 2010)

Η απενεργοποίηση του mTORC1 προκαλεί την αναδραστική ενεργοποίηση του PI3K μονοπατιού και συνεπώς της Akt. Επομένως, για ολοκληρωτική απενεργοποίηση είναι απαραίτητη τόσο η απενεργοποίηση της mTOR για αποσιώπηση των TORC συμπλόκων, όσο και η καταστολή του PI3K μονοπατιού.

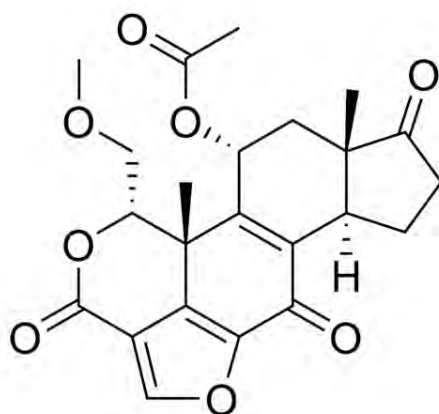
Ομοίως με τα TOR-KIs αντίστοιχα και οι PI3K/TOR-KIs επάγουν την απόπτωση, την αυτοφαγία, έχουν αντιαγγειογενετική δράση, αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την σύνθεση λιπιδίων και προκαλούν αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Marone et al, 2009).

Οι διπλοί αναστολείς PI3K/TOR-KIs είναι οι εξής: **NVP-BEZ235/BEZ235** (Novartis), **NVP-BGT226** (Novartis), **XL765** (Exelixis), **GDC-0980** (Genentech), **GSK2126458** (GlaxoSmithKline), **PF-04691502** (Pfizer), και **PF-05212384 (PKI-587)** (Pfizer) και βρίσκονται υπο δοκιμή σε κλινικές μελέτες φάσης I και II (Wander et al, 2011).

Μια πολύ σημαντική λειτουργία που αυτορυθμίζεται από τα καρκινικά κύτταρα, είναι η βιοσύνθεση των λιπιδίων για την κάλυψη των αναγκών σε μεμβράνες. Η ενεργοποίηση του PI3K/mTORC2 μέσω της Akt, αναστέλλει την δράση του GSK3-β με αποτέλεσμα την σταθεροποίησή του και την προαγωγή της λιποσύνθεσης. Επιπρόσθετα η Akt φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ATP citrate lyase (ACL) που είναι ρυθμιστής της σύνθεσης λιπαρών οξέων (Laplane & Sabatini, 2009a).

Τα TOR-KIs και PI3K/ TOR-KIs λόγω του ότι αναστέλλουν την Akt, σε σχέση με την Ραπαμυκίνη που δεν το επιτυγχάνει, αντιτίθενται στην βιοσύνθεση των λιπιδίων με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εξέλιξης του όγκου (Shor et al, 2009).

## Wortmannin



Wortmannin

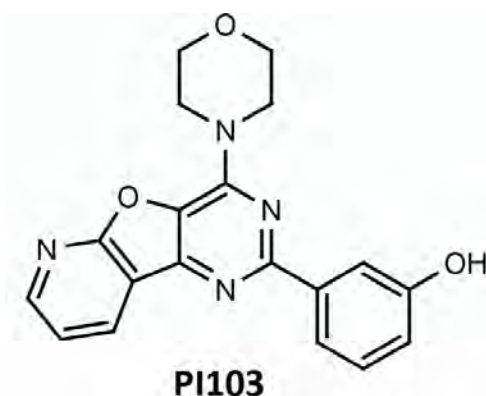
(Vilar et al, 2011)

Το Wortmannin είναι τοξικό οξόλιο (φουράνιο) που παράγεται από τους μύκητες *Penicillium wortmanni* (Brian et al, 1957) και σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τις Lys833 της p110γ και Lys802 p110α, της περιοχής δέσμευσης του ATP στην καταλυτική περιοχή του PI3K. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως "αυτοκτονική αναστολή", διότι η καταλυτική περιοχή της πρωτεΐνης, υπόκειται σε μη αναστρέψιμη τροποποίηση λόγω της πρόσδεσης του αναστολέα με αποτέλεσμα την μόνιμη αδρανοποίησή της (Brunn et al, 1996).

Πέραν της αναστολής του PI3K, επιπλέον σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την mTOR στην Lys2187 της καταλυτικής περιοχής δέσμευσης του ATP και παρουσιάζει αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών σειρών παγκρέατος, πνεύμονα και μαστού (Brunn et al, 1996).

Το Wortmannin λόγω της τοξικότητας και της αστάθειάς του δεν μπορεί να χορηγηθεί ως θεραπεία, όμως το παράγωγό του, PX-866 εμφανίζεται πιο σταθερό, και λιγότερο τοξικό και παρουσιάζει ογκοκατασταλτική δράση στα ποντίκια (Ihle et al, 2004).

## **PI-103**



(Vilar et al, 2011)

Το PI-103 ανακαλύφθηκε από την εταιρία Astellas και αποτελεί τον πρώτο συνθετικό αναστολέα της mTOR με ταυτόχρονη ανασταλτική δράση και του PI3K. Επειδή περιέχει δακτύλιο φουρανίου, όπως και το Wortmannin, κάνει ομοιοπολικό δεσμό στην περιοχή της κινάσης και η αναστολή που προκαλεί είναι μη αναστρέψιμη (Fan et al, 2006).

Έχει κυτταροστατικές ιδιότητες λόγω αναστολής της p110α, p110β και p110δ (υπομονάδες του PI3K) και mTOR και σε μελέτες xenografts ποντικών παρουσίασε μέτρια μείωση του όγκου, της αγγείωσης και των μεταστάσεων, σε δοσολογίες που δεν προκάλεσαν τοξικότητα (Fan et al, 2006).

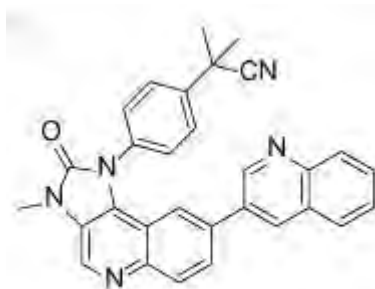
Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές λευχαιμίας, το PI-103 ανέστειλε την επαγόμενη από αυξητικούς παράγοντες ενεργοποίηση του PI3K/Akt και mTORC1 και σταμάτησε το κυτταρικό κύκλο στην G1 (Park et al, 2008).

Επιπλέον έχει δείξει ότι εντείνει την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε απόπτωση επαγόμενη από την χημειοθεραπεία (Prevo et al, 2008).

Παρά το γεγονός ότι το PI-103 δεν έχει δοκιμαστεί στον άνθρωπο, λόγω των μετρίων in vivo φαρμακοκινητικών του επιδόσεων του, πλέον χρησιμοποιείται ευρέως ως βασικό συστατικό άλλων αναστολέων PI3K/mTOR. Έτσι συναντάται στους ATP ανταγωνιστές PI620, WYE354, WAY600, WYE687 και Ku0063794 (Raynaud et al, 2009; Workman et al, 2010).



## **BEZ235/NVP-BEZ235**



NVP-BEZ235

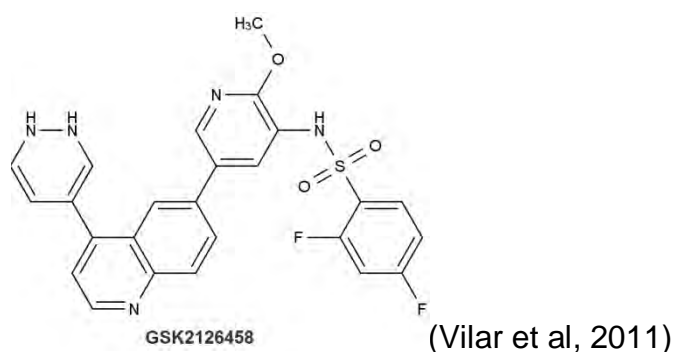
(Vilar et al, 2011)

Το BEZ235 ή NVP-BEZ235 κατασκευάζεται από την εταιρία Novartis και είναι ένας διπλός αναστολέας PI3K/TOR-KIs που η δράση του δοκιμάζεται σε κλινικές μελέτες φάσης I και II. Προσδένει στην καταλυτική περιοχή των PI3K και mTOR και αναστέλλει την δράση τους.

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι το εν λόγω μόριο μπορεί, ισχυρότερα από το Everolimus, να αναστρέψει την υπερενεργοποίηση του PI3K/mTOR μονοπατιού με συνέπεια την παύση του πολλαπλασιασμού σε όλες τις καρκινικές σειρές που δοκιμάστηκε (Serra et al, 2008).

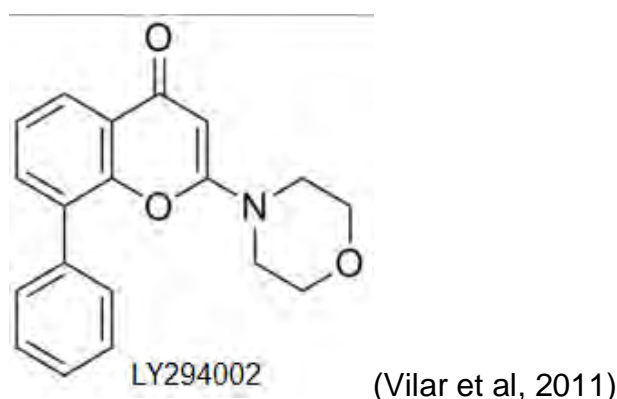
Ειδικά σε καρκινικές σειρές σαρκώματος όχι μόνο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό, αλλά και την μετανάστευση των κυττάρων (Manara et al, 2010), ενώ σε καρκινικά κύτταρα μαστού ανέστειλε την ενεργοποίηση των Akt, S6 και 4E-BP1 (Serra et al, 2008). Επίσης προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε προκλινικά μοντέλα συμπεριλαμβανομένων του προστάτη, του παγκρέατος, του νεφρού, του γλοιοβλαστώματος, του πολλαπλού μυελώματος, της λευχαιμίας και του σαρκώματος (Chiarini et al, 2010; Maira et al, 2008).

## GSK2126458



Ο διπλός αναστολέας GSK2126458 κατασκευάζεται από την GlaxoSmithKline. Οι φαρμακοδυναμικές του ικανότητες σε χαμηλές δοσολογίες, οδήγησαν σε κλινική δοκιμή φάσης II για την θεραπεία των συμπαγών όγκων και του λεμφώματος (Knight et al, 2010).

## LY294002



Το LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) κατασκευάστηκε από την εταιρία Semafore και είναι συνθετικός αναστολέας του PI3K με δράση ανταγωνιστή της δέσμευσης ATP στην καταλυτική περιοχή του (Vlahos et al, 1994).

In vitro παρουσιάζει χημική σταθερότητα και παρά τον αρχικό χαρακτηρισμό του ως εξειδικευμένο αναστολέα του PI3K, έχει την ικανότητα να αναστέλλει τα μέλη της οικογένειας των PIKK συνεπώς και την mTOR. Σε αντίθεση με το Wortmannin, η δράση του LY294002 είναι αναστρέψιμη (Brunn et al, 1996; Gharbi et al, 2007)

Αναστέλλει την φωσφορυλίωση της S6K στην Thr389 και την αποφωσφορυλίωση της mTOR στην Ser2481 (Kristof et al, 2005)

Επιπλέον ιδιότητά του είναι η ισχυρή πρόσδεσή του σε πληθώρα άλλων πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες προκαλώντας άγνωστες βιολογικές συνέπειες (Ballou & Lin, 2008).

## **ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ**

Διατροφικοί αναστολείς	Δομή	Μηχανισμός δράσης
Curcumin	Diferuloylmethane	Διάσπαση συμπλόκου mTOR-Raptor
Resveratrol	Trans-3,4', 5-trihydroxystilbene	Αναστολή σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR
epigallocatechin gallate (EGCG)	Polyphenol	
Genistein	Isoflavone	
3,3-Diindolylmethane (DIM)	Indole-3-carbinol	Αναστολή mTOR και Akt
Caffeine	methylxanthine	Αναστολή mTORC1

Οι διατροφικοί αναστολείς είναι γενικώς λιγότερο τοξικοί για τον άνθρωπο και όσοι έχουν ελεγχθεί *in vitro* έχουν δείξει καταστολή της mTOR σηματοδότησης σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό. Για να επιτευχθούν όμως τα ίδια αποτελέσματα και *in vivo* είναι απαραίτητο να κατασκευαστούν παράγωγα των φυσικών αυτών προϊόντων με βελτιωμένες φαρμακευτικές ιδιότητες (Zhou et al, 2010).

## **Epigallocatechin gallate (EGCG)**

Το EGCG αποτελεί την κατεχίνη με τη υψηλότερη συγκέντρωση στο τσάι ιδιαίτερα το λευκό και πράσινο. Έχει αντιοξειδωτική δράση και μειώνει την φωσφορυλίωση των Akt, S6 και 4EBP1 ενώ σε p53 θετικά και αρνητικά ανθρώπινα ηπατοκύτταρα προκαλεί την ενεργοποίηση του AMPK με συνέπεια την αναστολή του mTORC1 (Zhou et al, 2010).

## **Resveratrol**

Το Resveratrol είναι πολυφαινολικό φλαβονοϊδές που εντοπίζεται στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών. Στα κύτταρα γλοιώματος μειώνει την ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR ενώ ο συνδυασμός του με Ραπαμυκίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Στα λεία μυϊκά κύτταρα αποτρέπει την ενεργοποίηση του PI3K/Akt/mTOR από την προαθηρωματική οξειδωμένη-LDL και ελαττώνει την σύνθεση DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τέλος ενεργοποιεί το AMPK και προκαλεί αναστολή του mTOR σε καρκινικά κύτταρα μαστού θετικά και αρνητικά για ER. (Jiang et al, 2009).

## **Κουρκουμάς**

Ο κουρκουμάς είναι καρύκευμα που ανήκει στην οικογένεια της πιπερόριζας. Προκαλεί καταστολή του πολλαπλασιασμού, αναστέλλοντας την σηματοδότηση της mTOR αλλά και αποσπώντας την mTOR από την RAPTOR. Επιπλέον επάγει την απόπτωση και μειώνει την κινητικότητα των κυττάρων του ραβδομυοσάρκωματος (Beavers et al, 2009).

## **Theophylline και Καφεΐνη**

Οι Theophylline και Καφεΐνη είναι μεθυλοξανθίνες με λειοτροπική δράση στο νευρικό, αναπνευστικό, καρδιακό και νεφρικό σύστημα.

Η Theophylline λόγω βρογχοδιασταλτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων χρησιμοποιείται από χρόνια στην ανακούφιση του άσθματος και άλλων αναπνευστικών νόσων (Barnes, 2003).

Μία από τις ιδιότητες των μεθυλοξανθινών είναι και η αναστολή των mTOR κινασών λόγω δράσης τους ως χαμηλής συνάφειας ανάλογα-ATP (low affinity ATP analogs) και η

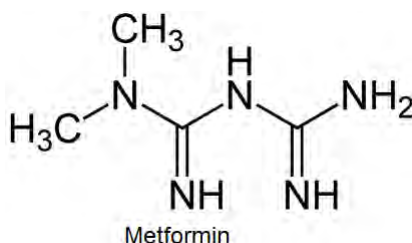
in vitro αναστολή ενεργοποίησης της Akt λόγω ινσουλίνης σε αδιποκύτταρα (Scott & Lawrence, 1998).

Η Καφεΐνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μελέτη των επαγόμενων από DNA βλάβη, checkpoints στις φάσεις G1/S και G2/M και αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι προκαλεί την αναστολή του ATM, ATR, SMG-1 και mTOR. (Blasina et al, 1999; Reinke et al, 2006)

## ***BENZYL ISOTHIOCYANATE (BITC)***

Το Benzyl isothiocyanate (BITC) είναι χημειοπροστατευτικός παράγοντας που προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε πληθώρα καρκινικών κυττάρων (μαστού, ωοθηκών, παγκρεατικών και οστών) και επάγει την αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Rv1 και PC3). Η αυτοφαγική δράση του BITC οφείλεται στην ικανότητά του να αναστέλλει την mTOR (Lin et al, 2013).

## ***METFORMIN***



Η μετφορμίνη ανακαλύφθηκε το 1920 και είναι υπογλυκαιμικός παράγοντας που χορηγείται για την θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Ενεργοποιεί το AMPK μέσω του LKB1 και πιθανώς να έχει αντικαρκινικές ιδιότητες λόγω αναστολής του mTORC1 μέσω του AMPK (Dann et al, 2007; Shaw et al, 2005).

Κλινικές δοκιμές φάσης I που δοκίμασαν συνδυασμό metformin με temsirolimus παρουσίασαν σταθεροποίηση της νόσου (MacKenzie et al, 2012).

Η Ραπαμυκίνη αναστέλλει μεν το mTORC1, αλλά όπως είδαμε μπορεί να προκαλέσει αναδραστική ενεργοποίηση της Akt. Η μετφορμίνη από την άλλη, μέσω της ενεργοποίησης του AMPK προκαλεί την ενεργοποίηση του TSC1/2 και συνεπώς την απενεργοποίηση του mTORC1. Οι δύο διαφορετικοί αυτοί μηχανισμοί, συνδυασμένοι, έχουν καλύτερα αποτελέσματα από την Ραπαμυκίνη μόνη της (MacKenzie et al, 2012).

# ***FTS***

Η mTOR έχει δείξει να καταστέλλεται από το *S-trans,trans*-farnesyl thiosalicylic acid (FTS) που ομοιάζει με το farnesylcysteine της οικογένειας των Ras. Το FTS είναι αναστολέας της RAS σηματοδότησης, διότι ανταγωνίζεται την RAS για την θέση πρόσδεσης στην μεμβράνη και τελικά την αποσπά από την θέση της και προκαλεί την πρωτεολυτική της διάσπαση (Haklai et al, 1998). Το FTS καταστέλλει την δραστηριότητα του mTORC1 προάγοντας την απομάκρυνση της Raptor (McMahon et al, 2005).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Παρά την ανακάλυψη της mTOR πριν τρεις δεκαετίες, η πολυπλοκότητα της σηματοδότησής της τώρα αποσαφηνίζεται. Η κινάση αυτή είναι ο κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, μεταβολισμού και αγγειογένεσης. Απορύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών της παρατηρείται σε πληθώρα ανθρωπίνων νοσημάτων όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης, συνεπώς η ανεύρεση αναστολέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτική αγωγή είναι μείζονος σημασίας.

Μέχρι σήμερα, από τους αναστολείς της mTOR, οι περισσότερο μελετημένοι είναι η Ραπαμυκίνη και τα ανάλογά της. Σε κλινικές μελέτες έχουν δείξει ικανοποιητικού βαθμού ογκοκατασταλτική δράση σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Η αντιμιτωτική τους δυνατότητα όμως ποικίλει, διότι η στοχευμένη αναστολή του mTORC1 από αυτά τα μόρια, ενδέχεται να αυξήσει την ρύθμιση του PI3K/Akt, μειώνοντας την θεραπευτική τους δύναμη. Επίλυση αυτού είναι η συνδυασμένη θεραπεία ή η χρήση διπλών αναστολέων PI3K /mTOR.

Η Ραπαμυκίνη αν και δεν στοχεύει στην καταλυτική περιοχή της mTOR, ούτε είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος δράσης της, είναι ευρέως αποδεκτό ότι αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα του mTORC1. Όλο και περισσότερες μελέτες άλλων αναστολέων όπως η Torin1, η PP242 και η PP30 υποδεικνύουν ότι η mTORC1 ενδέχεται να παρουσιάζει αντίσταση στην Ραπαμυκίνη.

Η ανάγκη για ανεύρεση και μελέτη νέων αναστολέων, που θα στοχεύουν και το mTORC1 και το mTORC2, έχει προσφέρει καινοτόμα εργαλεία στην αποσαφήνιση των ρόλων της mTOR και έχει σηματοδοτήσει την αρχή μια νέας εποχής στην θεραπεία μέσω της κινάσης αυτής. Αναμένεται ότι οι νέοι αναστολείς θα είναι αποτελεσματικότεροι και με ευρύτερο πεδίο εφαρμογών, αλλά και μιας και ακόμα είναι σε πολύ πρώιμο στάδιο, η θεραπευτική τους ικανότητα παραμένει αμφίβολη.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abe Y, Yoon SO, Kubota K, Mendoza MC, Gygi SP, Blenis J (2009) p90 ribosomal S6 kinase and p70 ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling. *The Journal of biological chemistry* **284**: 14939-14948

Ardissino D, Cavallini C, Bramucci E, Indolfi C, Marzocchi A, Manari A, Angeloni G, Carosio G, Bonizzoni E, Colusso S, Repetto M, Merlini PA (2004) Sirolimus-eluting vs uncoated stents for prevention of restenosis in small coronary arteries: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **292**: 2727-2734

Argyriou P, Economopoulou P, Papageorgiou S (2012) The Role of mTOR Inhibitors for the Treatment of B-Cell Lymphomas. *Advances in hematology* **2012**: 435342

Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J, Ramon y Cajal S (2007) 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer research* **67**: 7551-7555

Arsham AM, Howell JJ, Simon MC (2003) A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *The Journal of biological chemistry* **278**: 29655-29660

Asnaghi L, Calastretti A, Bevilacqua A, D'Agnano I, Gatti G, Canti G, Delia D, Capaccioli S, Nicolin A (2004) Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene* **23**: 5781-5791

Avruch J, Lin Y, Long X, Murthy S, Ortiz-Vega S (2005) Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **8**: 67-72

Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH (2004) The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer biology & therapy* **3**: 772-775

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews Cancer* **5**: 921-929

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y (2007) Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* **318**: 977-980

Ballou LM, Lin RZ (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of chemical biology* **1**: 27-36

Barnes PJ (2003) Theophylline: new perspectives for an old drug. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**: 813-818



Beeram M, Tan QT, Tekmal RR, Russell D, Middleton A, DeGraffenried LA (2007) Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **18**: 1323-1328

Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S (2009) Curcumin disrupts the mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer research* **69**: 1000-1008

Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD (2013) Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* **339**: 1323-1328

Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S, Pandolfi PP (2006) PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* **442**: 779-785

Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, Proud CG (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *The Biochemical journal* **372**: 555-566

Blasina A, Price BD, Turenne GA, McGowan CH (1999) Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Current biology* **9**: 1135-1138

Bohn G, Allroth A, Brandes G, Thiel J, Glocker E, Schaffer AA, Rathinam C, Taub N, Teis D, Zeidler C, Dewey RA, Geffers R, Buer J, Huber LA, Welte K, Grimbacher B, Klein C (2007) A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nature medicine* **13**: 38-45

Borders EB, Bivona C, Medina PJ (2010) Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **67**: 2095-2106

Bosotti R, Isacchi A, Sonnhammer EL (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in biochemical sciences* **25**: 225-227

Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Beuvink I, Zilbermann F, Haller R, Tobler S, Heusser C, O'Reilly T, Stolz B (2004) Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer research* **64**: 252-261

Brian P, Curtis P, Hemming H, Norris G (1957) Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Transactions of the British Mycological Society* **40**: 365-363

Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development* **18**: 2893-2904

Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence Jr J, Abraham RT (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO journal* **15**: 5256

Calastretti A, Bevilacqua A, Ceriani C, Vigano S, Zancai P, Capaccioli S, Nicolin A (2001) Damaged microtubules can inactivate BCL-2 by means of the mTOR kinase. *Oncogene* **20**: 6172-6180

Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, Perreault C, Roux PP, Kitano H (2010) A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Molecular systems biology* **6**: 453

Castedo M, Ferri K, Kroemer G (2002) Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro-and anti-apoptotic. *Cell death and differentiation* **9**: 99-100

Chen B, Yiping S, Ni J (2012a) Rapamycin decreases survivin expression to induce NSCLC cell apoptosis under hypoxia through inhibiting HIF-1 $\alpha$  induction. *Molecular biology reports* **39**: 185-191

Chen R, Yang Q, Lee JD (2012b) BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway. *Cancer research* **72**: 1579-1587

Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A, Battistelli M, Falcieri E, Melchionda F, Pession A (2010) Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research* **70**: 8097-8107

Chiu MI, Katz H, Berlin V (1994) RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12574-12578

Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E (2005) EGF receptor transactivation mediates ANG II-stimulated mitogenesis in intestinal epithelial cells through the PI3-kinase/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling pathway. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **288**: G182-194

Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273**: 239-242

Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P (2010) AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer research* **70**: 288-298

Curran MP (2012) Everolimus. *Pediatric Drugs* **14**: 51-60

Daily LM, Alert NPR Novartis gains FDA approval for Afinitor in advanced breast cancer marking a significant milestone for women battling this disease.

Dann SG, Selvaraj A, Thomas G (2007) mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in molecular medicine* **13**: 252-259

Dar A FDA Approval for Temsirolimus (Torisel) for Advanced RCC.

Davies CB, Madden RL, Alexander JW, Cofer BR, Fisher RA, Anderson P (1993) Effect of a short course of rapamycin, cyclosporin A, and donor-specific transfusion on rat cardiac allograft survival. *Transplantation* **55**: 1107-1112

deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, Roth RA, Hidalgo M (2004) Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt

Activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 8059-8067

Desai BN, Myers BR, Schreiber SL (2002) FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4319-4324

DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & development* **22**: 239-251

Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG, Jr., Rhodes CJ (2001) Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *The Journal of biological chemistry* **276**: 21110-21120

Dobashi Y, Suzuki S, Sato E, Hamada Y, Yanagawa T, Ooi A (2009) EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**: 1328-1340

Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S (2011) Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *International journal of clinical and experimental pathology* **4**: 476-495

Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG (2000) Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell* **6**: 269-279

Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N (2010) Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* **1804**: 433-439

Drenan RM, Liu X, Bertram PG, Zheng XF (2004) FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry* **279**: 772-778

Efeyan A, Sabatini DM (2013) Nutrients and growth factors in mTORC1 activation. *Biochemical Society transactions* **41**: 902-905

Efeyan A, Zoncu R, Sabatini DM (2012) Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends in molecular medicine* **18**: 524-533

Eisenstein EL, Leon MB, Kandzari DE, Mauri L, Edwards R, Kong DF, Cowper PA, Anstrom KJ (2009) Long-Term Clinical and Economic Analysis of the Endeavor Zotarolimus-Eluting Stent Versus the Cypher Sirolimus-Eluting Stent3-Year Results From the ENDEAVOR III Trial (Randomized Controlled Trial of the Medtronic Endeavor Drug [ABT-578] Eluting Coronary Stent System Versus the Cypher Sirolimus-Eluting Coronary Stent System in De Novo Native Coronary Artery Lesions). *JACC: Cardiovascular Interventions* **2**: 1199-1207

Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko Š, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U (2007) Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *New England Journal of Medicine* **357**: 2562-2575

Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A (2003) Skin cancers after organ transplantation. *New England Journal of Medicine* **348**: 1681-1691

- Evans DR, Guy HI (2004) Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 33035-33038
- Fan Q-W, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer cell* **9**: 341-349
- FDA U (2008) CDRH: New Device Approval—Endeavor Zotarolimus-Eluting stent. Access at: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf6/p060033b.pdf-02-12-2008>
- Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS biology* **7**: e1000038
- Feng Z, Fan X, Jiao Y, Ban K (2011) Mammalian target of rapamycin regulates expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *Human pathology* **42**: 659-668
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8204-8209
- Fingar DC, Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**: 3151-3171
- Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* **24**: 200-216
- Foster KG, Fingar DC (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of biological chemistry* **285**: 14071-14077
- Fujitani Y, Trifilieff A (2003) In vivo and in vitro effects of SAR 943, a rapamycin analogue, on airway inflammation and remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**: 193-198
- Gallant-Haidner HL, Trepanier DJ, Freitag DG, Yatscoff RW (2000) Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus. *Therapeutic drug monitoring* **22**: 31-35
- Gan B, Melkounian ZK, Wu X, Guan KL, Guan JL (2005) Identification of FIP200 interaction with the TSC1-TSC2 complex and its role in regulation of cell size control. *The Journal of cell biology* **170**: 379-389
- Georger B, Kerr K, Tang CB, Fung KM, Powell B, Sutton LN, Phillips PC, Janss AJ (2001) Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer research* **61**: 1527-1532
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* **366**: 883-892

- Gharbi S, Zvelebil M, Shuttleworth S, Hancox T, Saghir N, Timms J, Waterfield M (2007) Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J* **404**: 15-21
- Gowans GJ, Hardie DG (2014) AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. *Biochemical Society transactions* **42**: 71-75
- Groetzner J, Kur F, Spelsberg F, Behr J, Frey L, Bittmann I, Vogeser M, Ueberfuhr P, Meiser B, Hatz R (2004) Airway anastomosis complications in de novo lung transplantation with sirolimus-based immunosuppression. *The Journal of heart and lung transplantation* **23**: 632-638
- Guertin DA, Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in molecular medicine* **11**: 353-361
- Guertin DA, Sabatini DM (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* **12**: 9-22
- Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM (2009) mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer cell* **15**: 148-159
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Developmental cell* **11**: 859-871
- Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G (2008) Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca<sup>2+</sup>/CaM signaling to hVps34. *Cell metabolism* **7**: 456-465
- Guo T, Fang M, Zhang D, Li X (2013) Combination treatment with asiaticoside and rapamycin: A new hope for in-stent restenosis. *Experimental and therapeutic medicine* **6**: 557-561
- Gutierrez-Dalmau A, Campistol JM (2007) Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs* **67**: 1167-1198
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**: 214-226
- Haklai R, Weisz MG, Elad G, Paz A, Marciano D, Egozi Y, Ben-Baruch G, Kloog Y (1998) Dislodgment and accelerated degradation of Ras. *Biochemistry* **37**: 1306-1314
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**: 177-189
- Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF (2005) Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in biochemical sciences* **30**: 35-42
- Harris TE, Lawrence JC, Jr. (2003) TOR signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**: re15

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **18**: 1926-1945

Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular biology of the cell* **5**: 105-118

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* **391**: 184-187

Hickey MM, Simon MC (2006) Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors. *Current topics in developmental biology* **76**: 217-257

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *New England Journal of Medicine* **347**: 488-496

Home R About AFINITOR® for Advanced Renal Cell Carcinoma.

Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ (1999) Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer research* **59**: 886-894

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD (2008) The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and cellular biology* **28**: 4104-4115

Huang M, Graves LM (2003) De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**: 321-336

Huang S, Houghton PJ (2002) Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs* **3**: 295-304

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ (2007) Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* **356**: 2271-2281

Hughes B (2010) 2009 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**: 89-92

Hussain K, Challis B, Rocha N, Payne F, Minic M, Thompson A, Daly A, Scott C, Harris J, Smillie BJ, Savage DB, Ramaswami U, De Lonlay P, O'Rahilly S, Barroso I, Semple RK (2011) An activating mutation of AKT2 and human hypoglycemia. *Science* **334**: 474

Hwang SK, Minai-Tehrani A, Lim HT, Shin JY, An GH, Lee KH, Park KR, Kim YS, Beck GR, Jr., Yang HS, Cho MH (2010) Decreased level of PDCD4 (programmed cell death 4) protein activated cell proliferation in the lung of A/J mouse. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* **23**: 285-293

- Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer* **5**: 341-354
- Ihle NT, Williams R, Chow S, Chew W, Berggren MI, Paine-Murrieta G, Minion DJ, Halter RJ, Wipf P, Abraham R (2004) Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics* **3**: 763-772
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**: 955-968
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* **6**: 1122-1128
- Janus A, Robak T, Smolewski P (2005) The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumorigenesis and targeted antitumour therapy. *Cellular & molecular biology letters* **10**: 479-498
- Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, Kuo J, Zhang L, Chopp M (2009) Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology* **8**: 25
- Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K (2005) The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8573-8578
- Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**: 338-345
- Juengel E, Engler J, Natsheh I, Jones J, Mickuckyte A, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA (2009) Combining the receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 strongly inhibits adhesion and growth of renal cell carcinoma cells. *BMC cancer* **9**: 161
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* **20**: 1992-2003
- Kahan BD (1993) Optimization of cyclosporine therapy. *Transplantation proceedings* **25**: 5-9
- Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N (2010) Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **285**: 20109-20116
- Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castaño JG, Aronin N, DiFiglia M (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The Journal of Neuroscience* **20**: 7268-7278

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**: 163-175

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* **10**: 935-945

Kim JE, Chen J (2004) regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **53**: 2748-2756

Kim YM, Stone M, Hwang TH, Kim YG, Dunlevy JR, Griffin TJ, Kim DH (2012) SH3BP4 is a negative regulator of amino acid-Rag GTPase-mTORC1 signaling. *Molecular cell* **46**: 833-846

Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP (2004) Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clinical pharmacokinetics* **43**: 83-95

Knight SD, Adams ND, Burgess JL, Chaudhari AM, Darcy MG, Donatelli CA, Luengo JI, Newlander KA, Parrish CA, Ridgers LH (2010) Discovery of GSK2126458, a highly potent inhibitor of PI3K and the mammalian target of rapamycin. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**: 39-43

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer* **5**: 726-734

Krakstad C, Chekenya M (2010) Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer* **9**: 135

Kristof AS, Marks-Konczalik J, Billings E, Moss J (2003) Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin. *The Journal of biological chemistry* **278**: 33637-33644

Kristof AS, Pacheco-Rodriguez G, Schremmer B, Moss J (2005) LY303511 (2-piperazinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) acts via phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathways to inhibit cell proliferation via mammalian target of rapamycin (mTOR)-and non-mTOR-dependent mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314**: 1134-1143

Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* **40**: 280-293

Kuhn B, Jacobsen W, Christians U, Benet LZ, Kollman PA (2001) Metabolism of sirolimus and its derivative everolimus by cytochrome P450 3A4: insights from docking, molecular dynamics, and quantum chemical calculations. *Journal of medicinal chemistry* **44**: 2027-2034

Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**: 585-596

Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, Farrell AT, Justice R, Mitchell SS, Sridhara R, Pazdur R (2010) FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *The oncologist* **15**: 428-435



La Monica S, Galetti M, Alfieri RR, Cavazzoni A, Ardizzoni A, Tiseo M, Capelletti M, Goldoni M, Tagliaferri S, Mutti A, Fumarola C, Bonelli M, Generali D, Petronini PG (2009) Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Biochemical pharmacology* **78**: 460-468

Laplante M, Sabatini DM (2009a) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current biology : CB* **19**: R1046-1052

Laplante M, Sabatini DM (2009b) mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* **122**: 3589-3594

Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D, Smith JA, Slingerland JM (2009) RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 9268-9273

Lee DF, Hung MC (2007) All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle* **6**: 3011-3014

Lee VH, Healy T, Fonseca BD, Hayashi A, Proud CG (2008) Analysis of the regulatory motifs in eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. *The FEBS journal* **275**: 2185-2199

Lempiainen H, Halazonetis TD (2009) Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *The EMBO journal* **28**: 3067-3073

Li B, Desai SA, MacCorkle-Chosnek RA, Fan L, Spencer DM (2002a) A novel conditional Akt 'survival switch' reversibly protects cells from apoptosis. *Gene therapy* **9**: 233-244

Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan K-L (2002b) Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 44593-44596

Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *The Journal of biological chemistry* **282**: 35803-35813

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature genetics* **16**: 64-67

Lieberthal W, Levine JS (2012) Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *American journal of physiology Renal physiology* **303**: F1-10

Lin J-F, Tsai T-F, Liao P-C, Lin Y-H, Lin Y-C, Chen H-E, Chou K-Y, Thomas I, Hwang S (2013) Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human prostate cancer cells via inhibition of mTOR signaling. *Carcinogenesis* **34**: 406-414

Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC (2006) Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular cell* **21**: 521-531

Loewith R, Hall MN (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**: 1177-1201

- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology : CB* **15**: 702-713
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 439-448
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**: 179-193
- Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 307-318
- MacKenzie MJ, Ernst S, Johnson C, Winkquist E (2012) A phase I study of temsirolimus and metformin in advanced solid tumours. *Investigational new drugs* **30**: 647-652
- Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* **7**: 1851-1863
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* **25**: 6416-6422
- Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, Lollini P-L, Maira S-M, Garcia-Echeverria C, Mercuri M (2010) NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clinical Cancer Research* **16**: 530-540
- Marone R, Erhart D, Mertz AC, Bohnacker T, Schnell C, Cmiljanovic V, Stauffer F, Garcia-Echeverria C, Giese B, Maira S-M (2009) Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. *Molecular Cancer Research* **7**: 601-613
- Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, Eng C (1997) Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nature genetics* **16**: 333-334
- Martin PM, Sutherland AE (2001) Exogenous amino acids regulate trophoblast differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Developmental biology* **240**: 182-193
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007) Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**: 961-967
- McCubrey JA, Sokolosky ML, Lehmann BD, Taylor JR, Navolanic PM, Chappell WH, Abrams SL, Stadelman KM, Wong EW, Misaghian N, Horn S, Basecke J, Libra M, Stivala F, Ligresti G, Tafuri A, Milella M, Zarzycki M, Dzugaj A, Chiarini F, Evangelisti C, Martelli AM, Terrian DM, Franklin RA, Steelman LS (2008) Alteration of Akt activity increases chemotherapeutic drug and hormonal resistance in breast cancer yet confers an achilles heel by sensitization to targeted therapy. *Advances in enzyme regulation* **48**: 113-135
- McMahon LP, Yue W, Santen RJ, Lawrence JC, Jr. (2005) Farnesylthiosalicylic acid inhibits mammalian target of rapamycin (mTOR) activity both in cells and in vitro by promoting dissociation of the mTOR-raptor complex. *Mol Endocrinol* **19**: 175-183

Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 2278-2287

Merkel S, Mogilevskaja N, Mengel M, Haller H, Schwarz A (2006) Side effects of sirolimus. In *Transplant Proc*, Vol. 38, pp 714-715.

Mita MM, Mita AC, Chu QS, Rowinsky EK, Fetterly GJ, Goldston M, Patnaik A, Mathews L, Ricart AD, Mays T, Knowles H, Rivera VM, Kreisberg J, Bedrosian CL, Tolcher AW (2008) Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 361-367

Mondesire WH, Jian W, Zhang H, Ensor J, Hung MC, Mills GB, Meric-Bernstam F (2004) Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 7031-7042

Moore PA, Rosen CA, Carter KC (1996) Assignment of the human FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) gene to chromosome 1p36 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **33**: 331-332

Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE (2003) Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *The New England journal of medicine* **349**: 1315-1323

Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S (2004a) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **24**: 6710-6718

Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S (2004b) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **24**: 6710-6718

Nada S, Hondo A, Kasai A, Koike M, Saito K, Uchiyama Y, Okada M (2009) The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *The EMBO journal* **28**: 477-489

Nakashima A, Kawanishi I, Eguchi S, Yu EH, Oshiro N, Yoshino K, Kikkawa U, Yonezawa K (2013) Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes. *Journal of biomedical science* **20**: 24

Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical journal* **344 Pt 2**: 427-431

Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL (2001) Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10314-10319

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3

phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14238-14243

Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K-i, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K (2003) The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 15461-15464

O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, Rivera VM, Tang H, Metcalf CA, 3rd, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Dalgarno D, Clackson T, Sawyer TK, Deininger MW, Druker BJ (2004) Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood* **104**: 2532-2539

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* **66**: 1500-1508

Ochiai T, Gunji Y, Nagata M, Komori A, Asano T, Isono K (1993) Effects of rapamycin in experimental organ allografting. *Transplantation* **56**: 15-19

Orlova KA, Parker WE, Heuer GG, Tsai V, Yoon J, Baybis M, Fenning RS, Strauss K, Crino PB (2010) STRADalpha deficiency results in aberrant mTORC1 signaling during corticogenesis in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* **120**: 1591-1602

Otulakowski G, Duan W, O'Brodovich H (2009) Global and gene-specific translational regulation in rat lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **40**: 555-567

Oz HS, Hughes WT (1997) Novel anti-Pneumocystis carinii effects of the immunosuppressant mycophenolate mofetil in contrast to provocative effects of tacrolimus, sirolimus, and dexamethasone. *Journal of Infectious Diseases* **175**: 901-904

Park S, Chapuis N, Bardet V, Tamburini J, Gallay N, Willems L, Knight Z, Shokat K, Azar N, Viguie F (2008) PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* **22**: 1698-1706

Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL (2000) FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *The Journal of biological chemistry* **275**: 7416-7423

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**: 873-886

Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N (2007) mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *British journal of cancer* **96 Suppl**: R11-15

Phornphutkul C, Wu KY, Auyeung V, Chen Q, Gruppuso PA (2008) mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**: 702-712

Porta C, Osanto S, Ravaud A, Climent MA, Vaishampayan U, White DA, Creel P, Dickow B, Fischer P, Gornell SS, Meloni F, Motzer RJ (2011) Management of adverse events associated with the use of everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* **47**: 1287-1298

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-443

Prevo R, Deutsch E, Sampson O, Diplexcito J, Cengel K, Harper J, O'Neill P, McKenna WG, Patel S, Bernhard EJ (2008) Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. *Cancer research* **68**: 5915-5923

Proud CG (2005) The eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins and apoptosis. *Cell death and differentiation* **12**: 541-546

Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human molecular genetics* **11**: 1107-1117

Raynaud FI, Eccles SA, Patel S, Alix S, Box G, Chuckowree I, Folkes A, Gowan S, Brandon ADH, Di Stefano F (2009) Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Molecular cancer therapeutics* **8**: 1725-1738

Reinke A, Chen JC-Y, Aronova S, Powers T (2006) Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 31616-31626

Rivera VM, Squillace RM, Miller D, Berk L, Wardwell SD, Ning Y, Pollock R, Narasimhan NI, Iulucci JD, Wang F, Clackson T (2011) Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a potent mTOR inhibitor, has broad antitumor activity and can be optimally administered using intermittent dosing regimens. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 1059-1071

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13489-13494

Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature reviews Cancer* **6**: 729-734

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

Saci A, Cantley LC, Carpenter CL (2011) Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Molecular cell* **42**: 50-61

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**: 290-303

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**: 1496-1501

- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* **25**: 903-915
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology* : *CB* **14**: 1296-1302
- Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* **22**: 159-168
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098-1101
- Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F (2010) Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene* **29**: 2746-2752
- Schalm SS, Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Current biology* : *CB* **12**: 632-639
- Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J (2003) TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Current biology* : *CB* **13**: 797-806
- Schmidt A, Kunz J, Hall MN (1996) TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13780-13785
- Scott PH, Lawrence JC (1998) Attenuation of mammalian target of rapamycin activity by increased cAMP in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 34496-34501
- Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Li M, Nishimoto T (2001) Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *The Journal of biological chemistry* **276**: 7246-7257
- Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT (2000) A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer research* **60**: 3504-3513
- Semenza GL (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology* **13**: 167-171
- Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S (2008) NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer research* **68**: 8022-8030
- Shaw RJ, Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**: 424-430
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, Montminy M, Cantley LC (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310**: 1642-1646

- Shor B, Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K (2009) Targeting mTOR globally in cancer. *Cell Cycle* **8**: 3831-3837
- Singh K, Sun S, Vezina C (1979) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *The Journal of antibiotics* **32**: 630-645
- Soliman GA (2005) The mammalian target of rapamycin signaling network and gene regulation. *Current opinion in lipidology* **16**: 317-323
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**: 710-714
- Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nature cell biology* **5**: 559-565
- Stuckey L, Bartos C, McCullough H, Florn R, Lama V, Lin J, Chan K (2013) Use of Sirolimus in Lung Transplantation: A Single Center Experience. *The Journal of heart and lung transplantation* **32**: S89
- Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR (2005) Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer research* **65**: 7052-7058
- Takahashi T, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, Yoshino K, Kuroda Y, Yonezawa K (2000) Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **5**: 765-775
- Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H, de Lange T (2007) Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell* **131**: 1248-1259
- Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y (1999) Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and cellular biology* **19**: 1346-1358
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 8023-8032
- Tobak AT (2007) *Construction of the Three-dimensional Structure of the MTor Kinase-domain and Discovery of Novel MTOR Inhibitors*: ProQuest.
- Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA (2008) Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  on mTORC1 and mTORC2. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 34495-34499
- Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW (1998) Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. *Clinical biochemistry* **31**: 345-351
- Trotter J (2003) Sirolimus in liver transplantation. In *Transplant Proc*, Vol. 35, pp S193-S200.

Tsang CK, Liu H, Zheng XF (2010) mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle* **9**: 953-957

Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC (2007) Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* **26**: 2678-2684

van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* **277**: 805-808

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**: 1029-1033

Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* **28**: 721-726

Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E (2005) mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **16**: 525-537

Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J (2011) Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 395-403

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* **269**: 5241-5248

Wan X, Helman LJ (2007) The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *The oncologist* **12**: 1007-1018

Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM (2011) Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *The Journal of clinical investigation* **121**: 1231-1241

Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr. (2007) PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *The Journal of biological chemistry* **282**: 20036-20044

Wang X, Li W, Parra JL, Beugnet A, Proud CG (2003) The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **23**: 1546-1557

Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* **20**: 4370-4379

Wang X, Proud CG (2011) mTORC1 signaling: what we still don't know. *Journal of molecular cell biology* **3**: 206-220



- Wilson WR, Hay MP (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **11**: 393-410
- Wiza C, Nascimento EB, Ouwens DM (2012) Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **302**: E1453-1460
- Wong AS, Kim SO, Leung PC, Auersperg N, Pelech SL (2001) Profiling of protein kinases in the neoplastic transformation of human ovarian surface epithelium. *Gynecologic oncology* **82**: 305-311
- Workman P, Clarke PA, Raynaud FI, van Montfort RL (2010) Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer research* **70**: 2146-2157
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484
- Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**: 599-608
- Xue Q, Hopkins B, Perruzzi C, Udayakumar D, Sherris D, Benjamin LE (2008) Palomid 529, a novel small-molecule drug, is a TORC1/TORC2 inhibitor that reduces tumor growth, tumor angiogenesis, and vascular permeability. *Cancer research* **68**: 9551-9557
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **497**: 217-223
- Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J (1995) Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Therapeutic drug monitoring* **17**: 666-671
- Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA (2010) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell* **38**: 768-774
- Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, Frost P, Gibbons JJ (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-related cancer* **8**: 249-258
- Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang W-G, Lucas J, Shor B, Kim J, Verheijen J, Curran K, Malwitz DJ (2009) Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer research* **69**: 6232-6240
- Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A (2013) Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clinical & developmental immunology* **2013**: 403280
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D (2003) Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature cell biology* **5**: 578-581
- Zhao L, Ha JH, Okla M, Chung S (2014) Activation of autophagy and AMPK by gamma-tocotrienol suppresses the adipogenesis in human adipose derived stem cells. *Molecular nutrition & food research* **58**: 569-579

Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan Y-Y, Granter SR, Chin L, Cantley LC (2009) Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell* **33**: 237-247

Zhou H, Luo Y, Huang S (2010) Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **10**: 571-581

Zhou X, Hampel H, Thiele H, Gorlin RJ, Hennekam RC, Parisi M, Winter RM, Eng C (2001) Association of germline mutation in the PTEN tumour suppressor gene and Proteus and Proteus-like syndromes. *Lancet* **358**: 210-211

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 21-35

Zou H, Lai Y, Zhao X, Yan G, Ma D, Cardenes N, Shiva S, Liu Y, Bai X, Jiang Y (2013) Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 by Bcl-2 and Bcl-XL proteins. *The Journal of biological chemistry* **288**: 28824-28830