



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXIV CICLO**

**“ERK / AKT / mTORC1: cross-talk tra sintesi proteica, autofagia e
sopravvivenza cellulare”**

DOTTORANDA

Dott.ssa Concetta Anna Germano

DOCENTE GUIDA

Prof.ssa Livia Di Renzo

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

1. Sommario

1. Sommario	1
2. Introduzione.....	3
2.1 mTORC1 e ERK nelle leucemie mieloidi acute.....	4
2.1.1 mTOR.....	6
2.1.2 La via di PI3K/AKT/mTOR	8
2.1.3 La regolazione di mTORC1.....	11
2.1.4 La via di Ras-Raf-MEK-ERK.....	14
2.1.5 Cross-talk tra PI3K/AKT/mTOR e la via di ERK.....	15
2.2 L'autofagia	21
2.2.1 I diversi tipi di autofagia.....	21
2.2.2 Aspetti molecolari della macroautofagia	23
2.2.3 La regolazione dell'autofagia	26
2.2.4 La regolazione trascrizionale dell'autofagia.....	28
2.3 La sintesi proteica	32
2.3.1 La traduzione di mRNA in modo CAP-dipendente e CAP-indipendente	32
2.3.2 Regolazione della sintesi proteica	33
2.3.2 La regolazione della sintesi proteica mediata da eIF2 α	37
3. Scopo.....	41
4. Materiali e metodi.....	43
4.1 Materiali	43
4.2 Colture cellulari.....	43
4.3 Analisi citofluorimetrica della morte cellulare.....	44
4.4 Frazionamento delle proteine citosoliche e nucleari.....	45
4.5 SDS-PAGE e Western-blot	45
4.6 SUnSET	48
4.7 Estrazione di RNA.....	49
4.8 Retrotrascrizione RNA.....	49
4.9 qRT-PCR	50
4.10 Analisi statistica.....	51
5. Risultati	52
5.1 L'inibizione di mTORC1/P70S6K causa l'attivazione di ERK	52

5.2 ERK, sottratta dal loop inibitorio mTORC1-dipendente, mantiene l'omeostasi della via di mTORC1	54
5.3 ERK contrasta l'inibizione dell'autofagia indotta da Q o Rap	56
5.4 La diminuzione del flusso autofagico non è causata dall'inibizione trascrizionale di geni autofagici.....	59
5.5 L'attivazione di ERK contrasta l'inibizione della sintesi proteica.....	62
5.6 Tra ERK, AKT e mTORC1 esiste un cross-talk di meccanismi feedback inibitori.....	65
5.7 L'inibizione contemporanea di ERK e AKT è necessaria per la completa inibizione di mTORC1 e per una efficace morte cellulare.....	69
6. Discussione	72
7. Bibliografia.....	78

Licenza CCBY

2. Introduzione

Nella sopravvivenza cellulare sono implicate diverse vie molecolari che cooperano come una complessa rete di segnalazione con attivatori, inibitori ed effettori che comunicano tra loro, al fine di garantire il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Queste molecole controllano importanti processi cellulari quali la proliferazione, il differenziamento, la regolazione del ciclo cellulare, la senescenza, l'apoptosi e l'autofagia. È fondamentale che queste vie siano finemente regolate perché una loro alterazione può contribuire sia alla patogenesi tumorale sia all'induzione della resistenza alle terapie. Infatti, alla base dei processi di trasformazione e progressione neoplastica cruciali sono le proteine che regolano la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi. Queste molecole sono diventate il bersaglio di approcci terapeutici, aprendo una nuova era nello sviluppo e valutazione clinica di nuovi farmaci, "*smart drugs*", capaci di efficaci terapie anti-tumorali. Negli ultimi decenni importanti acquisizioni di oncologia molecolare, in particolare la conoscenza dell'intera sequenza del genoma umano, hanno consentito di ridurre il divario tra ricerca di base e pratica clinica. Lo studio di alcuni aspetti della biologia molecolare, come fattori di crescita, molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, angiogenesi, apoptosi, invasività e ciclo cellulare ha consentito di identificare nuovi bersagli farmacologici in grado di interferire con eventi chiave della trasformazione e della proliferazione della cellula neoplastica. Tra le maggiori vie bersaglio vi sono la via "PI3K/AKT/mTOR" e la via "Ras-Raf-MEK-ERK".

2.1 mTORC1 e ERK nelle leucemie mieloidi acute

Le leucemie acute mieloidi (AML) rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie ematologiche maligne che progrediscono rapidamente, risultando fatali se non opportunamente trattate (Ofraan Y et al., 2016; Saultz JN, Garzon R, 2016). La chemioterapia combinata di antracicline e citarabina ha rappresentato il cardine del trattamento nei giovani adulti da quando è stata introdotta, circa 40 anni fa (Roboz GJ, 2011), ma ha deluso le aspettative per via della chemioresistenza. Sebbene condividano la caratteristica comune della rapida proliferazione di cellule mieloidi immature e dell'accumulo nel midollo osseo di cellule con un programma di differenziamento fortemente alterato, le AML differiscono nella prognosi a lungo termine e ciò dipende dalle alterazioni citogenetiche e molecolari (Kumar CC, 2011). L'attivazione costitutiva della via di PI3K/AKT è un aspetto condiviso nelle AML (Martelli AM et al., 2006; Kubota Y et al., 2004; Xu Q et al., 2003; Grandage VL et al., 2005). Circa il 50-70% dei pazienti con AML mostrano fosforilazione sia sulla Thr308 che sulla Ser473 di AKT e l'attivazione di questa chinasi è legata a PI3K (Liu W et al., 2003).

Nelle AML sono state trovate mutazioni anche di PTEN. Circa il 75% dei pazienti affetti da questa forma di leucemia hanno una fosforilazione sul dominio regolatorio C-terminale di PTEN, che rende la proteina più stabile, ma meno attiva nei confronti del suo substrato (Vazquez F et al., 2001). Inoltre, in alcuni pazienti i livelli d'espressione di PTEN sono bassi o assenti (Xu Q et al., 2003), anche se non sempre ciò sembra essere correlato alla fosforilazione di AKT.

Altre modificazioni che portano ad un'aumentata attività di PI3K/AKT nelle AML interessano i TRK (Martelli AM et al., 2012). Ne è un esempio il recettore tirosin-chinasi FLT3, che si localizza sulla superficie dei progenitori ematopoietici ed è espresso nelle cellule stromali del midollo osseo. A causa di una duplicazione nel dominio giustapposto alla membrana si ha un'attivazione ligando-indipendente del

recettore e conseguente super attivazione della via di PI3K/AKT (Tamburini J et al., 2007; Pratcorona M et al., 2013).

Circa il 15-25% delle AML totali presentano mutazioni puntiformi nei geni N-Ras e K-Ras che determinano la formazione di proteine costitutivamente attive. Dal momento che Ras attiva la via PI3K/AKT sia direttamente che indirettamente (mediante la via Raf-MEK-ERK), l'effetto finale di tali mutazioni è un forte potenziamento di questa via di segnalazione (Steelman LS et al., 2004; Minami Y et al., 2003).

Recenti studi hanno identificato la via di mTORC1/S6K come regolatrice chiave nell'ematopoiesi e nella leucemogenesi, includendo anche il ruolo nell'auto-rinnovamento (*self-renewal*) delle cellule staminali leucemiche (*leukemia stem cells*, LSC). Le LSC costituiscono una piccola popolazione di cellule che hanno la potenzialità di avviare e mantenere la progressione tumorale (Lapidot T et al., 1994). Nei pazienti con AML, Rheb, attivatore di mTORC1, è sovra espresso (Gao Y et al., 2016). I pazienti che presentano un'aumentata espressione di Rheb hanno una più bassa possibilità di sopravvivenza rispetto a quelli che hanno un basso livello di espressione di Rheb. L'eliminazione di Rheb in un modello murino di leucemia ha determinato una ridotta attività delle LSC e ciò si traduce in una ridotta attività di mTORC1 (Gao Y et al., 2016).

Inoltre nel 60% delle cellule isolate da pazienti con AML, S6K e 4EBP1, substrati a valle di mTORC1, risultano costitutivamente fosforilati (Recher C et al., 2005).

Man mano che si comprendono le vie molecolari coinvolte nelle AML, vengono scoperti nuovi bersagli (Assouline S et al., 2012; Gao W, Estey E, 2015) e risulta sempre più chiaro che prendere di mira una sola via aberrante non risulta abbastanza efficace per controllare la progressione della malattia.

2.1.1 mTOR

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) rappresenta una delle principali chinasi implicate nella sopravvivenza cellulare che risulta cruciale in molti processi fisiologici, quali la progressione del ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il differenziamento, l'autofagia, la motilità e il metabolismo cellulare. A seconda dello status nutrizionale della cellula, mTOR riprogramma il metabolismo per acquisire nutrienti dall'ambiente extracellulare e fonti intracellulari al fine di generare ATP e intermedi necessari per la sintesi di macromolecole (Kim J, Guan KL, 2019). mTOR è una serina/treonina chinasi di 289 KDa, appartenente alla famiglia PIKK (*PI3K-related protein kinase*) (Laplante M, Sabatini DM, 2012). mTOR funziona come subunità catalitica in due complessi multiproteici strutturalmente distinti: mTORC1 e mTORC2 (Jewell JL, Guan KL, 2013) (Figura 1).

mTORC1 è il complesso meglio conosciuto ed è costituito da mTOR, la subunità catalitica del complesso, e diverse proteine regolatrici, Raptor, GβL e PRAS40. Una volta attivato da nutrienti e fattori di crescita, mTORC1 fosforila e controlla almeno due regolatori della sintesi proteica, P70S6K (*P70S6 kinase*), una chinasi ribosomiale e 4EBP1 (*eucaryotic translation-initiation factor 4E-inhibitory binding protein*), un inibitore traduzionale quando non fosforilato, che promuovono la traduzione di proteine necessarie per la crescita cellulare, incluse c-Myc e la ciclina D. S6K, infatti, attiva la traduzione di RNA messaggeri (mRNA) fosforilando la proteina S6 del complesso ribosomiale 40S, mentre la fosforilazione di 4EBP1 consente il rilascio del fattore eIF4E che diventa libero di prendere parte alla formazione del complesso d'inizio della traduzione. mTORC1 svolge un ruolo critico anche nella regolazione del metabolismo cellulare (Dibble CC, Manning BD, 2013). mTORC1 può essere attivato dai fattori di crescita attraverso l'attivazione di PI3K/AKT, ma anche dalle proteine Rag-GTPasi in risposta agli aminoacidi, che ne promuovono la sua traslocazione a livello della membrana lisosomiale dove si localizza Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), una piccola GTPasi che funziona come suo diretto

attivatore nello stato legato a GTP (Jewell JL, Guan KL, 2013). Le proteine Rag formano degli eterodimeri di RagA o RagB con RagC o RagD. La presenza di aminoacidi promuove la formazione della forma attiva dell' eterodimero Rag (RagA/B^{GTP} - RagC/D^{GDP}) che si lega direttamente a Raptor e quindi recluta mTORC1 al lisosoma. Una volta sul lisosoma, mTORC1 incontra Rheb e l'associazione ne comporta l'attivazione. In una condizione di carenza di aminoacidi, gli eterodimeri Rag assumono una conformazione inattiva (RagA/B^{GDP} - RagC/D^{GTP}) e non sono più in grado di reclutare mTORC1 a livello lisosomiale. Pertanto, mTORC1 rimane citosolico e inattivo (Duran RV, Hall MN, 2012).

In confronto a mTORC1, si conosce molto poco mTORC2 (Xie J et al., 2018). È costituito da mTOR, subunità catalica del complesso, e come proteine regolatrici comprende Rictor, SIN1 e mLST8. È associato con la membrana plasmatica, i mitocondri e una sottopopolazione di vescicole endosomiali (Ebner M et al., 2017) ed è attivato da nutrienti e fattori di crescita che segnalano attraverso la via di PI3K (Gan X et al., 2011; Liu P et al., 2015). mTORC2 controlla diverse proteine chinasi, tra cui AKT, SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) e la proteina chinasi C- α (PKC- α) (Meng D et al., 2018). mTORC2 attiva direttamente AKT fosforilando il residuo Ser473, un sito richiesto per la sua massima attivazione (Facchinetti V et al., 2008). mTORC2 attiva direttamente anche SGK1, una chinasi che controlla il trasporto ionico e la crescita cellulare (Garcia-Martinez JM, Alessi DR, 2008). In contrasto con quanto accade per AKT, l'attività di SGK1 viene completamente bloccata dalla perdita di mTORC2. PKC- α è l'altra chinasi attivata da mTORC2. Insieme ad altri effettori, l'attivazione di questa chinasi da parte di mTORC2 regola la forma cellulare, in maniera dipendente dal tipo cellulare, influenzando l'actina del citoscheletro.

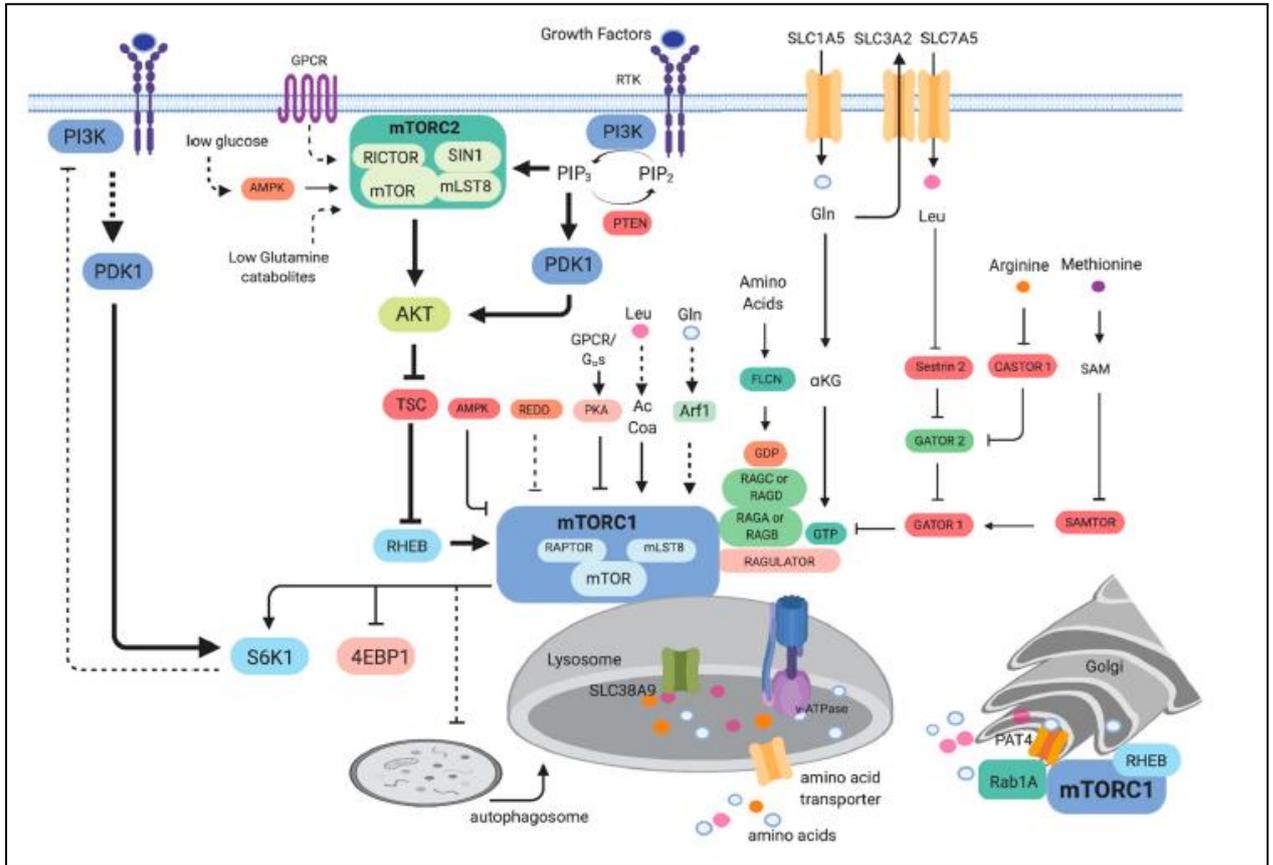


Figura 1: Via di segnale di mTOR. L'attivazione di mTOR è mediata dalla presenza di nutrienti e fattori di crescita ed è potenziata dalla via PI3K/AKT. L'attivazione di mTORC2 è aumentata dalla presenza di fattori di crescita e dalla segnalazione indotta dai recettori accoppiati alle proteine G (GPCR, *G-protein coupled receptor*). Le frecce continue indicano i segnali derivati dai fattori di crescita. Le frecce tratteggiate indicano una modulazione indiretta (Cedric M et al., 2019.)

2.1.2 La via di PI3K/AKT/mTOR

La via di PI3K/AKT/mTOR svolge un ruolo regolatorio di molteplici meccanismi biologici quali la proliferazione, il metabolismo, la migrazione, la sopravvivenza, la trascrizione, la traduzione, l'autofagia e la biogenesi lisosomiale (Laplante M, Sabatini DM, 2012; Shimobayashi M, Hall MN, 2014). PI3K appartiene a un gruppo di chinasi che fosforilano il gruppo 3'-OH del fosfatidilinositolo (PI) nelle membrane

cellulari. Si distinguono tre classi di PI3K a seconda della loro struttura, specificità di substrato e partner di legame (Bilanges B et al., 2019; Gulluni F et al., 2019; Hirsch E et al., 2020). In risposta a stimoli diversi, inclusi i ligandi dei recettori accoppiati alle proteine G, GPCR (*G protein coupled receptors*), e dei recettori tirosin-chinasici, TRK (*tyrosine receptor kinase*), PI3K catalizza la formazione del fosfatidilinositolo (3,4,5)-trifosfato (PIP3) che funziona da secondo messaggero per la trasduzione del segnale all'interno della cellula che coordina la localizzazione e l'attivazione di una varietà di effettori a valle, il più importante dei quali è AKT (Franke TF, 2008). AKT possiede un dominio PH (*pleckstrin homology*) nell'estremità N-terminale e due importanti residui, Thr308 e Ser473, che risultano critici per la sua attivazione. In risposta a PI3K, AKT trasloca a livello della membrana plasmatica dove si lega a molecole di PIP3, prodotte da PI3K, grazie al suo dominio PH. Il reclutamento di AKT a livello della membrana cellulare comporta una modificazione conformazionale che permette al residuo Thr308 di essere fosforilato da PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*), una serina/treonina chinasi contenente un dominio PH. Questa fosforilazione è necessaria, ma non sufficiente alla completa attivazione di AKT. AKT, infatti, necessita una seconda fosforilazione che avviene sul residuo Ser473, nel dominio regolatorio C-terminale, che è mediata da mTORC2 (Sarbasov DD et al., 2005). In questo modo AKT raggiunge la completa attivazione e, a sua volta, è in grado di fosforilare molteplici proteine a valle, incluso il complesso mTORC1 (Bilanges B et al., 2019).

La via di PI3K/AKT è ridotta mediante defosforilazione di AKT. Le fosfatasi coinvolte in questo tipo di meccanismo sono la PP2A (*protein phosphatase A*) e la famiglia di fosfatasi PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) che rimuove il fosfato dalla Ser473 di AKT (Stambolic V et al., 1998; Liu W et al., 2003; Gao T et al., 2005). Ne consegue che la segnalazione dipendente da AKT è inibita (Song MS et al., 2012). PI3K è regolata negativamente da PTEN (*Phosphatase and TENsin homologue*) una fosfatasi che defosforila PIP3 a PIP2. L'attività fosfataseica è

fondamentale per la funzione di oncosoppressore di PTEN, poiché regola negativamente l'attivazione della via oncogenica di PI3K/AKT. L'espressione di PTEN è regolata da PI3K che controlla la sua traduzione dipendente da mTORC1 (Mukherjee R et al., 2021). Ciò permette di regolare le risposte della via di segnale a possibili alterazioni ambientali, genetiche o farmacologiche. L'attivazione di PI3K in risposta a nutrienti e fattori di crescita è accompagnata dall'induzione dell'espressione di PTEN che limita la durata del segnale e ne previene un eccesso di attivazione. In contrasto, gli effetti di una inibizione fisiologica o farmacologica della via di segnale sono limitati da una riduzione dell'espressione di PTEN. La regolazione dell'espressione di PTEN attraverso cambiamenti nella segnalazione di PI3K controlla gli effetti di queste alterazioni. In questo modo la cellula si garantisce un potente meccanismo per la regolazione omeostatica della stessa via (Mukherjee R et al., 2021). Mutazioni che alterano la via di segnale di PI3K e inattivano PTEN annullano questo effetto, favorendo la sopravvivenza cellulare e la risposta alla riattivazione della via (Figura 2). Mutazioni di questo tipo sono abbastanza frequenti nel cancro, dove spesso coesistono la perdita della funzione di PTEN e mutazioni di PI3K (Millis SZ et al., 2016; Zhao L, Vogt PK, 2008). Queste mutazioni si possono accompagnare ad altre a carico di proteine cruciali per la proliferazione e sopravvivenza, come per esempio Ras e Raf, le quali già da sole sono sufficienti a promuovere e guidare la crescita tumorale (Shaw RJ, Cantley LC, 2006). Vista l'importanza di questa via nel controllo sia della proliferazione cellulare che della sopravvivenza, variazioni nella via di segnale di PI3K/AKT rappresentano un punto chiave nello sviluppo e nella progressione di molte neoplasie. Mutazioni e riarrangiamenti cromosomici che portano all'aumento dell'attività enzimatica sono stati trovati in diverse neoplasie (Samuels Y, Velculescu VE, 2004).

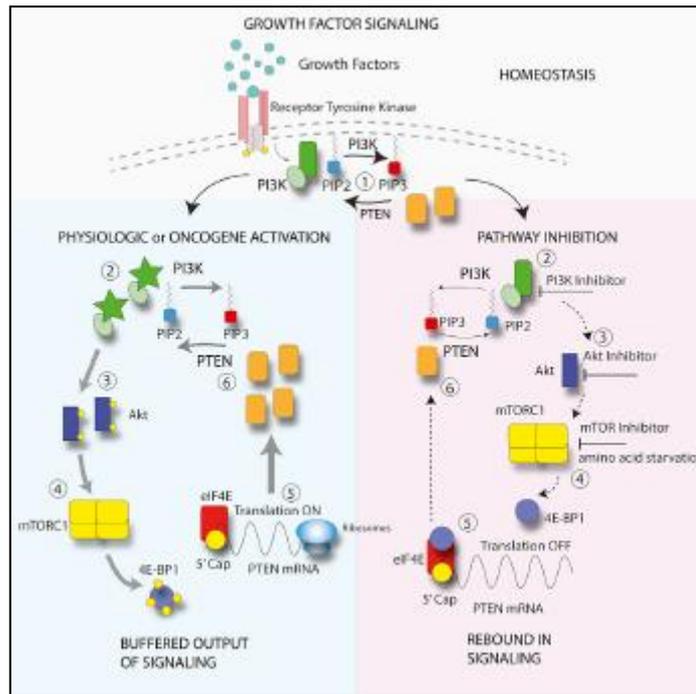


Figura 2: Il mantenimento dell'omeostasi della via di PI3K è mediato dal suo stesso controllo della traduzione del suo regolatore negativo, PTEN. Alterazioni della via sono tamponate da cambiamenti nell'espressione di PTEN, che limitano gli effetti dell'attivazione fisiologica o oncogenica della segnalazione, così come anche gli effetti terapeutici degli inibitori di PI3K (Mukherjee R et al., 2021).

2.1.3 La regolazione di mTORC1

mTORC1 è collegato alla segnalazione di PI3K tramite il complesso TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex*), il quale agisce come regolatore negativo a monte di mTORC1 (Inoki K et al., 2003; Manning BD et al., 2002). TSC1 e TSC2 si associano tra loro per formare un complesso eterodimerico in cui TSC2 funziona come GAP (*GTPase-activating protein*) che permette di idrolizzare il GTP in GDP, per la GTPasi Rheb, mentre TSC1 è necessaria per stabilizzare TSC2 e prevenire la sua degradazione (Chong-Kopera H et al., 2006; Tee AR et al., 2003; Yang H et al., 2017; Garami A et al., 2003) (Figura 3). Dopo l'attivazione di PI3K, AKT fosforila TSC2 sui residui Ser939, Ser981, Ser1130, Ser1132, Thr1462 (Dibble CC et al., 2012). Inizialmente si pensava che la fosforilazione mediata da AKT di TSC2 inibisse la sua attività di GAP, con aumento dei livelli di Rheb-GTP e attivazione di mTORC1 (Inoki K et al., 2003, Tee AR et al., 2003; Garami A et al., 2003; Manning BD et al., 2002). È

stato però osservato che Rheb recluta TSC2 sulla superficie lisosomiale, dove TSC2 mantiene Rheb nel suo stato inattivo e legato al GDP (Menon S et al., 2014). La fosforilazione mediata da AKT di TSC2, che riduce marginalmente la sua attività di GAP, porta piuttosto il complesso TSC1/TSC2 a dissociarsi dal lisosoma (Menon S et al., 2014), permettendo a Rheb di legare il GTP, interagire e attivare direttamente mTORC1, il quale si comporta come sensore di nutrienti, mediando vari segnali di crescita cellulare generati dall'attivazione della via di PI3K.

Anche la via delle MAPK può attivare mTORC1, attraverso il complesso TSC1/TSC2. Infatti TSC2 può essere fosforilato da ERK (Ma L et al., 2005) e da un suo effettore a valle, p90RSK (*ribosomal protein S6 Kinase*) (Roux PP et al., 2004; Romeo Y et al., 2013; Mendoza MC et al., 2011), impedendo la sua funzione di GAP.

Mentre gli stimoli derivati dai fattori di crescita portano ad un'attivazione di mTORC1 attraverso l'inibizione del suo regolatore negativo TSC1/TSC2, condizioni di stress cellulare, come per esempio bassi livelli di nutrienti e/o ossigeno o danno al DNA, portano ad una inibizione di mTORC1 attraverso l'attivazione di TSC1/TSC2. Questa inibizione è mediata dalla proteina chinasi AMPK (*AMP-activated protein Kinase*). AMPK funziona come un punto di controllo metabolico attivando processi catabolici e inibendo processi anabolici, in parte, attraverso una regolazione negativa di mTORC1. AMPK agisce sul complesso TSC1/TSC2, inattivando la segnalazione dipendente da Rheb/mTORC1 (Hindupur SK et al., 2015). Infatti, AMPK fosforila TSC2 sui residui Thr1269 e Ser1387, attivando la sua funzione di GAP su Rheb, che in seguito all'idrolisi del GTP, rimane nella forma legata al GDP e quindi inattiva. In questa forma non è in grado di attivare mTORC1 e conseguentemente la sua segnalazione è inibita. La fosforilazione dipendente da AMPK di TSC2 permette una ulteriore fosforilazione da parte di GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) sui residui Ser1379 e Ser1383 la quale, sebbene non essenziale, stabilizza ulteriormente il complesso TSC1/TSC2 per potenziare l'effetto inibitorio di AMPK sulla segnalazione di mTORC1 (Inoki K et al., 2006). AMPK può inibire mTORC1 anche in maniera

indipendente dal complesso TSC1/TSC2, attraverso la fosforilazione diretta di Raptor, una delle proteine regolatrici che fanno parte del complesso mTORC1, sui residui Ser722 e Ser792 (Gwinn DM et al., 2008).

In condizioni di un basso stato di energia, come per esempio la mancanza di nutrienti e aminoacidi o l'ipossia si ha l'attivazione di AMPK, che permette di ripristinare l'equilibrio energetico all'interno della cellula, stimolando i processi catabolici che generano ATP (come l'autofagia) e inibendo quelli anabolici che consumano ATP, fondamentali per la sopravvivenza (come la sintesi proteica e la proliferazione) con l'obiettivo di ripristinare la riserva di ATP intracellulare (Inoki K et al., 2012; Hardie DG, 2015). AMPK è un eterodimero costituito da una subunità catalitica, la subunità α , e due subunità regolatrici, le subunità β e γ , che sono necessarie per la sua attività. Sulla subunità α sono presenti i siti di fosforilazione, mentre la subunità γ contiene domini che, in condizioni normali, legano l'ATP. Quando una cellula è in deficit energetico e il rapporto AMP/ATP aumenta, l'AMP rimpiazza l'ATP nei legami della subunità γ , portando a una modificazione conformazionale che determina un aumento dell'attività di AMPK e alla fosforilazione sulla subunità α . In questo modo AMPK è attivo e può fosforilare diverse molecole (enzimi, attivatori e co-attivatori trascrizionali), con il risultato finale di un ripristino dello stato energetico della cellula (Calabrese MF et al., 2014). L'attivazione di AMPK richiede la fosforilazione del residuo Thr172 nel loop di attivazione della subunità α (Hawley SA et al., 1996). Due proteine chinasi agiscono a monte di AMPK, fosforilandola: LKB1 (*Liver Kinase B1*) (Sakamoto K et al., 2006) e CaMKK β (*Calcium/calmoduline-dependent protein kinase kinase- β*) (Hawley SA et al., 2005; Hurley RL et al., 2005). LKB1 è la chinasi principale che fosforila AMPK, attivandola, in risposta ad una diminuzione dello stato energetico della cellula, come quella causata dalla privazione di nutrienti. CaMKK β , invece, fosforila e attiva AMPK in risposta ad un aumento della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare e svolge la sua azione anche in assenza di LKB1 (Woods A et al., 2005).

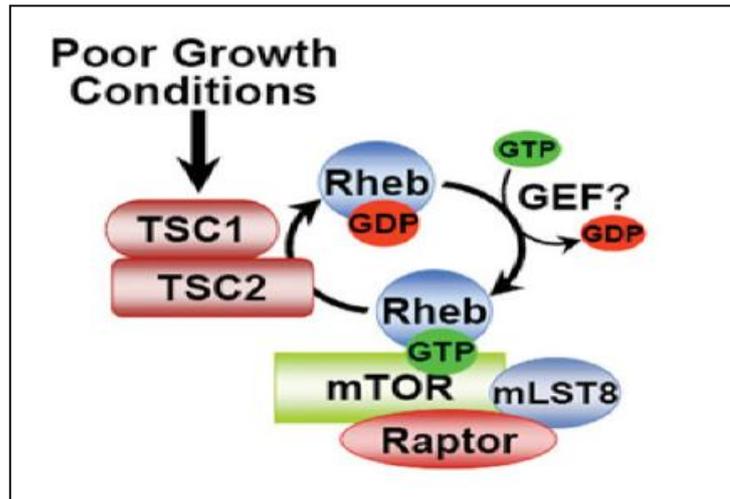


Figura 3: Regolazione di mTORC1 mediata da TSC1/TSC2 e Rheb. In condizioni di carenza di nutrienti, il complesso TSC1/TSC2 funziona come GAP per Rheb, stimolando la conversione di Rheb-GTP in Rheb-GDP. Nella forma legata al GDP, Rheb non è in grado di attivare mTORC1. In condizioni ottimali di crescita, si accumula Rheb-GTP il quale lega direttamente mTORC1 e lo attiva. GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*) contrasta l'attività di TSC1/TSC2 per la regolazione di Rheb (Huang J et al., 2008).

2.1.4 La via di Ras-Raf-MEK-ERK

ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) appartiene alla famiglia delle MAP chinasi (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), un gruppo di serina/treonina chinasi che mediano diversi segnali regolatori. ERK funziona come il principale effettore dell'oncoproteina Ras. La via di segnalazione delle MAPK consiste di una chinasi iniziale con attività GTPasica (MAPKKK) che attiva e fosforila una chinasi intermedia (MAPKK) che, a sua volta, fosforila e attiva una chinasi effettrice (MAPK). Nella via di Ras-Raf-MEK-ERK queste componenti sono rappresentate dalla GTPasi Ras, dalla proteina chinasi Raf, MEK ed ERK.

La via è attivata da fattori di crescita, ormoni polipeptidici, neurotrasmettitori, chemochine che segnalano attraverso TRK (Mckay MM, Morrison DK, 2007) o GPCR (Jain R et al., 2018) localizzati sulla membrana plasmatica, i quali vanno incontro a dimerizzazione, attivando Ras (Simanshu DK et al., 2017). A sua volta, Ras causa il

reclutamento sulla membrana e l'attivazione di Raf, suo diretto substrato. Raf fosforila MEK che attiva, infine, ERK a livello di due siti di regolazione Tyr204 e Thr204, contenuti all'interno di una sequenza conservata Thr-Glu-Tyr nel suo dominio di attivazione. Quest'ultima può attivare numerosi fattori trascrizionali, tra cui c-Myc e c-Fos, che sono coinvolti nella sopravvivenza cellulare, divisione cellulare e motilità cellulare. Un'altra importante funzione di ERK è quella di fosforilare alcune molecole regolatrici dell'apoptosi localizzate nel mitocondrio, tra cui Bim, Bax, Bcl-2, Bad (McCubrey JA et al., 2006). Un'attivazione aberrante di questa via di segnale può portare all'induzione di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, CDK (*cyclin-dependent Kinase*), e innescare un arresto del ciclo cellulare (Meloche S, Pouyssegur J, 2007).

L'alterazione della via di Ras-Raf-MEK-ERK è uno dei principali fattori scatenanti che porta allo sviluppo di diverse forme tumorali. L'attivazione della cascata di ERK si verifica nella maggior parte dei tipi di cancro. Infatti, le mutazioni che attivano questa via rappresentano il fattore oncogenico più frequente nei tumori (García-Gómez R et al., 2018).

2.1.5 Cross-talk tra PI3K/AKT/mTOR e la via di ERK

Molte vie di segnale, aventi più percorsi paralleli, si incrociano tra di loro su nodi chiave che regolano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, sia nelle cellule normali che nelle cellule tumorali. Risulta sempre più evidente, infatti, che tali vie sono regolate da una vera e propria rete di circuiti a feedback che controllano la trasduzione dei segnali intracellulari. Questi meccanismi a feedback, però, molto spesso vanificano il successo di terapie mirate ad un'unica via perché queste vengono ostacolate da una attivazione compensatoria delle vie a monte che rimodellano l'intero circuito di segnalazione. Di conseguenza, lo studio di questi meccanismi diventa sempre più un'area di fondamentale importanza per la progettazione di efficaci combinazioni di farmaci antitumorali.

Prove sempre più numerose indicano che l'asse mTORC1/S6K non solo regola le vie che promuovono la crescita cellulare, ma media anche robusti circuiti a feedback negativo che attenuano la segnalazione a monte attraverso il recettore insulina/IGF e altri TRK, sia nelle cellule normali che nelle cellule tumorali (Figura 4) (Rozengurt E et al., 2014). È noto che S6K segnala attraverso un circuito a feedback negativo che si oppone alla segnalazione dipendente da IRS-1 (*insulin receptor substrate*) (Carracedo A et al., 2008). Gli effetti di questa inibizione sulla via di PI3K hanno permesso di identificare un nuovo circuito di segnalazione estremamente rilevante, attraverso cui l'attività di mTORC1 influenza la crescita cellulare, l'assunzione di nutrienti e la progressione tumorale (Guertin DA, Sabatini DM, 2007). Infatti, l'inibizione di questi feedback dipendenti da mTORC1/S6K comporta un'eccessiva attivazione compensatoria di nodi di segnalazione a monte che includono PI3K/AKT e la via di ERK (Zoncu R et al., 2011; Soares HP et al., 2013) e che potenzialmente si oppongono agli effetti antiproliferativi degli inibitori di mTOR in molti tipi di cellule tumorali (O'Reilly KE et al., 2006; Lane HA, Breuleux M, 2009; Carracedo A, Pandolfi PP, 2008; Figlin RA et al., 2013), portando a farmacoresistenza

Ben documentato è l'aumento dell'attività di PI3K/AKT in risposta all'inibizione di mTORC1/S6K indotta dalla Rapamicina e suoi analoghi, noti anche come "*Rapalog*", in una varietà di tipi cellulari (Rozengurt E et al., 2014). La Rapamicina, e in generale i "*Rapalog*", agiscono come inibitori allosterici di mTORC1 e sono stati la prima generazione di inibitori di mTOR ad essere utilizzati come farmaci antitumorali. La Rapamicina forma un complesso inibitorio con il proprio recettore intracellulare, la proteina FKBP12, che si lega a una regione nel C-terminale delle proteine TOR, chiamata FRB (*FKBP12-rapamycin binding*), inibendone così l'attività (Ballou LM, Lin RZ, 2008). Tuttavia, inibendo l'attività di mTORC1/S6K, la Rapamicina e i "*Rapalog*" prevengono le fosforilazioni inibitorie e quindi rimuovono il feedback negativo mTORC1/S6K-dipendente sulle funzioni di IRS-1, con il risultato dell'attivazione di PI3K/AKT (Tanti JF, Jager J, 2009; Rozengurt E et al., 2014).

Quindi, conseguente all'inibizione di mTORC1 è un aumento della fosforilazione di AKT sul residuo Thr308, specifico della chinasi PDK1, e sul residuo Ser473, specifico di mTORC2 (Shi Y et al., 2005).

Anche mTORC1 e mTORC2 sono collegati tra di loro da un feedback negativo che si presenta come un meccanismo aggiuntivo che va a potenziare la fosforilazione di AKT in risposta al trattamento con la Rapamicina (Ghosh J, Kapur R, 2017). SIN1 e Rictor sono le due componenti di mTORC2 richieste per la fosforilazione di AKT (Yang Q et al., 2006). La fosforilazione dei residui Thr86 e Thr398 di SIN1 mediata da mTORC1/S6K causa la dissociazione di SIN1 dal complesso, compromettendo l'attività complessiva di mTORC2 (Liu P et al., 2013). mTORC1/S6K può anche regolare l'attività di mTORC2 fosforilando Rictor, l'altra componente del complesso. Dopo l'attivazione dipendente da mTORC1, S6K fosforila Rictor sul residuo Thr1135, inibendo l'attivazione di AKT mediata da mTORC2 (Julien LA et al., 2010). Inoltre, mTORC2 collabora con mTORC1 nel regolare l'attività cellulare di IRS-1, mediando un feedback negativo attraverso il controllo della stabilità e della localizzazione di Fbw8, una ubiquitina ligasi, che è coinvolta nella sua degradazione (Kim SJ et al., 2012).

Tutto ciò implica che il potenziale beneficio terapeutico dovuto all'inibizione di mTORC1 con la Rapamicina è contrastato dal mancato feedback negativo che andrebbe a limitare l'attivazione di PI3K/AKT, favorendo la progressione tumorale (Figura 5).

Un ulteriore livello di complessità al feedback negativo che coinvolge mTORC1/PI3K/AKT precedentemente descritto è rappresentato dall'attivazione di un'altra via pro-sopravvivenza, la via di ERK, in risposta agli inibitori allosterici di mTORC1 (Rozenfurt E et al., 2014). Questo circuito rappresenta un altro feedback negativo dipendente da mTORC1/MAPK. Come prima detto, l'attivazione di ERK indotta dalla Rapamicina e suoi analoghi si verifica sia nelle cellule normali sia in diverse linee cellulari tumorali e dipende dall'asse S6K/PI3K/Ras (Carracedo A et al.,

2008). In condizioni d'inibizione di mTORC1, Ras è attivato e segnala attraverso la cascata delle MAPK. Questa attivazione si basa sul rilascio del freno inibitorio imposto da mTORC1/S6K su PI3K. In maniera analoga, la robusta attivazione di PI3K indotta dall'insulina/IGF-1 promuove un'altrettanta robusta attivazione di ERK, effetto potenziato dalla Rapamicina. Ci sono diversi studi che hanno dimostrato l'esistenza di un cross-talk tra la via di PI3K/AKT e la via delle MAPK (Gupta S et al., 2007; Rodriguez-Viciano P et al., 1994; Mendoza MC et al., 2011). L'attività della chinasi Raf è regolata mediante fosforilazione della Ser259, nel dominio regolatorio N-terminale. La fosforilazione di questo residuo media il legame alla proteina 14-3-3, risultando in una inattivazione di Raf. AKT fosforila la Ser259 inibendo l'attività di Raf e la fosforilazione di ERK. Inoltre, AKT è in grado di fosforilare B-Raf anche in altri due residui aminoacidici, Ser364 e Ser428, inattivando la sua attività chinasi (McCubrey JA et al., 2006; Guan KL et al., 2000). Molecole inibitrici della PI3K aumentano l'attività chinasi di Raf e quindi incrementano l'attivazione di ERK, suggerendo che AKT ha un ruolo nell'inibizione della via delle MAPK (Moelling K et al., 2002; Zimmermann S, Moelling K, 1999). Questo cross-talk tra la via di PI3K/AKT e la via della MAPK si integra perfettamente nella rete di segnalazione di mTORC1. Infatti, l'inibizione di mTORC1 aumenta l'attività di RTK/IRS-1/PI3K su Ras/MAPK, promuovendo in questo modo sia l'attivazione di AKT sia la fosforilazione di ERK in un meccanismo a doppio feedback (Soares HP et al., 2013).

Quanto descritto finora fornisce una valida spiegazione del perché l'attività antitumorale della Rapamicina e dei suoi analoghi è risultata piuttosto limitata deludendo le aspettative, sebbene sia stato osservato un prolungamento della sopravvivenza globale dei pazienti trattati con questi farmaci.

Con l'intento di inibire la via di mTOR in maniera più efficace, sono stati identificati una serie di nuovi inibitori di mTOR che agiscono nel suo sito cataliticamente attivo. Ne sono un esempio PP242 (Feldman ME et al., 2009), Torin (Liu Q et al., 2010), KU63794 (Garcia-Martinez JM et al., 2009) e il suo analogo

AZD8055 (Chresta CM et al., 2010). Questi composti bloccano la fosforilazione di AKT sul residuo Ser473 attraverso l'inibizione di mTORC2. Tuttavia, anche questi inibitori eliminano i feedback negativi che limitano l'attivazione della via di PI3K (Efeyan A, Sabatini DM, 2010) e, di conseguenza, anche per questi inibitori la loro efficacia terapeutica può essere ridotta dall'attivazione delle segnalazioni a monte che si oppongono ai loro effetti anti-proliferativi.

Nel tentativo di prevenire queste attivazioni compensatorie conseguenti all'inibizione di mTOR sono stati sviluppati diversi doppi inibitori di PI3K e mTOR (PI3K/TOR-KIs) (Soares HP et al., 2015). Ne sono un esempio gli inibitori BEZ235 (Maira SM et al., 2008; Yang F et al., 2013), PKI (Mallon R et al., 2011; Venkatesan AM et al., 2010) e GDC-0980 (Wallin JJ et al., 2011). Sebbene questi inibitori sono in grado di prevenire l'attivazione di PI3K/AKT causata dall'inibizione di mTOR/S6K, determinano comunque una eccessiva attivazione della via di ERK attraverso un meccanismo a feedback negativo mediato da mTORC2, indipendente da PI3K (Soares HP et al., 2015).

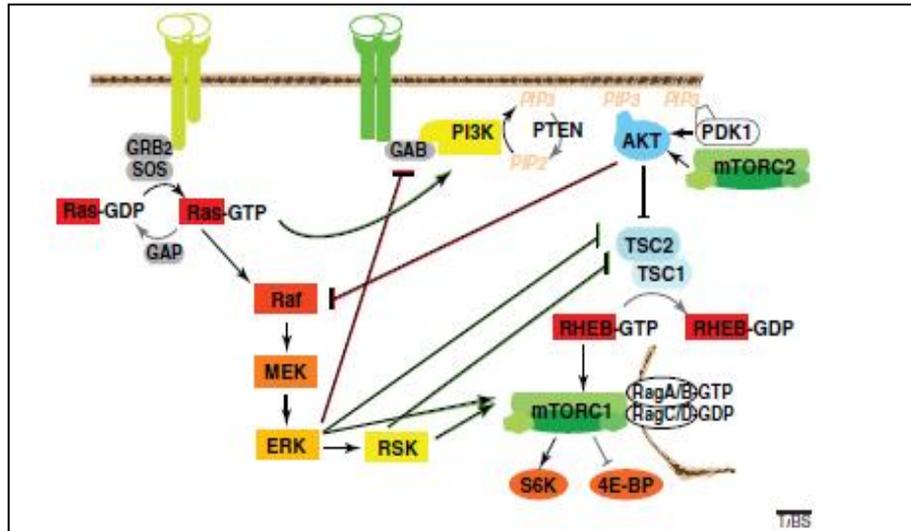


Figura 4: Cross-talk tra la via di PI3K/AKT/mTORC1 e la via di Ras-Raf-MEK-ERK. Queste vie si regolano a vicenda tramite inibizioni (in rosso) e attivazioni (in verde). TSC2 e mTORC1 sono nodi d'integrazione chiave che ricevono molti input sia dalla via di Ras-ERK sia dalla via di PI3K/AKT (Mendoza MC et al.,2011).

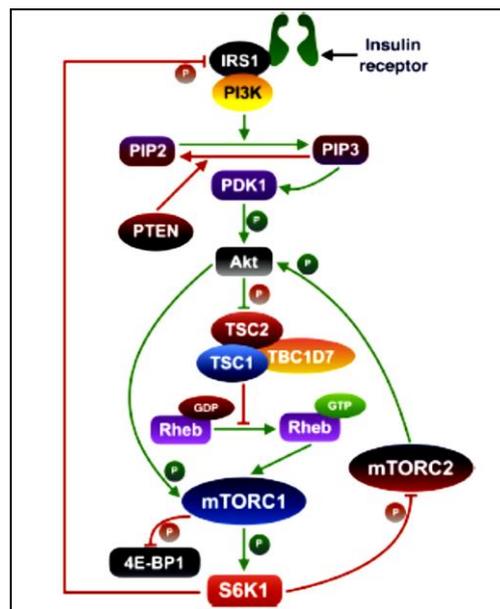


Figura 5: L'inibizione dell'attività di mTORC1 dipende da S6K. S6K agisce come regolatore negativo di mTORC1 attraverso dei feedback negativi. S6K inibisce l'attivazione PI3K/AKT/mTORC1 fosforilando IRS-1, con conseguente interruzione dell'interazione tra IRS-1 e recettore dell'insulina e inibizione dell'attività di AKT mediata da PI3K. L'inibizione di AKT, regolatore positivo a monte di mTORC1, si traduce in una riduzione dell'attività di mTORC1. S6K media anche la fosforilazione di SIN1 e Rictor, componenti del complesso mTORC2, compromettendo l'attività complessiva di mTORC2 e causando l'inibizione dell'attività di AKT (Ghosh J, Kapur R, 2017).

2.2 L'autofagia

2.2.1 I diversi tipi di autofagia

L'autofagia è un processo catabolico, evolutivamente conservato, che è coinvolto nella degradazione lisosomiale di materiale citoplasmatico, importante per il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Wang H et al., 2019). Il contributo dell'autofagia nel cancro è un tema molto complesso e dibattuto. La letteratura corrente è in accordo con il definire l'autofagia come un processo in grado di svolgere diversi ruoli durante lo sviluppo e la progressione tumorale. (Yun CW, Lee SH, 2018). Ci sono dati bibliografici che supportano l'evidenza che tale processo possa avere sia la funzione di promotore che di soppressore tumorale. Questo paradosso può essere spiegato con i distinti ruoli che l'autofagia può assumere durante la progressione del tumore, che possono essere diversi a seconda del tipo di tumore, del contesto e della metastatizzazione (Loris S et al., 2013; White E, 2012; Lim KH, Staudt LM, 2013; Salminen A et al., 2013; Rosenfeldt MT, Ryan KM, 2011; Gewirtz DA, 2014). Mentre evidenze genetiche suggeriscono la funzione di soppressore tumorale dell'autofagia negli stadi iniziali della trasformazione tumorale, ci sono altrettante prove che l'autofagia può anche essere utilizzata dalle cellule tumorali come meccanismo di sopravvivenza durante particolari condizioni di stress, condizioni che si presentano durante la progressione tumorale e la metastatizzazione. A supporto del ruolo dell'autofagia quale soppressore tumorale c'è l'osservazione che molti oncogeni sono tra i più importanti inibitori del percorso autofagico, mentre molti soppressori tumorali attivano l'autofagia (Maiuri MC et al., 2009; Botti J et al., 2006).

L'autofagia può essere generale o non selettiva e selettiva. L'autofagia non selettiva è utilizzata per il riciclo di materiale citoplasmatico in condizioni di carenza di nutrienti, mentre l'autofagia selettiva riconosce bersagli specifici e serve per il turnover di organelli danneggiati o in eccesso, come per esempio mitocondri

danneggiati, perossisomi non necessari, ribosomi in eccesso e l'eliminazione di microrganismi intracellulari invasivi (Feng Y et al., 2014). In condizioni basali, le cellule utilizzano bassi livelli di autofagia per contribuire al mantenimento delle funzioni cellulari, dell'omeostasi cellulare e del controllo di qualità del contenuto intracellulare e per eliminare vecchie proteine e/o organelli danneggiati (Yu L et al., 2018). L'autofagia può essere ulteriormente indotta in risposta a diverse condizioni di stress, come carenza di nutrienti o fattori di crescita, ipossia e infezioni (Parzych KR, Klionsky DJ, 2014).

A seconda di come vengono sequestrati e degradati i substrati, nelle cellule eucariotiche si distinguono tre diversi tipi principali di autofagia: macroautofagia (corrispondente a quella che in generale viene chiamata autofagia), microautofagia e autofagia mediata da chaperone (CMA, *chaperone-mediated autophagy*). Sia la macroautofagia che la microautofagia coinvolgono riarrangiamenti dinamici di membrana che permettono di inglobare porzioni di citoplasma e sequestrare strutture di grandi dimensioni, come un intero organello. Nello specifico, nella macroautofagia le porzioni di citoplasma sono inglobate in una vescicola di nuova formazione e a doppia membrana, chiamata autofagosoma, che successivamente si fonde con il lisosoma (Axe EL et al., 2008). La microautofagia, invece, prevede un inglobamento diretto di una porzione di citoplasma nel lisosoma mediante invaginazione, protrusione e successiva chiusura della membrana lisosomiale (Mijaljica D et al., 2011). In entrambi i casi le membrane delle risultanti vescicole autofagiche vengono lisate per permettere la degradazione del loro contenuto, mentre le macromolecole liberate sono trasportate nel citoplasma per essere utilizzate nuovamente. Diversamente, la CMA permette la traslocazione nel lisosoma di proteine solubili mal ripiegate, attraverso l'intervento di chaperon, come Hsp72 (*heat shock protein 72*), che riconoscono una sequenza penta peptidica, il motivo KFERQ, per il substrato specifico che viene appunto traslocato nel lisosoma (Majeski AE, Dice JF, 2004).

2.2.2 Aspetti molecolari della macroautofagia

La macroautofagia o autofagia è un processo attraverso cui le cellule digeriscono e metabolizzano proprie componenti. Evento chiave dell'autofagia è la formazione di una struttura a doppia membrana chiamata autofagosoma (Song Y et al., 2014; Levy JMM et al., 2017). Una volta inglobato il materiale da degradare, la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con quella del lisosoma. Le idrolasi lisosomiali degradano l'interno della membrana dell'autofagosoma per formare una struttura a singola membrana chiamata autofagolisosoma, al cui interno le stesse idrolasi provvedono a degradarne il contenuto. Gli aminoacidi e altre piccole molecole derivate dalla degradazione sono poi riportate nel citoplasma per essere riciclate o per produrre energia necessaria alla cellula. L'autofagia è quindi un percorso a tappe che coinvolge una classe di geni altamente conservati, i geni ATG (*autophagy-related genes*) ed è caratterizzata da diverse fasi: induzione, nucleazione dell'autofagosoma, espansione e elongazione delle membrane dell'autofagosoma, chiusura e fusione con il lisosoma e degradazione (Levy JMM et al., 2017) (Figura 6). Protagonista della fase di induzione è il complesso ULK (*uncoordinated 51-like Kinase*), costituito dalle chinasi ULK1/ULK2, dalle proteine correlate all'autofagia ATG13 e ATG101 e dalla proteina FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 Kd*) (Hosokawa N et al., 2009; Mizushima N, 2010; Mercer CA et al., 2014; Hara T et al., 2008). In condizioni di stress come la mancanza di nutrienti, ipossia, stress ossidativo, aggregazione di proteine e stress del reticolo endoplasmatico si ha la defosforilazione delle proteine ULK1/ULK2 e la conseguente attivazione del complesso ULK che viene traslocato dal citoplasma al reticolo endoplasmatico, nei pressi di particolari strutture che rappresentano i siti di assemblaggio del fagoforo, precursore dell'autofagosoma (Mizushima N, 2010; Hosokawa N et al., 2014). A questo punto inizia la nucleazione del fagoforo che vede come protagonista PI3K di classe III che, insieme alle proteine Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) e Beclina-1, forma il complesso I che facilita il reclutamento di altre proteine ATG per regolare la fase di nucleazione e formazione

dell'autofagosoma (Hurley JH, Young LN, 2017; Dikic I, Elazar Z, 2018). La Beclina-1 ha un ruolo cruciale nella regolazione dell'autofagia, perché può attivarla o inibirla a seconda delle proteine che si legano (Zeng Y et al., 2006). Per esempio, la proteina anti-apoptotica Bcl-2 o Bcl-XL si può legare al dominio BH3 della Beclina-1, inibendo la sua interazione con Vps34 e conseguentemente l'autofagia (Pattingre S et al., 2005; Oberstein A et al., 2007; Maiuri MC et al., 2007). L'interazione con la proteina AMBRA1 (*activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy*), invece, migliora il legame tra la Beclina1 e Vsp34 e favorisce l'attivazione dell'autofagia (Fimia GM et al., 2007). La tappa successiva di allungamento e maturazione del fagoforo richiede due sistemi *Ubiquitin-like*: il primo forma un complesso multimerico, ATG12-ATG5-ATG16L, che viene reclutato sulla membrana della vescicola in formazione dalla proteina WIPI2 (He C, Klionsky DJ, 2009; Ravikumar B et al., 2010); il secondo è responsabile del clivaggio e della coniugazione di fosfatidiletanolamina (PE) alla proteina LC3-I (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), generando così LC3-II che si va ad inserire sulla superficie della membrana dell'autofagosoma (Mizushima N, Komatsu M, 2011; Kabeya Y et al., 2000). Dal momento che l'espressione di LC3-II aumenta durante l'autofagia, questo fattore è utilizzato come marcatore per lo studio del flusso autofagico (Klionsky DJ et al., 2016). LC3II interagisce con la proteina SQSTM1/p62 che ha il compito di legare le proteine da degradare e di portarle agli autofagosomi. Anche questa proteina viene degradata nel corso dell'autofagia e, in effetti, la diminuzione dei livelli di p62 è indice di attività autofagica, mentre il suo accumulo indica blocco dell'autofagia o autofagia difettiva. Il completamento della maturazione consiste nella fusione con la membrana dei lisosomi, portando alla formazione degli autofagolisosomi al cui interno gli enzimi lisosomiali provvedono a degradarne il contenuto (Shen HM, Mizushima N, 2014). Queste fasi finali sono regolate da un largo numero di fattori chiave che comprendono piccole GTPasi, Rab7 e Rab11, le proteine SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), i complessi proteici HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) che regolano la fusione e il *sorting* delle vescicole, ESCRT (*endosomal sorting complexes*

required for transport), la proteina LAMP-2 (*lysosome-associated membrane protein type 2*) associata al lisosoma e le idrolasi acide lisosomiali che includono le catepsine B, D, L (Tanaka Y et al., 2000; Jager S et al., 2004; Tanida I et al., 2005; Morel E et al., 2017). In particolare, la proteina Rab7 svolge un ruolo cruciale nel regolare la fase finale di fusione autofagosoma-lisosoma. Rab7 è una delle proteine meglio caratterizzate della famiglia Rab-GTPasi che servono come regolatori chiave nel traffico vescicolare degli eucarioti, per esempio nella formazione, maturazione e fusione delle vescicole, assicurandosi la corretta progressione dei vari eventi che prevedono un riarrangiamento di membrane, tra cui endocitosi, esocitosi e autofagia (Zhen Y, Stenmark H, 2015; Pfeffer SR, 2017). È stato dimostrato che Rab7 regola il trasporto dibirezionale sui microtubuli degli autofagosomi, i quali nella regione perinucleare della cellula si fondono con il lisosoma (Kuchitsu Y, Fukuda M, 2018).

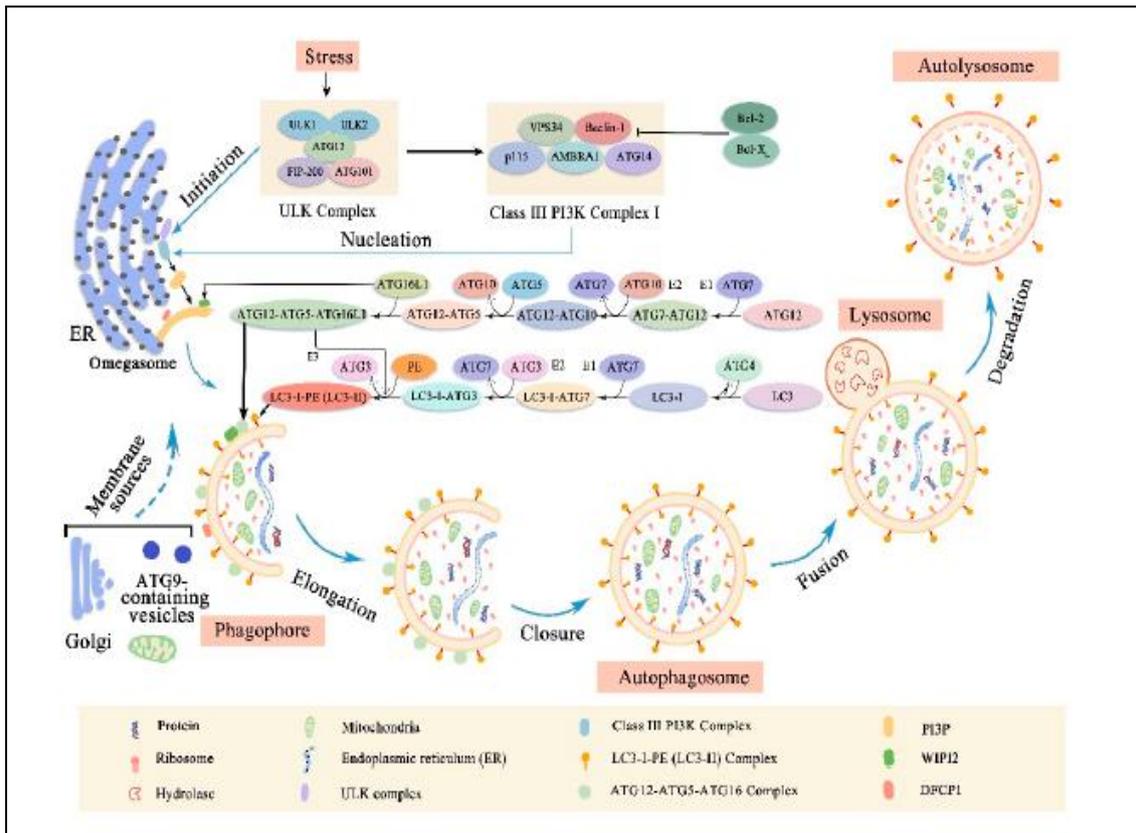


Figura 6: Meccanismo molecolare dell'autofagia. Il processo autofagico è innescato da condizioni di stress, come carenza di nutrienti, ipossia, stress ossidativo, stress del reticolo endoplasmatico. Il bersaglio comune di queste segnalazioni è il complesso ULK, costituito da ULK1/2, ATG13, FIP200 e ATG101, il quale una volta attivato, avvia la nucleazione del fagoforo fosforilando il complesso PI3K di classe I, formato da Beclina1, PIK3C3, PIK3R4/p150, AMBRA1 e ATG14/Barkor. Man mano che il fagoforo si espande, la membrana si ripiega a formare una struttura a doppia membrana chiamata autofagosoma. Il complesso ATG12-ATG5-ATG16L1 e LC3 coniugata alla fosfatidiletanolamina (PE) svolgono un ruolo importante durante la fase di elongazione e chiusura del fagoforo. Infine, gli autofagosomi si fondono con il lisosoma per formare l'autofagolisosoma al cui interno le idrolasi lisosomiali provvedono a degradare il contenuto. I prodotti risultanti dalla degradazione sono rilasciati nel citoplasma e riciclati dalla cellula (Wang H et al., 2019).

2.2.3 La regolazione dell'autofagia

L'autofagia svolge un ruolo chiave nel mantenimento dell'equilibrio energetico da parte di AMPK ed è considerata come un importante meccanismo di regolazione a valle di mTORC1. In condizioni di carenza di nutrienti si ha l'attivazione dell'autofagia che porta alla degradazione di componenti citoplasmatiche, al fine di garantire il mantenimento di un giusto bilancio energetico (Akers S et al., 2012).

AMPK permette l'inizio dell'autofagia attraverso l'attivazione indiretta di ULK1, tramite la via di AMPK/mTOR. ULK1 è un importante regolatore delle fasi iniziali dell'autofagia e mTORC1 agisce come suo regolatore negativo (Mizushima N, 2010; Hosokawa N et al., 2009).

AMPK inibisce mTORC1 sia direttamente, attraverso l'inibizione di Raptor, la subunità principale del complesso mTORC1 (Gwinn DM et al., 2008), sia indirettamente attraverso l'attivazione di TSC2, suo regolatore negativo (Inoki K et al., 2006). L'effetto combinato di queste regolazioni da parte di AMPK, permette il rilascio dell'inibizione mediata da mTORC1 su ULK1, attivando conseguentemente l'autofagia (Broer S, Broer A, 2017; Kim J et al., 2011; Inoki K, 2014) (Figura 7).

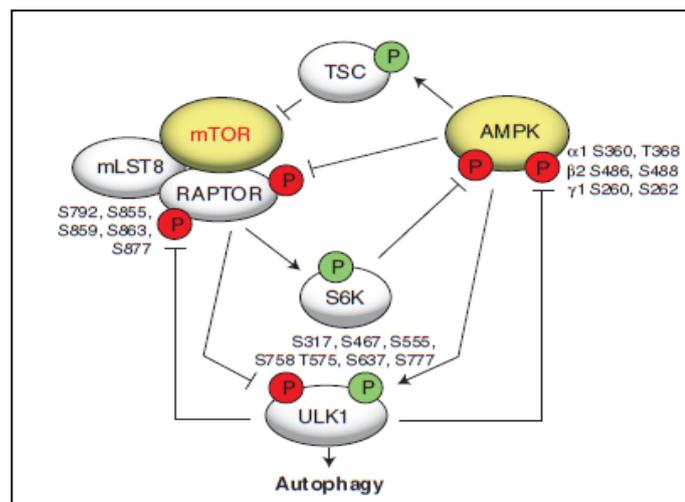


Figura 7: Cross-talk tra la via di AMPK e mTORC1 nella regolazione dell'autofagia (Hindupur SK et al., 2015).

In condizioni ricche di nutrienti e/o aminoacidi, mTORC1 inibisce le fasi iniziali dell'autofagia agendo sul complesso ULK sia direttamente che indirettamente (Kim J et al., 2011). Da un lato mTORC1 fosforila ULK1 sul residuo Ser758, prevenendo l'interazione tra ULK1 e AMPK, interazione necessaria per l'avvio dell'autofagia, e

inibendone conseguentemente l'attività. Dall'altro lato, mTORC1 fosforila direttamente ATG13, inibendo complessivamente l'attività del complesso ULK (Hosokawa N et al., 2009; Jung CH et al., 2009; Ganley IG et al., 2009) e quindi l'autofagia. Inoltre, mTORC1 può impedire l'autofagia attraverso una fosforilazione diretta di AMBRA1 che inibisce la sua funzione di attivare ULK1 e conseguentemente l'autofagia (Nazio F et al., 2013). AMBRA1 permette la nucleazione degli autofagosomi, promuovendo l'interazione tra la Beclina-1 e Vps34 e ha un ruolo chiave nello stabilizzare e nell'attivare l'attività chinastica di ULK1 (Di Bartolomeo S et al., 2010). In aggiunta, mTORC1 inibisce l'autofagia attraverso una fosforilazione diretta di ATG14 che forma il complesso I insieme a PI3K di classe III, su più residui che comprendono Ser3, Ser223, Thr233, Ser283, Ser440 (Shimobayashi M, Hall MN, 2014). La fosforilazione di ATG14 impedisce la produzione di PIP3 da parte di Vps34, fondamentale per la formazione degli autofagosomi (Yuan HX et al., 2013).

Oltre che inibire le fasi iniziali, mTORC1 può anche inibire le fasi più tardive dell'autofagia. mTORC1 può fosforilare il residuo Ser395 di WIPI2 (*tryptophan-aspartic acid (WD) repeat domain phosphoinositide-interacting proteins*). WIPI2 è una proteina critica per la fase di elongazione e chiusura delle membrane del fagoforo, recentemente identificata come substrato chiave a valle di mTORC1 per la regolazione dell'autofagia (Dooley HC et al., 2015). Questa fosforilazione porta WIPI2 a interagire in maniera specifica con HUWE1, una ubiquitina ligasi, per l'ubiquitinazione e la sua degradazione proteasomica (Wan W et al., 2018).

2.2.4 La regolazione trascrizionale dell'autofagia

I geni autofagici e della biogenesi lisosomiale sono sotto il controllo trascrizionale di un importante fattore di trascrizione, TFEB (*transcription factor EB*) (Settembre C et al., 2013), appartenente alla famiglia di fattori di trascrizione MiT (*microphthalmia family of basic helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLH-Zip) transcription factors*) che

include anche MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*), TFE3 (*transcription factor E3*) e TFEC (*transcription factor EC*). TFEB promuove la trascrizione di geni che codificano per proteine autofagiche, che inducono la biogenesi dell'autofagosoma e la fusione autofagosoma-lisosoma, e proteine necessarie per la biogenesi lisosomiale, attivando indirettamente il processo autofagico (Settembre C et al., 2011). L'analisi dei promotori di questi geni ha evidenziato una sequenza in comune, nota come motivo CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*). TFEB lega direttamente questi elementi CLEAR, promuovendo l'espressione di un'intera rete di geni che costituiscono il "*CLEAR network*" (Palmieri M et al., 2011; Sardiello M et al., 2009). In condizioni ricche di nutrienti, TFEB è principalmente citosolico e inattivo (Sardiello M et al., 2009; Settembre C et al., 2011), mentre in carenza di nutrienti TFEB si localizza principalmente nel nucleo, dove attiva la trascrizione dei suoi geni bersaglio. La localizzazione di TFEB all'interno della cellula dipende dal suo stato di fosforilazione, il quale è regolato da mTORC1 (Martena JA et al., 2012). mTORC1 fosforila direttamente i residui Ser122, Ser142 e Ser211 di TFEB che, nella forma fosforilata, resta sequestrato nel citoplasma (Settembre C et al., 2011; Settembre C et al., 2012; Roczniak-Ferguson A et al., 2012; Vega-Rubin-de Celis S et al., 2017). La fosforilazione del residuo Ser211, in particolare, serve per l'interazione con lo *chaperon* 14-3-3 che mantiene TFEB nel citoplasma, prevenendo la sua traslocazione nucleare, mascherando il segnale di localizzazione nucleare (*NLS, nuclear localization signal*) (Martena JA et al., 2012; Roczniak-Ferguson A et al., 2012). La fosforilazione dei residui Ser142 e Ser211 permette l'interazione con STUB1, una E3 ubiquitina ligasi, che porta TFEB alla degradazione proteasomica (Sha Y et al., 2017). Ciò suggerisce che lo stato di fosforilazione, oltre che determinare la localizzazione intracellulare, modula anche la stabilità di TFEB. In condizioni di stress, come per esempio la mancanza di nutrienti, mTORC1 è inattivo e non può fosforilare TFEB che, nello stato defosforilato, trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione dei geni autofagici (Settembre C et al., 2012; Roczniak-Ferguson A et al., 2012). In questo modo mTORC1 regola l'autofagia anche trascrizionalmente (Figura 8).

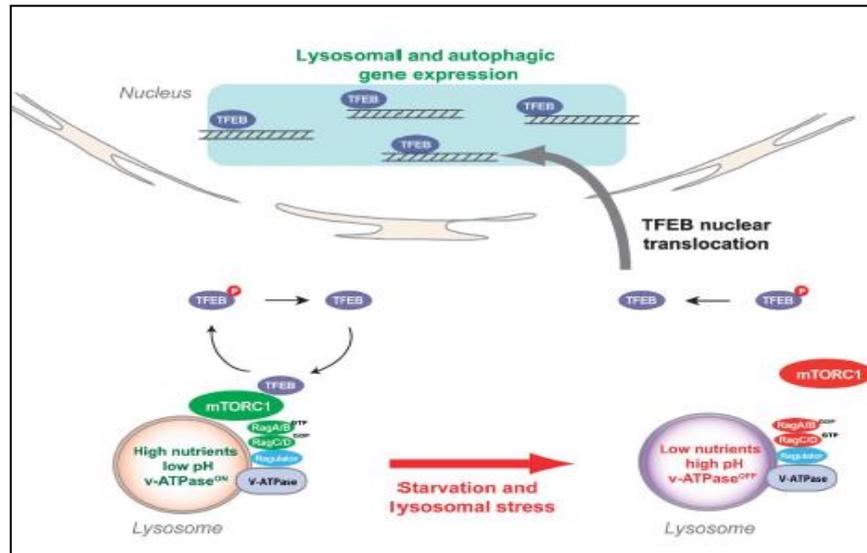


Figura 8: Rappresentazione della regolazione di TFEB mediata da mTORC1. In condizioni ricche di nutrienti e in assenza di stress il complesso costituito da v-ATPase, Ragulator e le Rag-GTPasi è in un uno stato attivo e recluta mTORC1 sulla membrana lisosomiale dove è attivato. A livello del lisosoma mTORC1 lega e fosforila TFEB, sequestrandolo nel citoplasma e prevenendo la sua traslocazione nel nucleo. In condizioni di stress mTORC1 non è più attivo. Ne consegue che TFEB, non più fosforilato, trasloca nel nucleo dove avvia il programma di trascrizione di geni sia autofagici, sia lisosomiali.

Nella defosforilazione di TFEB un ruolo chiave è giocato anche da una fosfatasi, la Calcineurina (Medina DL et al., 2015). In una condizione di carenza di nutrienti si ha il rilascio di Ca^{2+} attraverso il canale MCOLN1 (*Ca²⁺ channel mucolipin 1*). Ciò porta all'attivazione della calcineurina che, defosforilando TFEB, permette la sua traslocazione nucleare. È stato osservato che MCOLN1 stesso è bersaglio trascrizionale di TFEB, indicando l'esistenza di un feedback positivo che coinvolge TFEB e il canale ionico (Palmieri M et al., 2011).

In aggiunta a mTORC1, ERK è in grado di regolare lo stato di fosforilazione di TFEB (Settembre C et al., 2011). ERK fosforila il residuo Ser142, determinando il sequestro nel citoplasma di TFEB. Il trattamento con inibitori di ERK e/o il silenziamento di ERK portano alla sua traslocazione nucleare.

Infine, un recente studio ha dimostrato che TFEB è fosforilato anche da AKT sul residuo Ser467 e che il trattamento delle cellule con inibitori di AKT promuove la traslocazione di TFEB nel nucleo (Palmieri M et al., 2017).

In aggiunta alla regolazione attraverso la via di segnale di mTORC1, l'autofagia può essere attivata direttamente dal complesso Beclina-1/VPS34/ATG14 (Fu LL et al., 2013). Questo complesso promuove la formazione del fagoforo, precursore dell'autofagosoma, ed è esso stesso regolato da una serie di fattori, inclusa la chinasi AKT. AKT fosforila e inibisce la Beclina-1, risultando in una inibizione dell'autofagia mTORC1 indipendente (Wang RC et al., 2012). Quando attivata da fattori di crescita, AKT inibisce anche i fattori di trascrizione FOXO, inibendo conseguentemente l'attivazione trascrizionale dei geni autofagici che sono sotto il controllo di questi fattori di trascrizione. Nello specifico, in presenza d'insulina e di fattori di crescita la via di segnale di PI3K/AKT è attiva e la chinasi AKT fosforila direttamente FOXO3a, risultando in una repressione della sua attività trascrizionale perché nello stato fosforilato FOXO3a resta sequestrato nel citoplasma. In carenza di nutrienti, invece, trasloca nel nucleo dove attiva il suo programma trascrizionale, inducendo l'espressione di geni autofagici coinvolti nello sviluppo del fagoforo e formazione dell'autofagosoma, inclusi MAP1LC3B, PI3KIII, ULK2, Beclin1, ATG4b (Wang RC et al., 2012). Altre chinasi possono fosforilare FOXO in risposta a diversi stimoli, incluso AMPK (Greer EL et al., 2007), ERK e p38 MAPK (Asada S et al., 2007). ERK downregola FOXO3a fosforilando i residui Ser249, Ser344 e Ser425 e indirizzandolo alla via di degradazione dipendente dal proteasoma (Yang J et al., 2008).

In questo modo AKT media un duplice meccanismo per l'inibizione dell'autofagia: diretto attraverso l'inibizione della Beclina-1 e indiretto attraverso l'inibizione trascrizionale mediata da FOXO dei geni autofagici.

2.3 La sintesi proteica

2.3.1 La traduzione di mRNA in modo CAP-dipendente e CAP-indipendente

La sintesi proteica è un processo chiave nella regolazione dell'espressione genica che comporta un notevole dispendio energetico per la cellula. In risposta a vari stimoli, molteplici vie convergono sul macchinario traduzionale per regolarne la funzione (Roux PP, Topisirovic I, 2018). Il processo prevede la traduzione sequenziale dell'RNA messaggero (mRNA) in proteina e avviene a livello del ribosoma, il quale funziona come un ribozima per catalizzare la formazione dei legami peptidici che legano gli aminoacidi nella catena polipeptidica nascente. È convenzionalmente suddiviso in tre fasi principali: inizio della traduzione, elongazione della catena proteica, terminazione della traduzione. Ognuna delle fasi coinvolge una serie di fattori proteici, estrinseci al ribosoma, la cui regolazione è dipendente dal proprio stato di fosforilazione.

Negli eucarioti la maggior parte di mRNA è tradotta attraverso un meccanismo CAP-dipendente. Durante la trascrizione di mRNA, è aggiunta una 7-metilguanosina all'estremità 5' di pre-mRNA (*precursor messenger RNA*), nota come CAP del messaggero (Merrick WC, Pavitt GD, 2018). Questa struttura è di fondamentale importanza perché viene riconosciuta dal fattore eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*), un componente del complesso eIF4F che comprende anche eIF4A ed eIF4G, permettendo l'avvio della sintesi proteica (Parsyan A et al., 2011). eIF4A funziona come una RNA elicasi ATP-dipendente (Hinnesbusch AG, 2014), mentre eIF4G funge da impalcatura per l'interazione eIF4E-eIF4A e si associa ad altri fattori di traduzione tra cui PABP (*poly(A)-binding protein*) ed EIF3 (Hershey JW, 2015; Valasek LS et al., 2017). Il complesso eIF4F recluta il messaggero sul ribosoma tramite le interazioni tra eIF4E e il CAP e, a sua volta, facilita il reclutamento di un altro complesso necessario per l'avvio della traduzione, il complesso PIC (*43S pre-initiation complex*) che include la subunità ribosomiale 40S, i fattori d'inizio eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5, e il complesso ternario eIF2 / Met-tRNA_i (*initiator methionyl-transfer RNA*) / GTP. Una volta

assemblato sul messaggero, il complesso PIC scansiona la regione 5'UTR (5' *untranslated region*) verso la regione 3' fino a raggiungere il codone d'inizio AUG, avviando la sintesi proteica (Sonenberg N, Hinnebusch AG, 2009). In determinate condizioni, come stress cellulare o infezione virale, la traduzione CAP-dipendente è inibita (Spriggs KA et al., 2010). Ci sono, inoltre, mRNA virali che, pur non avendo un CAP all'estremità 5', sono tradotti in modo efficiente nelle cellule ospiti (Stern-Ginossar N et al., 2019). In questi casi è utilizzato un meccanismo alternativo di traduzione, CAP-indipendente, mediato dalle sequenze IRES (*internal ribosome entry site*) (Yang Y, Wang Z, 2019). Per definizione, le sequenze IRES sono elementi di RNA che reclutano i ribosomi nella regione interna di mRNA permettendo l'avvio della traduzione in maniera indipendente dal CAP. I geni che sono tradotti attraverso questo meccanismo sono solitamente coinvolti in processi biologici che si attivano in risposta a stress cellulare o infezione virale, il che implica che la traduzione CAP-indipendente gioca un ruolo chiave in tali condizioni cellulari (Komar AA, Hatzoglou M, 2011).

2.3.2 Regolazione della sintesi proteica

La traduzione è un processo altamente regolato da vie di segnalazione che si attivano in risposta a vari stimoli, compresi alterazioni ambientali (come raggi UV), stimoli extracellulari (ad esempio ormoni e/o fattori di crescita) e stimoli intracellulari (ad esempio nutrienti e/o amminoacidi) (Sonenberg N, Hinnebusch AG, 2009; Ma XM, Blenis J, 2009; Wek RC et al., 2006). Nella regolazione della traduzione è stato ben studiato il ruolo della via di PI3K/AKT. Entrambe le vie di segnalazione convergono su mTORC1 per regolare componenti del macchinario traduzionale (Figura 9). Un'alterazione di queste componenti comporta un'aberrante sintesi proteica che può contribuire a condizioni patologiche, compreso il diabete, disturbi neurologici e neoplasie (Hinnerbush AG et al., 2016). L'alterazione della traduzione è piuttosto frequente nei tumori. Oncogeni (come Myc, Ras) e soppressori tumorali (come PTEN,

TSC1/2, LKB1, p53) incidono sull'apparato traduzionale e sono stati osservati cambiamenti di espressione e/o mutazioni a carico di componenti del macchinario traduzionale (per esempio eIF, proteine ribosomiali) (Bhat M et al., 2015).

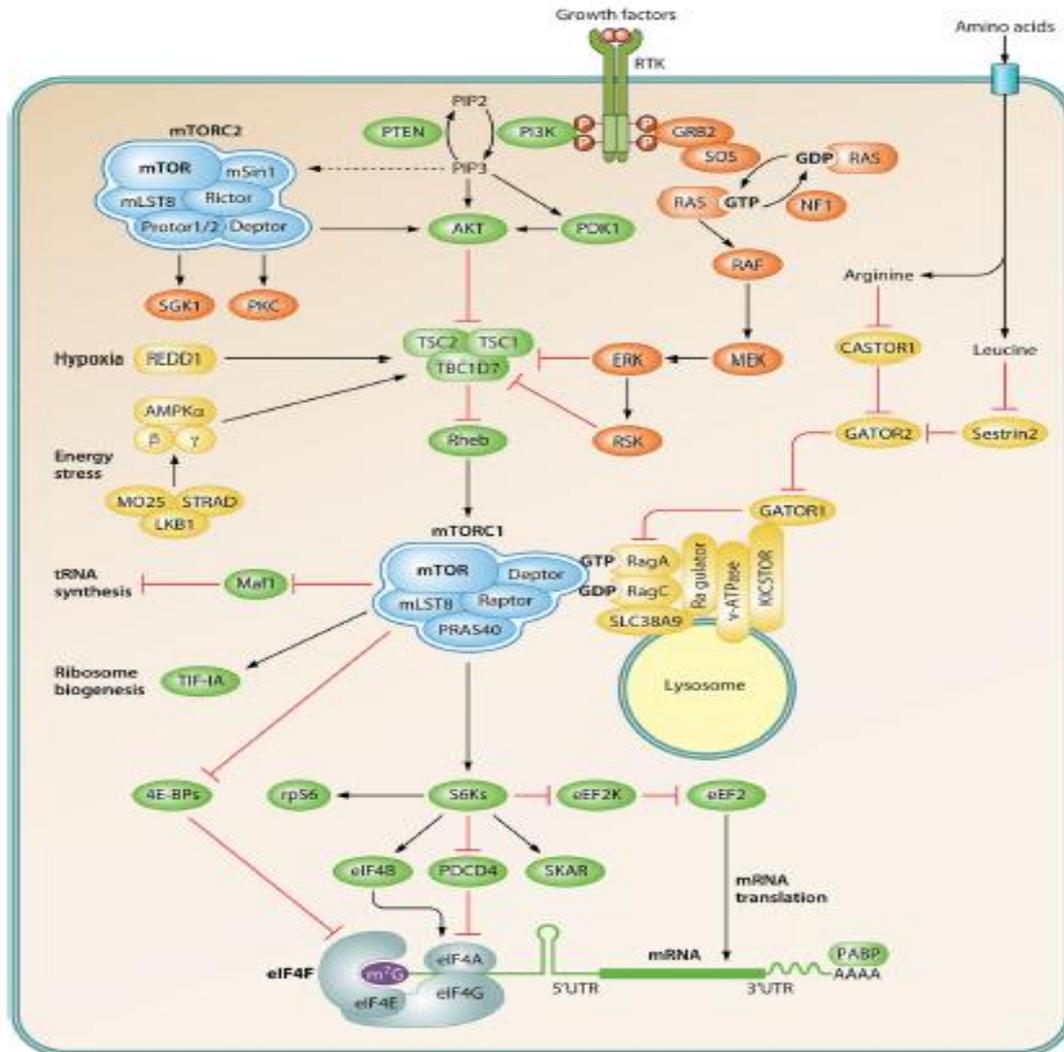


Figura 9: I fattori di crescita stimolano la segnalazione mTORC1 attraverso i recettori tirosin-chinasici. Vari adattatori proteici trasducono questi segnali extracellulari stimolando le vie di PI3K/AKT e di Ras/ERK e promuovendo l'attivazione di mTORC1. Sono inclusi glucosio e aminoacidi che tramite piccole Rag GTPasi aiutano mTORC1 a traslocare sulla superficie dei lisosomi. A loro volta, condizioni di deficit energetico e ipossia inattivano mTORC1 tramite la via LKB1/AMPK e REDD1, rispettivamente. mTORC2 risponde anche agli agonisti che stimolano la produzione di fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3) e promuove l'attività delle chinasi PKC, AKT e SGK, fosforilando i residui situati nei loro motivi idrofobici. mTORC1 modula la traduzione dell'mRNA promuovendo la fosforilazione dei substrati a valle, inclusi 4EBP1 e p70S6K. Quest'ultimo a sua volta fosforila substrati propri (ad esempio eIF4B, rpS6, PDCD4). Le frecce a T rosse rappresentano segnali inibitori, mentre le frecce nere indicano segnali stimolatori (Roux PP, Topisirovic I, 2018).

I principali mediatori di mTORC1 nel controllo della sintesi proteica sono 4EBP1 e S6K (Hay N, Sonenberg N, 2004).

4EBP1 è un repressore traduzionale in quanto impedisce l'assemblaggio del complesso eIF4F. Nella forma non fosforilata 4EBP1 lega eIF4E, mascherando il sito di legame per eIF4G e impedendo conseguentemente l'associazione eIF4E-eIF4G (Sonenberg N, Hinnebusch AG, 2009). L'attivazione di mTORC1 risulta in una fosforilazione gerarchica di 4EBP1 sui residui Thr37/46 che precede la fosforilazione sui residui Thr40 e Ser65 (Gingras AC et al., 1999), i quali risultano sensibili al trattamento con la Rapamicina. La fosforilazione di 4EBP1 mediata da mTORC1 facilita la sua dissociazione da eIF4E, consentendo l'interazione eIF4E-eIF4G e quindi la formazione del complesso eIF4F (Gingras AC et al., 2001) (Figura 10).

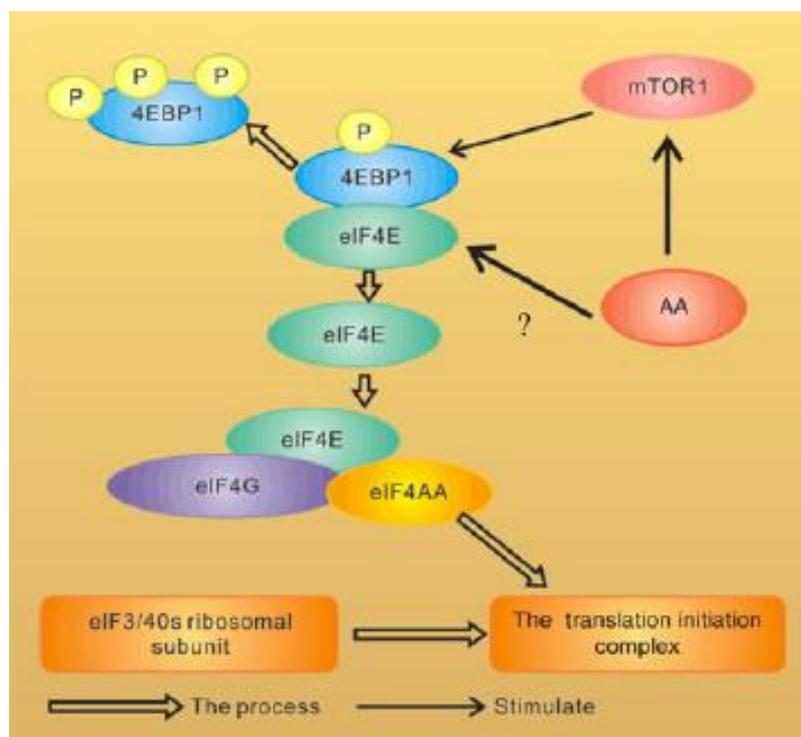


Figura 10: Regolazione dell'assemblaggio del complesso eIF4F nella via di segnalazione dipendente da mTORC1 (Cao Y et al., 2019).

Oltre a mTORC1, possono essere coinvolte altre chinasi nella fosforilazione di 4EBP1. Per esempio, ERK fosforila 4EBP1 sul residuo Ser65 (Haystead TA et al., 1994; Braunstein S et al., 2009). La serina/treonina chinasi Pim-2 fosforila 4EBP1 in diverse forme di leucemia e linfoma (Asano J et al., 2011). GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) fosforila 4EBP1 sui residui Thr37/46 (Shin S et al., 2014). CK1 ϵ (*casein Kinase 1 ϵ*) fosforila 4EBP1 sui residui Thr41 e Thr51 e la fosforilazione sembra essere necessaria per la fosforilazione dei siti regolati da mTORC1 e coincide con la dissociazione di 4EBP1 da eIF4E (Shin S et al., 2014). Infine, CDK1 (*cyclin-dependent Kinase 1*) fosforila 4EBP1 sui residui Thr70 e Ser83 durante la mitosi (Shuda M et al., 2015; Velasquez C et al., 2016). I meccanismi che governano questi percorsi alternativi di fosforilazione di 4EBP1 sono stati ancora poco caratterizzati e si conosce poco riguardo la loro rilevanza fisiologica (Roux PP, Topisirovic I, 2018). Mentre 4EBP1 media principalmente gli effetti di mTORC1 sulla proliferazione, S6K agisce come principale effettore di mTORC1 sulla dimensione cellulare (Dowling RJ et al., 2010; Ma XM, Blenis J, 2009; Zoncu R et al., 2011; Hay N, Sonenberg N, 2004). Nei mammiferi ci sono due S6K: S6K1 e S6K2, codificate rispettivamente dai geni *RPS6KB1* e *RPS6KB2* (Magnuson B et al., 2012; Fenton TR, Gout IT, 2011). Come risultato dello splicing alternativo si distinguono diverse isoforme: p70- e p85-S6K1 e p54- e p56-S6K2 (Gout I et al., 1998; Grove JR et al., 1991). È stata descritta un'ulteriore isoforma, p31-S6K1, che gioca un ruolo importante nel cancro (Tavares MR et al., 2015; Ben-Hur V et al., 2013). Per l'attivazione di S6K è necessaria la fosforilazione dei residui Thr229, all'interno del loop d'attivazione, e Thr389 nel motivo idrofobico, contenuti nell'estremità C-terminale della proteina (Fenton TR, Gout IT, 2011; Magnuson B et al., 2012). In aggiunta, GSK3 può fosforilare S6K1 nel residuo Ser371 e questa fosforilazione potrebbe contribuire all'attivazione di S6K (Shin S et al., 2011). Una volta attivo, S6K regola la fosforilazione di molteplici componenti del macchinario traduzionale (Pende M et al., 2004). In particolare, S6K fosforila eEF2K (*eukaryotic elongation factor 2 kinase*) sul residuo Ser366 (Wang X et al., 2001). eEF2K appartiene a un piccolo gruppo di proteine che contengono un dominio

caratteristico, “*α-kinase catalytic domain*” e funziona come regolatore negativo della sintesi proteica per la sua capacità di fosforilare e inibire eEF2 (Kenney JM et al., 2014), interferendo e limitando la fase di elongazione della traduzione. In presenza d’insulina o altri fattori di crescita eEF2K è inibito dall’asse mTORC1/S6K e ciò permette a eEF2 di funzionare, incrementando la velocità di elongazione della catena polipeptidica nascente (Wang X et al., 2001). Mentre il residuo Ser366 di eEF2K può essere fosforilato anche da RSK (Wang X et al., 2001), ERK fosforila eEF2K sulla Ser359 inibendo la sua attività (Wang X et al., 2014). A differenza di mTORC1 e ERK che promuovono la sintesi proteica inibendo eEF2K, AMPK, attraverso l’inibizione di mTORC1 (Inoki K et al., 2003) e la fosforilazione del residuo Ser398 di eEF2K, attiva eEF2K (Browne GJ et al., 2004), interrompendo la sintesi proteica. Ciò permette di ridurre il consumo di energia e consente di rifornire la cellula di ATP (Rose AJ et al., 2009). La comprensione delle conseguenze funzionali legate alla fosforilazione di eEF2K è ancora incompleta. Comunque, è stato dimostrato che l’inibizione di eEF2K mitiga gli effetti antineoplastici dell’inibizione di mTORC1, suggerendo una capacità tumore-soppressiva di eEF2K (Faller WJ et al., 2015).

2.3.2 La regolazione della sintesi proteica mediata da eIF2α

Molti tipi di stress cellulare portano ad una riduzione della traduzione generale. Considerando che la sintesi proteica è un processo dispendioso da un punto di vista energetico, ciò consente alla cellula di risparmiare energia e promuovere la sopravvivenza. La molecola chiave e responsabile di questo controllo traduzionale è eIF2α (*eukaryotic initiation factor 2α*), la cui fosforilazione è l’evento che causa la riduzione della traduzione (Boye E, Grallert B, 2020). eIF2α, insieme alle altre due subunità β e γ costituisce il complesso PIC (*43S pre-initiation complex*), necessario per l’inizio della traduzione, insieme a Met-tRNA_i/GTP, a cui si associano altri fattori d’inizio della traduzione (Merrick WC, Pavitt GD, 2018) (Figura 11). L’affinità di legame eIF2/Met-tRNA_i dipende dallo stato dei nucleotidi guaninici. Infatti, le

molecole interagiscono con alta affinità solo quando eIF2 è legato a GTP (Kapp LD, Lorsch JR, 2004; Jennings MD et al., 2017). L'idrolisi di GTP è mediata da eIF5 che funziona come GAP. Prima dell'inizio della traduzione eIF2 $\alpha\beta\gamma$, nella sua forma legata al GTP, guida Met-tRNAi sulla subunità ribosomiale 40S per formare il complesso PIC. Questo complesso è reclutato sul CAP del messaggero e ne scansiona il 5'UTR, fino a localizzare il codone AUG. Identificato il codone d'inizio, il GTP è idrolizzato, con conseguente formazione di eIF2-GDP che ha una bassa affinità per Met-tRNAi. In questo modo eIF2-GDP lascia il ribosoma. Solo legandosi a GTP, eIF2 può interagire nuovamente con Met-tRNAi avviando un nuovo ciclo di traduzione (Merrick WC, Pavitt GD, 2018). Ciò richiede l'attività di eIF2B che funziona come GEF (*guanine nucleotide Exchange factor*) per attivare eIF2 e facilitare l'interazione con Met-tRNAi (Jennings MD et al., 2017).

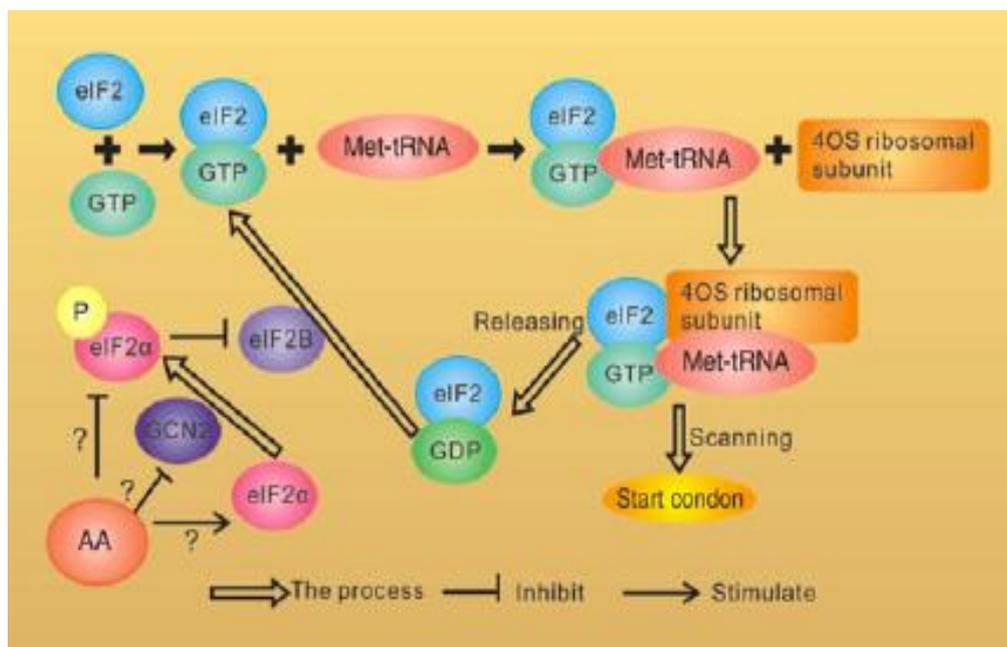


Figura 11: Regolazione dell'assemblaggio del complesso di pre-inizio della traduzione in risposta agli aminoacidi (Cao Y et al., 2019).

L'attivazione di eIF2 è altamente regolata e può essere inibita dalla fosforilazione, che converte eIF2 in un inibitore competitivo per eIF2B, diminuendo il livello di eIF2 legato al GTP (Jackson RJ et al., 2010). In risposta a un'ampia gamma di segnali, è fosforilato un singolo residuo critico, Ser51, che si trova all'interno della subunità α di eIF2 (eIF2 α) (Jennings MD et al., 2017). Dal momento che i livelli di eIF2B sono più bassi dei livelli di eIF2 all'interno della cellula, una fosforilazione parziale è sufficiente per attenuare l'inizio della sintesi proteica (Merrick WG, Pavitt GD, 2018). In questo modo la fosforilazione di eIF2 α permette di diminuire la traduzione generale ed è una risposta centrale a diverse condizioni di stress, comprese l'insufficienza di aminoacidi, la presenza di proteine non correttamente ripiegate, stress osmotico, raggi UV, infezioni virali (Jackson RJ et al., 2010).

È noto un gruppo di diverse chinasi che fosforilano eIF2 α , le quali sono attivate da distinte forme di stress. L'attivazione di queste chinasi innesca ciò che è definita "risposta integrata allo stress" (IRS, *integrated stress response*) poiché ogni risposta allo stress converge sulla fosforilazione di eIF2 α (Boye E, Grallert B, 2020). Le chinasi in questione sono le seguenti: PKR (*protein kinase R*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase*), GCN2 (*general control nonderepressible 2*) e HRI (*heme-regulated inhibitor*) (Donnelly N et al., 2013) (Figura 12). PKR è una chinasi costitutivamente espressa, che si attiva in risposta alla presenza di RNA a doppio filamento legato a infezioni virali o anche in risposta a citochine infiammatorie, stress del reticolo endoplasmatico, stress ossidativo (Nakayamana Y et al., 2010). PERK risponde allo stress del reticolo endoplasmatico in seguito all'accumulo di proteine mal ripiegate come parte integrante della UPR (*unfolded protein response*), insieme alle proteine IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*) e ATF6 (*activating transcription factor-6*) (Walter P, Ron D, 2011). GCN2 è stata originariamente identificata nel lievito come una proteina che si attiva e risponde a insufficienza di aminoacidi, sebbene sembra essere sensibile anche ad altri fattori di stress come infezione virale e raggi UV (Ishimura R et al., 2016). HRI è una chinasi che ha un ruolo importante nel bilanciare la quantità di

globina prodotta con la disponibilità di gruppi eme attraverso l'inibizione della sintesi proteica nei reticolociti in risposta a bassi livelli di eme (Bahnan W et al., 2018).

In seguito alla fosforilazione di eIF2 α se da un lato si assiste alla riduzione della traduzione generale, dall'altro lato si ha un aumento della traduzione di specifici mRNA. In particolare viene stimolata la traduzione di ATF4 (*activating transcription factor 4*) il quale, a sua volta, attiva l'espressione di geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare (Lu PD et al., 2004) (Figura 12).

La desfosforilazione di eIF2 α segnala la terminazione della IRS e il ritorno alla normale sintesi proteica (Boye E, Grallet B, 2020).

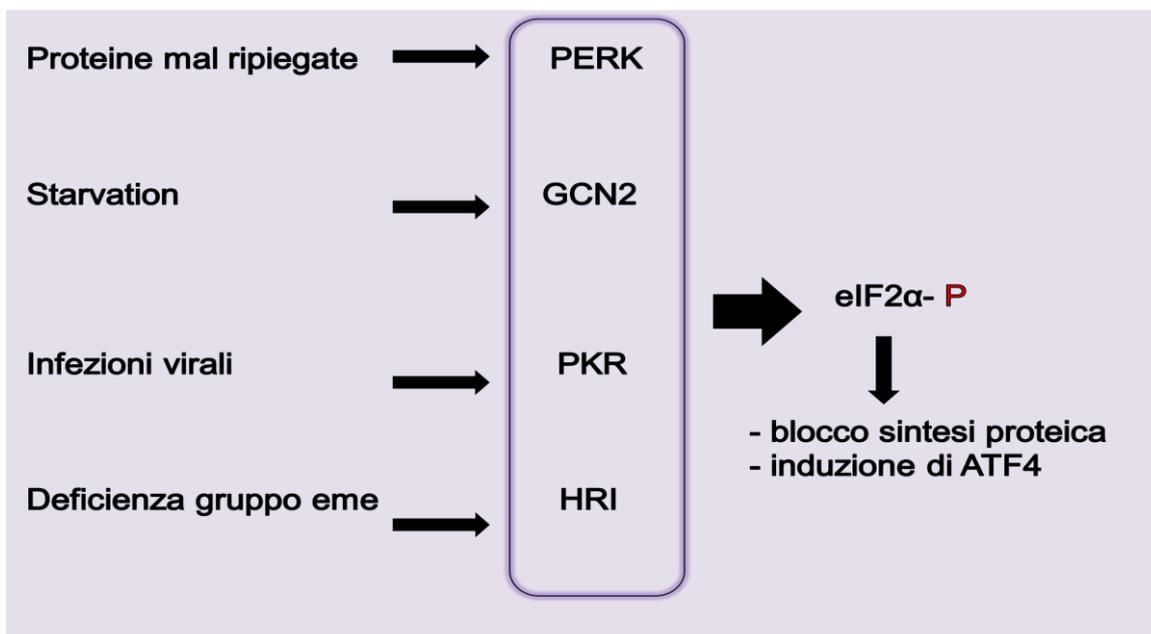


Figura 12: Risposta integrata allo stress.

3. Scopo

Le cellule tumorali sviluppano e utilizzano vie di segnale intracellulare al fine di garantirsi il mantenimento di funzioni necessarie per la loro sopravvivenza. Le proteine che preservano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare e i recettori espressi sulla superficie delle cellule possono costituire il bersaglio di nuove forme di terapia mirata. Spesso però il successo di queste terapie è vanificato da meccanismi feedback che portano ad una attivazione compensatoria di vie a monte con il risultato di indurre una resistenza alla terapia e la progressione tumorale. Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono quindi rivolte a studiare questi meccanismi con l'intento di progettare combinazioni di farmaci antitumorali, al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali. Tra le maggiori vie bersaglio vi sono la via di PI3K/AKT/mTOR e la via di Ras-Raf-MEK-ERK.

Tra i vari tipi tumorali caratterizzati da una forte alterazione di queste vie vi sono le AML, causate da una serie di mutazioni che interessano, per esempio, i TRK e i geni N-Ras e K-Ras con il risultato complessivo di una super attivazione della via di PI3K/AKT. In queste neoplasie, la trasformazione maligna e la proliferazione incontrollata di una cellula progenitrice mieloide differenziata in maniera anomala e a lunga emivita porta a elevati numeri di cellule ematiche immature circolanti e sostituzione del midollo normale da parte di cellule maligne, risultando fatale se non trattata nei tempi e nella maniera opportuna. Lo studio delle vie molecolari coinvolte nelle AML ha messo sempre più in evidenza che per controllare la progressione della patologia non è sufficiente interferire con una sola via aberrante.

In questo scenario si inserisce questo lavoro di dottorato che ha avuto lo scopo d'investigare il ruolo di ERK, AKT e mTORC1 nei meccanismi di sopravvivenza di linee leucemiche umane mieloidi acute, U937 e THP1. In secondo luogo, poiché queste molecole sono interconnesse tra loro, si sono volute studiare le loro relazioni

in condizioni d'inibizione di mTORC1, in modo da evidenziare i possibili bersagli di efficaci terapie combinate antineoplastiche.

4. Materiali e metodi

4.1 Materiali

Bafilomicina, BSA (*bovine serum albumin*), Cicloesimide, HBSS (*Hank's balanced salt solution*), L-glutamina, 3-metiladenina, Penicillina, Streptomicina, PBS (*phosphate buffered saline*), Ioduro di propidio (PI), Quercetina (Q), Wortmannina, U0126, RNAsi, RPMI-1640, Puromicina erano ottenuti da Sigma (St. Louis, MO, USA).

PF-4708671, MK2206, Rapamicina (Rap) erano ottenuti da Selleckchem (Aurogene, Roma, Italia).

FBS (*fetal bovine serum*), Lipofectamina RNAiMAX, OPTI-MEM medium (Gibco), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit e SYBR green PCR Master Mix Kit erano ottenuti da Life Technologies (Invitrogen, San Giulio Milanese, Italia).

SDS-sample buffer, standard proteici, membrana PVDF (polivinildenfluoruro), nitrocellulosa, reagenti per SDS-PAGE erano ottenuti da Bio-Rad Laboratories (Segrate, Italia).

LiteAblot TURBO era ottenuto da Euroclone (Pero, Milano, Italia).

Kit di frazionamento nuclei/citosol e tampone di lisi RIPA erano ottenuti da Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Magenta, Italia).

Gli altri reagenti erano ottenuti da Bio-Rad, Invitrogen o Sigma.

Gli anticorpi primari e secondari utilizzati nella sperimentazione sono riportati in Tabella 1.

4.2 Colture cellulari

Gli esperimenti erano condotti su due linee di cellule leucemiche monocitiche umane: U937 (Sundström C, Nilsson K, 1976) e THP1 (Tsuchiya S et al., 1980). Le cellule erano coltivate in terreno RPMI-1640 contenente 25mM NaHCO₃, 10% (v/v) FBS, 2mM L-glutamina, 100U/ml Penicillina e 100µg/ml Streptomicina, a 37°C,

5%CO₂, in atmosfera umidificata. Le cellule utilizzate negli esperimenti erano in fase di crescita esponenziale e avevano una vitalità $\geq 93\%$. La vitalità e il numero delle cellule erano valutati in un emocitometro, calcolando le cellule vive, escluse alla colorazione con Trypan Blue, come percentuale di tutte le cellule contate. Le cellule erano lavate, risospese in terreno completo, 1×10^6 /ml, trasferite in piastre da 6 o 12 pozzetti, pretrattate o non con gli inibitori o con i solventi usati per 15 minuti e quindi trattate o non con la Quercetina (Q), Rapamicina (Rap) o con i solventi. Tutti gli esperimenti erano condotti per 6 ore, mentre l'analisi della morte cellulare veniva effettuata su aliquote cellulari tenute in coltura fino a 24 ore. Il DMSO o l'etanolo usati per solubilizzare le varie sostanze testate erano $\leq 0.3\%$ (v/v) e, saggiati da soli, non modificavano alcun parametro studiato in confronto alle colture di controllo.

4.3 Analisi citofluorimetrica della morte cellulare

La frammentazione del DNA nucleare era quantificata attraverso la valutazione in citofluorimetria di eventi subG1, dopo la fissazione delle cellule in etanolo e colorazione con PI. Le cellule erano lavate con PBS e fissate con etanolo 70% (v/v) freddo per 60 minuti a 4°C. Allontanato l'etanolo, i campioni erano lavati con PBS per due volte e risospesi in PBS contenente RNAsi 20µg/ml e PI 100µg/ml. I campioni erano incubati per 15 minuti a temperatura ambiente, al buio e quindi analizzati. Gli eventi nelle diverse fasi del ciclo cellulare erano determinati manualmente, utilizzando un citofluorimetro EPICS XL (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Erano acquisiti ≥ 10000 eventi per campione. I dati raccolti erano analizzati utilizzando il programma Multicycle for DNA content and cell cycle analysis (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA). Gli eventi subG1, rappresentativi di eventi apoptotici, erano misurati come percentuale dell'intera popolazione cellulare. La permeabilità della membrana, indicativa di morte cellulare, era valutata attraverso la risospensione delle cellule in HBSS, contenente PI 20µg/ml, a temperatura ambiente

ed era analizzata mediante citofluorimetro EPICS XL, dotato di un laser 488nm ad Argon, misurando l'emissione di fluorescenza >575nm (FL3). Per ciascun campione erano valutati ≥ 10000 eventi.

4.4 Frazionamento delle proteine citosoliche e nucleari

Per il frazionamento cellulare era utilizzato un kit di frazionamento nuclei/citosol, seguendo le indicazioni del produttore. Brevemente, le cellule (2×10^6 /ml) erano lavate con PBS, risospese in 1ml di PBS freddo e centrifugate di nuovo a 4°C. I pellet cellulari erano lisati con 100 μ l di tampone per l'estrazione delle proteine citosoliche, CEB-A (*Cytosol extraction buffer A*), contenente DTT e cocktail di inibitori delle proteasi. I campioni erano vortexati per 15 secondi e incubati in ghiaccio per 10 minuti. Ciascun campione, addizionato di 5.5 μ l di tampone di lisi CEB-B (*Cytosol extraction buffer B*), era incubato in ghiaccio per 1 minuto e centrifugato a 16000g per 5 minuti a 4°C. Erano raccolti i sovranatanti, contenenti le proteine citosoliche. I pellet di ciascun campione erano ulteriormente lisati in 50 μ l di tampone per l'estrazione delle proteine nucleari, NEB (*Nuclear extraction buffer A*), contenente DTT e cocktail di inibitori delle proteasi. I campioni erano vortexati per 15 secondi e tenuti in ghiaccio per 10 minuti. Questa ultima operazione era ripetuta 4 volte. Infine i campioni erano centrifugati a 16000g per 10 minuti a 4°C. Finalmente, erano raccolti i sovranatanti contenenti le proteine nucleari.

4.5 SDS-PAGE e Western-blot

Le cellule (3×10^6 /ml), variamente trattate, erano centrifugate, lavate con PBS e risospese in 100 μ l di tampone di lisi RIPA (10mM Tris-HCl, pH8.0; 1mM EDTA; 0.5mM EGTA; 1% Triton X-100; 0.1% Sodio Desossicolato; 0.1% SDS; 140mM NaCl, 1 μ l PMSF, 1 μ l sodio-ortovanadato, 2 μ l cocktail inibitori delle proteasi). I campioni

erano mantenuti in ghiaccio, vortexati ogni 10 minuti per 3 volte e, infine, centrifugati a 13000rpm per 15 minuti a 4°C. Era raccolto il sovranatante contenente le proteine totali. Una aliquota di questi campioni era utilizzata per determinare il contenuto proteico mediante il saggio proteico BCA . Le proteine dei lisati cellulari erano riportate alla stessa concentrazione [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] e addizionate con un uguale volume di SDS sample buffer (2X). I campioni proteici così preparati erano denaturati a 95°C per 3 minuti e, caricati nei pozzetti del gel, erano separati attraverso SDS-PAGE e trasferiti su membrana PVDF o nitrocellulosa. L'efficienza del trasferimento era valutata con la colorazione della membrana con Red Ponceau. Saturata con TBS-T (*Tris-buffered saline* [20mM TRIS-HCl pH 7.5, 150mM NaCl] 0.1% Tween20) contenente proteine di latte (5% w/v), la membrana era incubata con specifici anticorpi primari, sottoposta a tre lavaggi di 15 minuti con TBS-T e incubata con appropriato anticorpo secondario, coniugato alla perossidasi. Gli anticorpi primari e secondari erano diluiti in TBS-T contenente BSA (5% w/v). In Tabella 1 sono riportate le caratteristiche degli anticorpi utilizzati. La membrana PVDF o nitrocellulosa era sottoposta a tre lavaggi di 15 minuti in TBS-T. Infine, la presenza delle proteine era sondata usando reagenti per ECL (LiteAblotTURBO) e film per ECL. Per controllare il caricamento proteico la membrana era incubata con anticorpo anti- β -Actina o anti-Tubulina. Negli esperimenti con proteine nucleari e citosoliche, la membrana era probata oltre che con l'anticorpo anti- β -Actina, anche con l'anticorpo anti-Istone H3. La densitometria delle bande era effettuata con il programma ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), usando un computer Mac OS X (Apple Computer International, Cupertino, CA, USA).

Tabella 1

Anticorpi Primari	Casa produttrice	Peso Molecolare (KDa)	Specie Isotipo	Diluizione	Tempo d'incubazione
p-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling #4370	44	Rabbit IgG	1:2000	Overnight 4°C
Erk1/2	R&D System MAB1576	44	Mouse IgG	1:500	Overnight 4°C
p-eIF2 α (Ser51)	Cell Signaling #3398	38	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
eIF2 α	Cell Signaling #9722	38	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
p-4EBP1 (Ser65)	Santa Cruz sc-293124	15/20	Mouse IgG	1:100	Overnight 4°C
4EBP1	Cell Signaling #9452	15/20	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
p-AKT (Ser473)	Cell Signaling #4060	60	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
AKT	Cell Signaling #4685	60	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
p-P70S6K (Thr389)	Cell Signaling #9234	70/85	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
p70S6K	Cell Signaling #9202	70/85	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
TFEB	Cell Signaling #4240	65/70	Rabbit IgG	1:1000	Overnight 4°C
LC3 I-II	Novus NB100-2220SS	14,17	Rabbit IgG	1:3000	90 minuti Temp. amb.
p62	BD Biosciences #610832	62	Mouse IgG	1:1000	Overnight 4°C
Puromicina (Clone 12D10)	Millipore MABE343	Multiple bande	Mouse IgG	1:25000	Overnight 4°C
β -Actina	Cell Signaling #4970	45	Rabbit IgG	1:5000	Overnight 4°C
Istone H3	Cell Signaling #4499	17	Rabbit IgG	1:4000	Overnight 4°C

Anticorpi Secondari

Rabbit-HRP	Advansta R-05072-050	Goat IgG	1:10000	60 minuti Temp. amb.
Mouse-HRP	Proteintech A00001	Goat IgG	1:5000	60 minuti Temp. amb.

4.6 SUnSET

Per valutare gli effetti dei trattamenti cellulari sulla sintesi proteica era utilizzato un saggio noto come SUnSET (*surface sensing of translation*) (Schmidt EK et al., 2009), alternativo al metodo radioattivo per lo studio della traduzione. Negli ultimi 30 minuti della sperimentazione, alle cellule era aggiunta Puromicina 10 μ g/ml. Le cellule erano lisate con tampone RIPA. La concentrazione proteica era misurata con il saggio proteico BCA. I campioni erano riportati alla stessa concentrazione proteica, denaturati a 95°C in presenza di SDS sample buffer (2X) e separati tramite SDS-PAGE. Le proteine erano trasferite su una membrana di nitrocellulosa che veniva saturata con TBS-T contenente latte (5% w/v) per 60 minuti, a temperatura ambiente. La membrana era incubata con l'anticorpo anti-Puromicina 1:25000 in TBS-T contenente latte (5% w/v), overnight a 4°C. La membrana era lavata in TBS-T per 3 volte, ciascuna volta per 15 minuti, a temperatura ambiente, e quindi era incubata con lo specifico anticorpo secondario, coniugato alla perossidasi, diluito in TBS-T contenente latte (5% w/v), per 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, la membrana era trattata con LiteAblot TURBO, per 5 minuti a temperatura ambiente e al buio, e quindi posta in contatto con film, che veniva sviluppato per visualizzare le proteine tradotte che avevano incorporato Puromicina.

4.7 Estrazione di RNA

L'estrazione di RNA era effettuata utilizzando il reagente TRIzol. Le cellule (3×10^6 /ml) erano lisate in 500 μ l di TRIzol. I campioni erano centrifugati a 13000rpm per 10 minuti a 4°C. Ai campioni lisati erano aggiunti 100 μ l di Cloroformio, quindi incubati per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i campioni erano centrifugati a 13000rpm per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione, risultavano visibili 3 fasi: una fase inferiore di colore rosastro, corrispondente al fenolo-cloroformio contenuto nel TRIzol e proteine; una interfase, corrispondente a un anello centrale di colore bianco, contenente le proteine denaturate; una fase superiore acquosa e incolore, corrispondente all'RNA totale. Veniva prelevata la fase superiore acquosa, contenente RNA. Questa, addizionata di 250 μ l di Isopropanolo, veniva incubata per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugata a 13000rpm, 10 minuti a 4°C. Rimosso il sovrantante, il pellet di RNA totale era lavato in 500 μ l di etanolo 70% (v/v) e centrifugato a 13000rpm per 5 minuti a 4°C. L'etanolo era rimosso e il pellet era lasciato asciugare a temperatura ambiente. Quindi, il pellet era risospeso in 10 μ l di H₂O e quantificato.

4.8 Retrotrascrizione RNA

Dell'RNA totale estratto veniva retrotrascritto 1 μ g, utilizzando "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit". Brevemente all'RNA era aggiunto un mix di reazione così costituito: 2 μ l di RT (*reverse transcription*) buffer 10X, 0.8 μ l di dNTP, 2 μ l di RT random primer, 1 μ l di enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 μ l di inibitore RNasi. Tutti i campioni erano portati a un volume totale di 10 μ l aggiungendo H₂O. I campioni erano inseriti nel termociclatore Eppendorf Mastercycler (Merck, Darmstadt, Germania), impostato secondo le modalità suggerite dalla casa produttrice, in modo tale da avere la massima efficienza di reazione (Tabella 2).

Tabella 2

	<i>Step1</i>	<i>Step2</i>	<i>Step3</i>	<i>Step4</i>
<i>Temperatura</i>	25°C	37°C	85°C	4°C
<i>Tempo</i>	10 minuti	120 minuti	5 minuti	∞

4.9 qRT-PCR

Per studiare l'espressione dei geni BECN1, Map1LC3b, SQSTM1/p62, ULK1, LAMP1 e β 2M (*beta-2-microglobulin*) era utilizzato SYBR green PCR Master Mix Kit. La mix di reazione era preparata seguendo le modalità indicate dalla casa produttrice: a 2 μ l di cDNA erano aggiunti 1 μ l di primer forward, 1 μ l di primer reverse, 10 μ l di SYBR green qPCR Master Mix e H₂O fino a raggiungere un volume finale di 20 μ l. Le condizioni di amplificazione prevedevano: denaturazione a 95°C per 15 minuti, 40 cicli di amplificazione seguiti da denaturazione a 95°C per 10 secondi, annealing a 60°C per 20 secondi e elongazione a 72°C per 30 secondi. Per l'analisi quantitativa veniva calcolato il ciclo della reazione di amplificazione (Ct) in cui il segnale di fluorescenza del campione era maggiore rispetto a quello della "Threshold" (software SDS versione 2.3 Life Technologies, Warrington, UK). Successivamente si otteneva il Δ Ct relativo alla quantizzazione del trascritto in esame (es. Δ Ct_{BECN1} = Ct_{BECN1} - Ct _{β 2M} di ogni campione). Quindi, veniva calcolato il $\Delta\Delta$ Ct relativo alla comparazione del Δ Ct del campione trattato con il Δ Ct del controllo che non aveva ricevuto alcun trattamento, secondo la seguente formula: (Δ Ct_{CAMPIONE} - Δ Ct_{CONTROLLO}). Infine, i valori erano convertiti con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, determinando l'espressione relativa del gene d'interesse nel campione con il trattamento rispetto al controllo. Le sequenze dei primer utilizzate nella reazione sono riportate nella Tabella 3.

Tabella 3

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>
BECN1	for: TGGACACGAGTTTCAAGATCC rev: CTCCTGGGTCTCTCCTGGTT
Map1LC3b	for: GAGAAGACCTTCAAGCAGCG rev: AAGCTGCTTCTCACCTTGT
SQTM1/p62	for: CCCGTCTACAGGTGAACTCC rev: CTGGGAGAGGGACTCAATCA
LAMP1	for: ACTACGACACCAAGAGTGGC rev: AAGCAATCACGAGACTGGGG
ULK1	for: TGAAAACATCGTGGCCCTGT rev: CCGTTGCAGTACTCCATAACC
β2M	for: CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT rev: CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA

4.10 Analisi statistica

I risultati erano espressi come Media \pm DS di esperimenti ripetuti. Le differenze statistiche erano valutate applicando il t-test di Student. Venivano considerate significative le differenze con $P \leq 0.05$.

5. Risultati

5.1 L'inibizione di mTORC1/P70S6K causa l'attivazione di ERK

mTORC1 rappresenta una delle principali vie di segnalazione nelle AML (Ghosh J, Kapur R, 2017). Tuttavia, è stato riportato che mTORC1 inibisce ERK attraverso P70S6K in diversi tumori (Carracedo A et al., 2008). Appariva, quindi, interessante investigare il legame tra mTORC1 e ERK nelle AML. A tal fine nelle cellule U937 e THP1 abbiamo valutato la fosforilazione di ERK nei residui Thr202/Tyr204 e dei substrati di mTORC1, 4EBP1 nel residuo Ser65 e P70S6K nel residuo Thr389. ERK, 4EBP1 e p70S6K risultavano costitutivamente attivi (Figura 13 A, B). In entrambe le linee cellulari venivano utilizzati due inibitori di mTORC1, la Rapamicina (Rap) 0.1 μ M per le cellule U937 e 0.5 μ M per le cellule THP1, e la Quercetina (Q) 10 μ M per le cellule U937 e 50 μ M per le cellule THP1, poiché queste concentrazioni causavano aumento della fosforilazione di ERK, inibizione di P70S6K e parziale inibizione di 4EBP1 (Figura 13 A, B). Le differenze osservate di ERK, P70S6K e 4EBP1 erano nei livelli di fosforilazione, mentre la quantità totale di ciascuna proteina non risultava modificata dal trattamento con Rap o Q (Figura 13 A, B). Per determinare il ruolo di mTORC1/P70S6K nella regolazione di ERK abbiamo inibito selettivamente P70S6K con PF-4708671 (Pearce LR et al., 2010). Questo inibitore rafforzava l'attivazione di ERK causata da Rap o Q (Figura 13 C). Inoltre, il pretrattamento delle cellule con Wortmannina, un inibitore di PI3K, non permetteva l'attivazione di ERK dopo trattamento delle cellule con Rap o Q (Figura 13 D).

Questi risultati indicano che mTORC1, attraverso P70S6K, impone un feedback negativo sulla via di PI3K/ERK nelle cellule U937 e THP1 e che l'inibizione di mTORC1/P70S6K limita questo feedback.

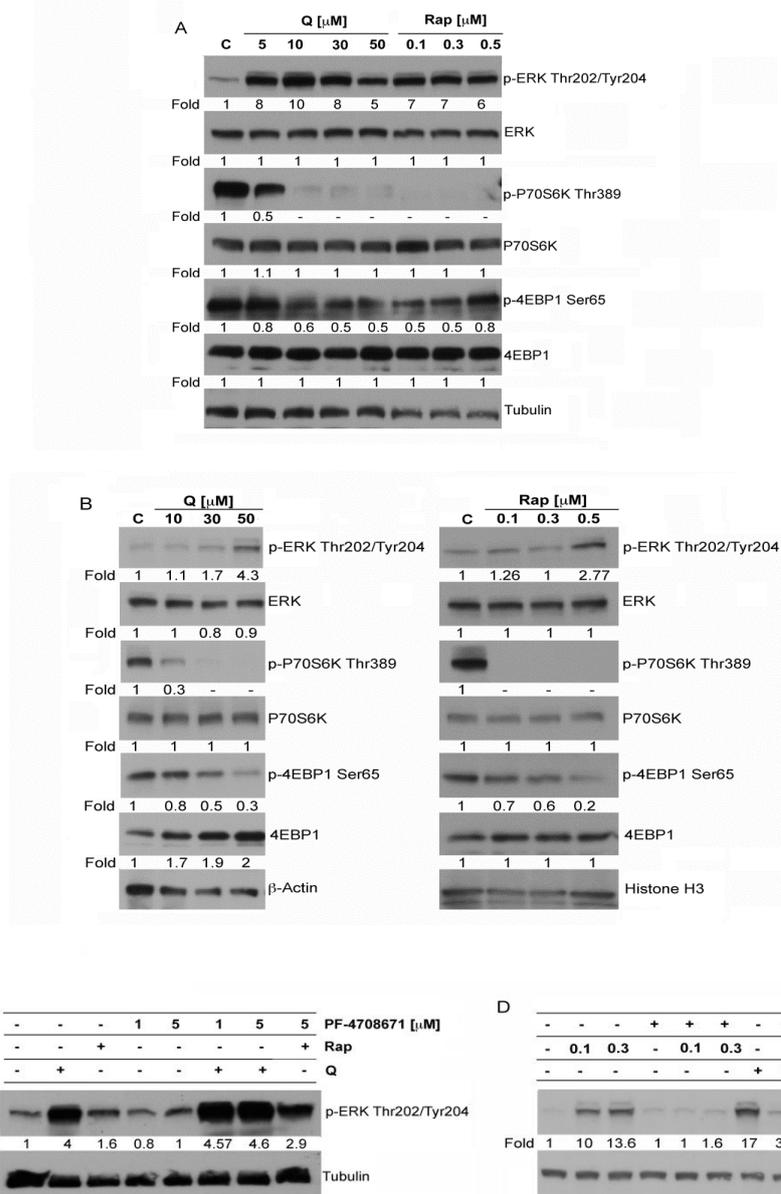


Figura 13: ERK è attivata nelle AML a seguito della inibizione di mTORC1 e di P70S6K. A, B) Analisi in Western-blot del livello di fosforilazione e del livello totale di ERK, P70S6K, 4EBP1 in cellule U937 (A) e THP1 (B) trattate o non con le indicate concentrazioni di Q o Rap. I risultati in A e in B sono rappresentativi, rispettivamente, di 4 e di 2 esperimenti indipendenti. **C)** Analisi in Western-blot di p-ERK in lisati di cellule U937 pretrattate o non con PF-4708671 (1 μ M o 5 μ M) per 15 minuti e, quindi, trattate o non con Q 10 μ M o Rap 0.1 μ M. Il blot è rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti. **D)** Analisi in Western-blot di p-ERK in lisati di cellule U937 pretrattate o non per 15 minuti con Wortmannina 10 μ M e, quindi, trattate o non con Q 10 μ M o Rap 0.1 μ M per 6 ore. Il blot è rappresentativo di 2 esperimenti indipendenti. I livelli di Tubulina, β -Actina o Istone H3 sono mostrati come controllo delle uniformità del caricamento di proteine. Ciascuna proteina era rilevata con anticorpo specifico seguito da anticorpo coniugato a perossidasi. I valori sotto ciascuna banda erano ottenuti usando la seguente formula: (valore densitometrico della banda esaminata / valore densitometrico della banda del prodotto di un gene "housekeeping" nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda esaminata nel lisato delle cellule non trattate / valore densitometrico della banda di un gene "housekeeping" nel lisato di cellule non trattate).

5.2 ERK, sottratta dal loop inibitorio mTORC1-dipendente, mantiene l'omeostasi della via di mTORC1

Successivamente abbiamo esaminato l'effetto di ERK, sottratta dal loop inibitorio dipendente da mTORC1, su mTORC1 stesso e abbiamo osservato che questa MAPK limitava in parte l'inibizione di mTORC1 nelle cellule U937 o THP1 trattate con Rap o Q. Infatti, l'inibizione farmacologica di ERK con U0126 (20 μ M, 15 minuti di pretrattamento) causava una moderata diminuzione della fosforilazione costitutiva di P70S6K e 4EBP1 e una maggiore inibizione di tali substrati, quando combinata con Rap o Q (Figura 14 A, B, C, D). Questi risultati indicano che ERK, sottratta dal loop inibitorio dipendente da mTORC1, regola positivamente l'attività di mTORC1.

ERK e mTORC1 sono molecole cruciali nella segnalazione per la crescita e sopravvivenza cellulare (Kim J, Guan KL, 2019; Simanshu DK et al., 2017). Pertanto, abbiamo investigato il loro ruolo anche nelle cellule AML in cui ERK era sottratta dal loop inibitorio dipendente da mTORC1. A tal fine abbiamo valutato due parametri di morte cellulare dopo 24 ore di trattamenti cellulari: eventi subG1, indicativi di morte apoptotica e presenza di cellule che incorporano PI (PI+). La Rap o Q risultavano scarsamente citotossiche (Figura 15 A, B). In particolare, rispetto alle cellule U937 non trattate, la Q causava un moderato aumento delle cellule PI+ (21 \pm 2.08% v/s 9 \pm 3.6%), oltre all'aumento degli eventi subG1 (33 \pm 5.8% v/s 10 \pm 3.6%) (Figura 15 A, B). L'inibizione farmacologica di ERK con U0126 nelle cellule U937 risultava scarsamente citotossica (10.6 \pm 5.7% cellule PI+ e 20 \pm 4.7% eventi subG1), ma aumentava la citotossicità causata dalla Q (29 \pm 6.8% cellule PI+ e 43 \pm 2.5% eventi subG1) (Figura 15 A, B). La Rap causava 10.3 \pm 4.5 di cellule PI+ e 17.7 \pm 6.4 di eventi subG1 e l'inibizione di ERK ne aumentava la citotossicità soprattutto in termini di eventi subG1 (30 \pm 5%) (Figura 15 A, B). Pertanto, ERK, sottratta dal loop inibitorio di mTORC1, protegge mTORC1 da un'eccessiva inibizione e svolge un ruolo pro-sopravvivenza.

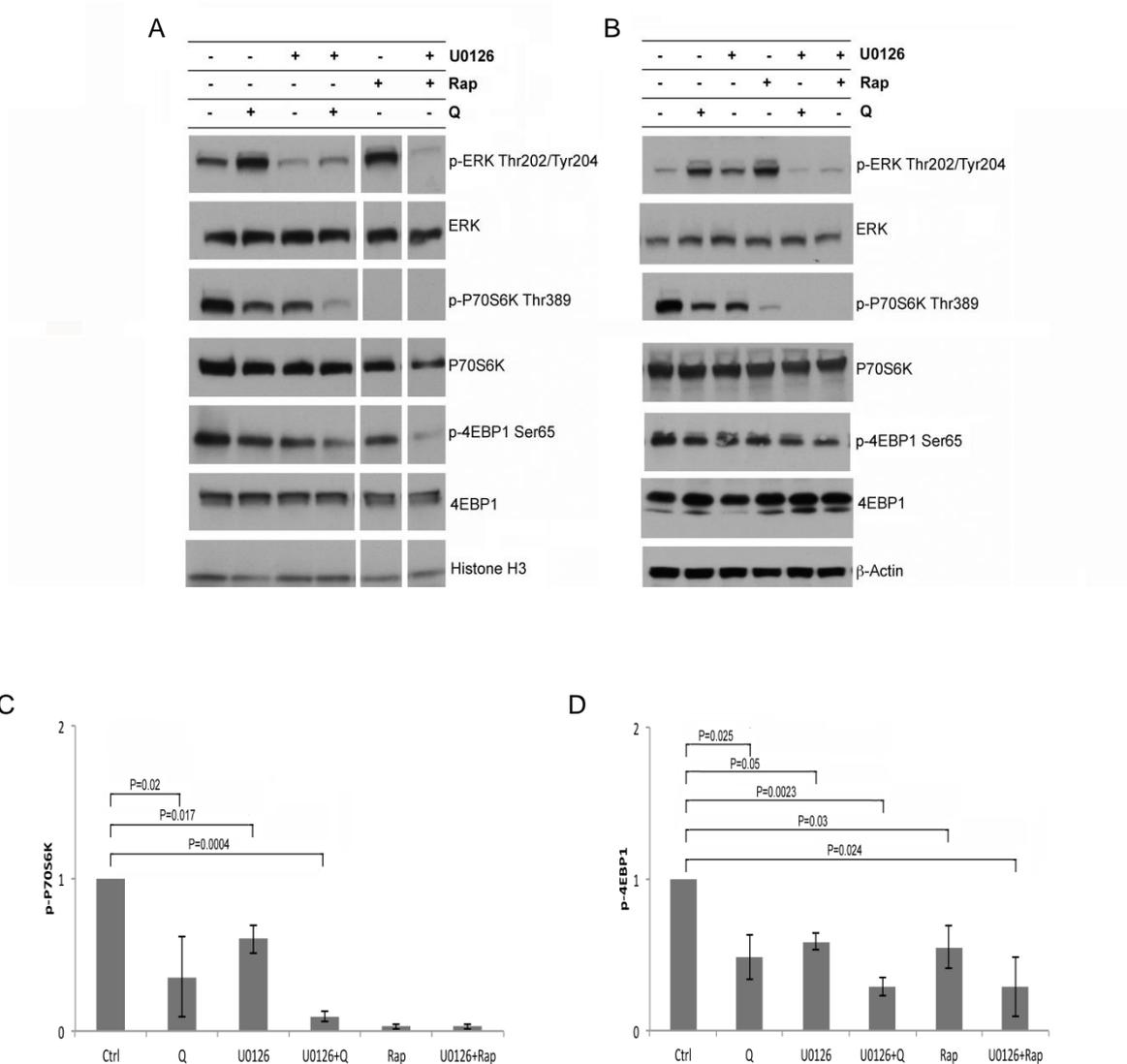


Figura 14: ERK limita l’inibizione di mTORC1. **A, B)** Analisi in Western-blot di lisati di cellule U937 (A) e di cellule THP1 (B) pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non con Q o Rap per 6 ore. Le proteine blottate erano incubate con gli anticorpi anti-p-ERK Thr202/Tyr204, anti-ERK, anti-p-P70S6K Thr389, anti-P70S6K, anti-p-4EBP1 Ser65 e anti-4EBP1, seguiti da anticorpi secondari coniugati a perossidasi (A, B). I livelli dell’Istone H3 e della β-Actina erano analizzati per la valutazione della uniformità del caricamento proteico (A,B). **C, D)** Analisi densitometrica di p-P70S6K (C) e di p-4EBP1 (D) in lisati di cellule U937 pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non con Q 10µM o Rap 0.1µM per 6 ore. I valori riportati negli istogrammi rappresentano la Media±DS dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti, usando la formula: (valore densitometrico della banda esaminata / valore densitometrico della banda del prodotto di un gene “housekeeping” nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda esaminata nel lisato delle cellule non trattate / valore densitometrico della banda del prodotto di un gene “housekeeping” nel lisato delle cellule non trattate). La significatività (P) dei risultati, calcolata con il t-test di Student è riportata in figura.

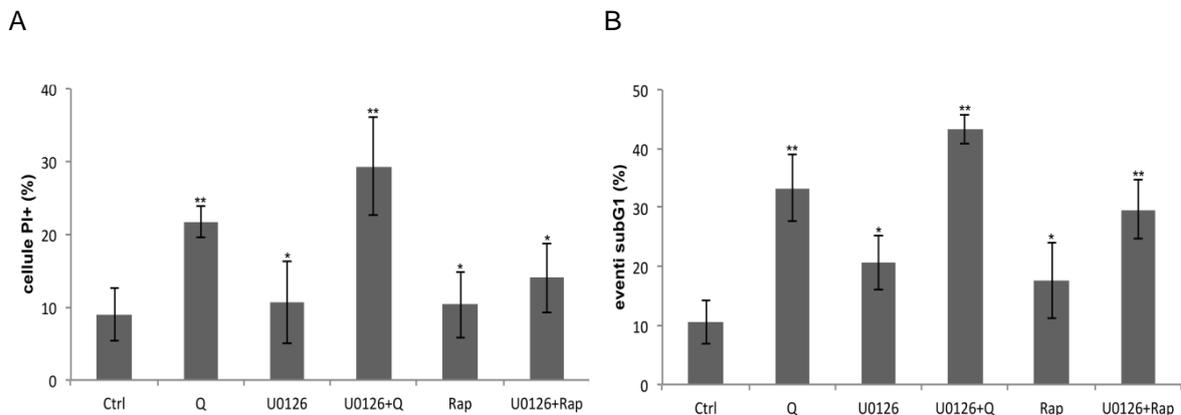


Figura 15: ERK contribuisce alla sopravvivenza cellulare. L'analisi della morte cellulare era effettuata in cellule U937, calcolando mediante citofluorimetria la percentuale di cellule che incorporavano Ioduro di Propidio (A) e la percentuale di eventi subG1 nel ciclo cellulare (B). Per ciascun parametro esaminato erano acquisiti ≥ 10000 eventi per campione. I valori riportati rappresentano la Media \pm DS (n=3). L'analisi statistica mediante t-test di Student è mostrata in figura (* $P \geq 0.05$, ** $P < 0.01$). In questi esperimenti le cellule erano pretrattate o non con U0126 (20 μ M, per 15 minuti) e, quindi, trattate o non per 24 ore con Q 10 μ M o Rap 0.1 μ M.

5.3 ERK contrasta l'inibizione dell'autofagia indotta da Q o Rap

L'autofagia è un importante processo cellulare che opera in modo costitutivo, mediante il quale le cellule degradano componenti danneggiate, assicurandosi il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Yu L et al., 2018). Tuttavia, un flusso autofagico eccessivo o difettoso può causare morte cellulare. È noto che l'inibizione di mTORC1 attiva il flusso autofagico (Wang H et al., 2019; Broer S, Broer A, 2017; Kim J et al., 2011; Inoki K, 2014). Per indagare l'autofagia abbiamo analizzato i livelli di LC3-II mediante Western-blot in cellule pretrattate o meno con U0126 e, successivamente, trattate o meno con Q o Rap per 6 ore. Le cellule erano trattate anche con Bafilomicina A1 (Baf, 10 μ M) nelle ultime 3 ore della sperimentazione, al fine di bloccarne le fasi degradative e, di conseguenza, consentire l'accumulo di LC3-II (Klionsky DJ et al., 2016). La quantità di LC3-II nelle cellule U937 non trattate (x1)

era ridotta dopo trattamento con Q (x0.5); tuttavia, Baf consentiva un accumulo maggiore nelle cellule di controllo (x4) rispetto alle cellule trattate con Q (x3) (Figura 16 A). Rispetto alle cellule non trattate, U0126 riduceva in parte l'espressione di LC3-II (x0.7), anche quando il flusso autofagico era bloccato con Baf (x3.7). Il trattamento combinato con U0126+Q confermava la parziale riduzione di LC3-II (x0.7), mentre Baf rivelava che questo doppio trattamento causava una maggiore riduzione dell'accumulo di LC3-II (x2.6) (Figura 16 A). Risultati simili erano ottenuti con Rap (Figura 16 B). Inoltre, abbiamo analizzato la quantità di SQSTM1/p62 mediante Western-blot, poiché la diminuzione di questa proteina, essendo degradata nelle fasi finali dell'autofagia, rappresenta una chiave di lettura del flusso autofagico e abbiamo osservato che la quantità di SQSTM1/p62, rispetto alle cellule U937 non trattate (x1), non era apparentemente influenzata da Q (x1) o da U0126 (x1), mentre era aumentata dal doppio trattamento con U0126+Q (x1.3), dalla Rap (x1.3) e da U0126+Rap (x1.3) (Figura 16 C). Il flusso autofagico era esaminato anche nelle cellule THP1 sottoposte agli stessi trattamenti delle cellule U937, prima descritti, e i risultati ottenuti erano sovrapponibili (Figura 16 D, E, F).

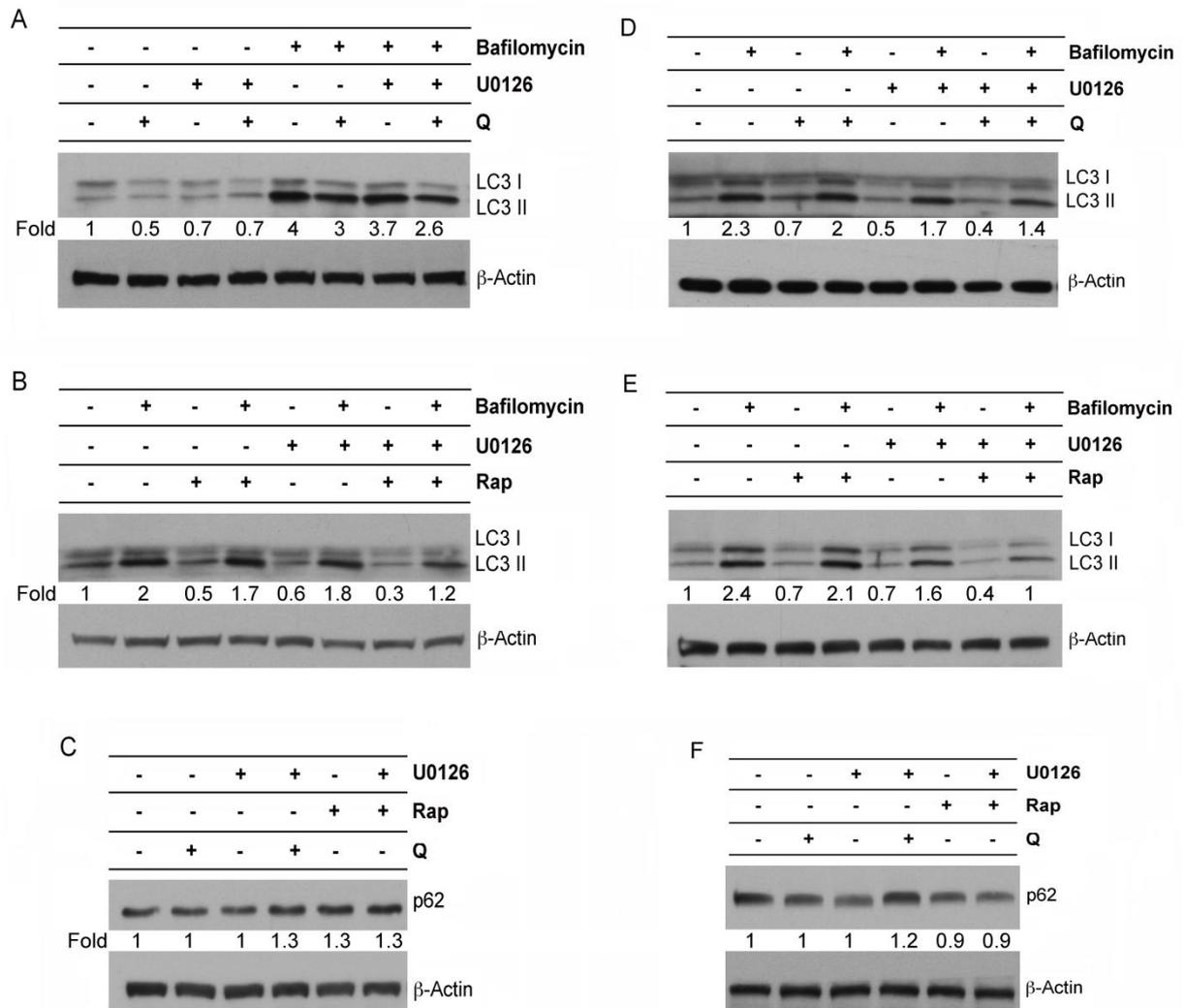


Figura 16: ERK contrasta l'inibizione dell'autofagia indotta da Q o Rap. **A, B)** Analisi in Western-blot di LC3-II in lisati di cellule U937 pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non con Q 10µM (A) o con Rap 0.1µM (B) per 6 ore. Gli stessi campioni erano trattati anche nelle ultime 3 ore con Baf 10µM (A, B). **C)** Analisi in Western-blot di p62 in lisati di cellule U937 pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non con Q 10µM o Rap 0.1µM per 6 ore. **D, E)** Analisi in Western-blot di LC3-II in lisati di cellule THP1 pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non con Q 50µM (D) o Rap 0.5 µM (E) per 6 ore. Gli stessi campioni erano trattati anche nelle ultime 3 ore con Baf 10µM (D, E). **F)** Analisi in Western-blot di p62 in lisati di cellule THP1 pretrattate o non con U0126 (20µM, per 15 minuti) e quindi trattate o non per 6 ore con Q 50µM o Rap 0.5µM. Le proteine blottate erano incubate con gli anticorpi anti-LC3-II o anti-p62, seguiti da anticorpi secondari coniugati alla perossidasi. I livelli densitometrici della β-Actina erano analizzati per la valutazione della uniformità del caricamento delle proteine (A-F). I valori sotto ciascuna banda erano ottenuti usando la seguente formula: (valore della densitometria della banda esaminata / valore densitometrico della banda della β-Actina nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda esaminata nel lisato delle cellule non trattate / valore densitometrico della β-Actina nel lisato delle cellule non trattate). I blot mostrati sono rappresentativi di 3 e di 2 esperimenti indipendenti, rispettivamente con le cellule U937 e con le cellule THP1.

5.4 La diminuzione del flusso autofagico non è causata dall'inibizione trascrizionale di geni autofagici

TFEB è un importante fattore di trascrizione che coordina la trascrizione di una rete genica che regola la formazione di autofagosomi, la fusione autofagosoma-lisosoma e la funzione e la biogenesi dei lisosomi (Settembre C et al., 2013; Settembre C et al., 2011; Martena J et al., 2012; Vega-Rubin-de Celis S et al., 2017). Quando non fosforilato, TFEB migra nel nucleo e consente l'espressione di geni autofagici e lisosomiali. La fosforilazione di TFEB, e quindi la localizzazione subcellulare, è sotto il controllo di mTORC1 e ERK. Rap e in modo simile Q, attraverso l'inibizione di mTORC1 e l'attivazione di ERK, potrebbero svolgere un ruolo doppio e opposto su TFEB. Pertanto, veniva indagata la compartimentalizzazione di TFEB nelle cellule U937 pretrattate o meno con U0126 e successivamente trattate o meno con Q. Rispetto alle cellule di controllo, i diversi trattamenti cellulari modificavano scarsamente la quantità di TFEB nei nuclei o nel citoplasma (Figura 17). Questi risultati suggerivano che la diminuzione osservata del flusso autofagico non era dipendente dalla trascrizione dei geni autofagici mediata da TFEB. Tuttavia, poiché potrebbero essere coinvolti altri fattori di trascrizione, abbiamo eseguito la qRT-PCR dei trascritti di alcuni geni autofagici, utilizzando mRNA estratto da cellule U937. Rispetto alle cellule non trattate, Q, U0126 o U0126+Q causavano una leggera diminuzione dei trascritti di LAMP1 e di SQSTM1/p62, mentre non modificavano la trascrizione di Beclina (BECN1), Map1LC3b o ULK1 (Figura 18). Pertanto, il rallentamento del flusso autofagico non era dovuto alla diminuzione della trascrizione dei geni autofagici né nelle cellule trattate con Q, in cui mTORC1 era parzialmente inibito ed ERK era attivata, né nelle cellule con ERK inibita e con i substrati di mTORC1 maggiormente inibiti, come si verificava dopo il trattamento cellulare con U0126+Q.

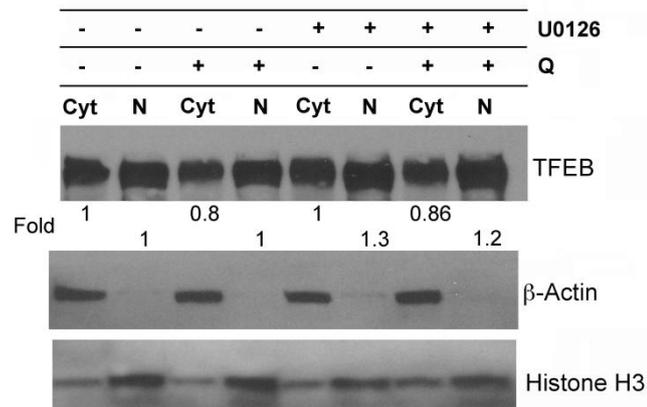


Figura 17: La compartimentalizzazione Nuclei/Citosol di TFEB è scarsamente influenzata da ERK. Analisi in Western-blot di lisati citosolici e nucleari di cellule U937 pretrattate e non con U0126 (20 μ M, per 15 minuti) e trattate o non per 6 ore con Q 10 μ M. Le proteine blottate erano sondate con mAb anti-TFEB, seguito da anticorpi secondari perossidasi coniugati. I valori sotto ciascuna banda relativa ai lisati citosolici erano ottenuti usando la seguente formula: (valore densitometrico della banda esaminata / valore densitometrico della banda della β -Actina nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda esaminata nel lisato citosolico delle cellule non trattate / valore densitometrico della β -Actina nel lisato citosolico delle cellule non trattate). Nel caso dei valori sotto ciascuna banda relativa ai lisati nucleari veniva utilizzata la precedente formula sostituendo il valore densitometrico della β -Actina con quello dell'Istone H3. I risultati mostrati sono relativi a un esperimento di 3 effettuati, con simili risultati.

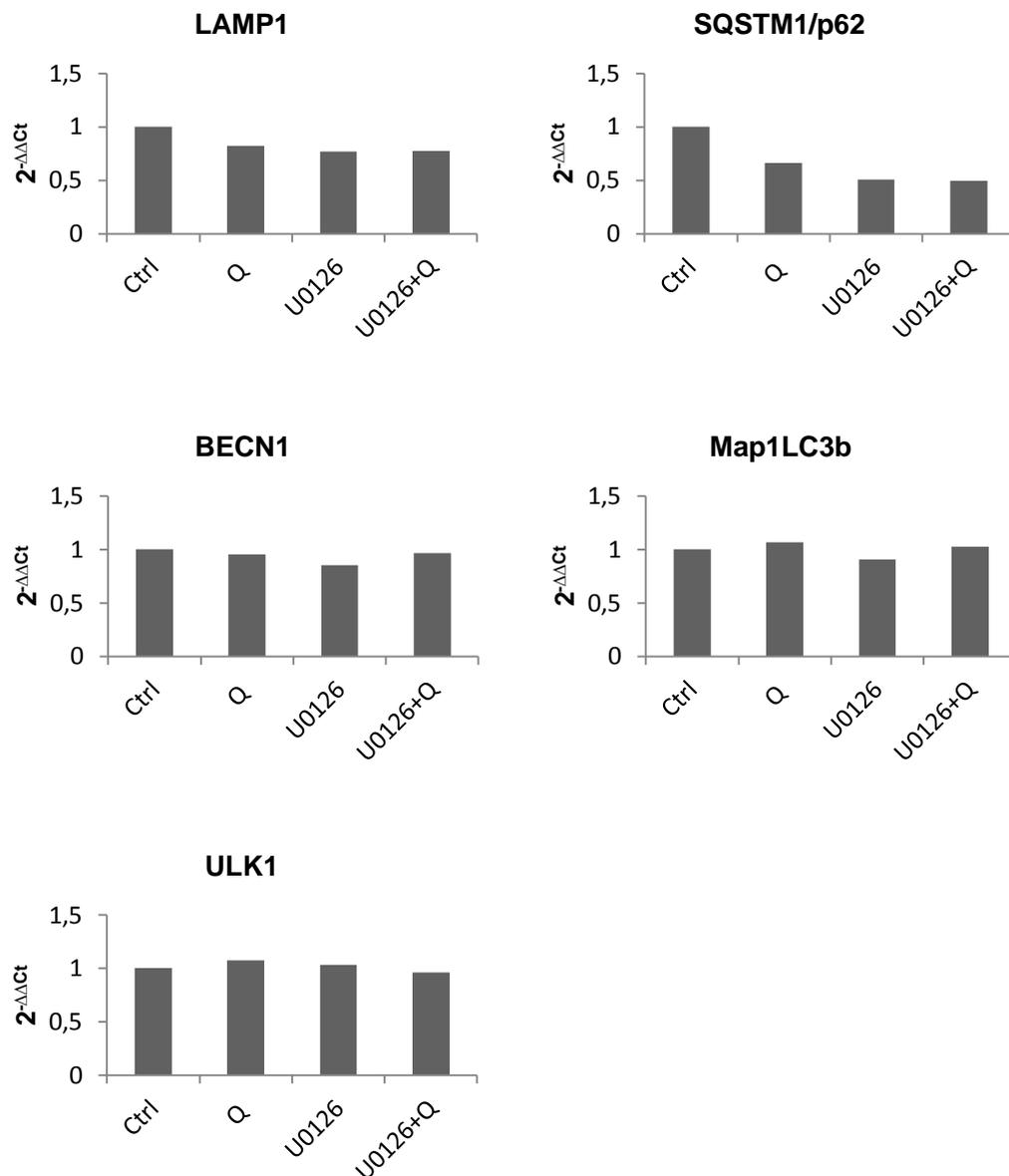


Figura 18: La trascrizione di geni autofagici è scarsamente influenzata da ERK. Analisi dell'espressione dei geni autofagici BECN1, SQSTM1/p62, Map1LC3b, ULK1 e di LAMP1 utilizzando mRNA estratto da cellule U937 pretrattate o non con U0126 (20 μ M, per 15 minuti) e trattate o non per 6 ore con Q 10 μ M. La normalizzazione dell'espressione era condotta utilizzando il trascritto del gene "housekeeping" β 2M (beta-2-microglobulina), mentre l'espressione relativa di ciascun gene era determinata attraverso il calcolo del $\Delta\Delta C_t$ secondo la formula indicata in Materiali e Metodi.

5.5 L'attivazione di ERK contrasta l'inibizione della sintesi proteica

I risultati prima mostrati suggerivano che la riduzione del flusso autofagico non era a livello trascrizionale, ma che la osservata defosforilazione dei substrati di mTORC1, 4EBP1 e P70S6K, causava l'inibizione dell'espressione proteica a livello traduzionale. Non solo 4EBP1 defosforilato (Roux PP, Topisirovic, 2018), ma anche eIF2 α , quando fosforilato nel residuo Ser51, provoca il blocco della sintesi proteica (Boye E, Grallert B, 2020). Pertanto, abbiamo esplorato la fosforilazione di questa chinasi nelle cellule U937 e THP1 e abbiamo osservato che U0126 causava la sua fosforilazione nel residuo Ser51 e che tale fosforilazione risultava ancora maggiore dopo trattamento cellulare con U0126+Rap o U0126+Q (Figura 19 A, B, C). Quindi, abbiamo esaminato la sintesi proteica mediante Western-blot di estratti proteici di cellule pretrattate o meno con U0126 e successivamente trattate con o senza Rap o Q e tutte trattate, negli ultimi 30 minuti della sperimentazione, con Puromicina. La Puromicina è un analogo strutturale dell'aminoacil-tRNA che viene incorporato nelle catene polipeptidiche nascenti causandone la terminazione prematura (Schmidt EK et al., 2009). La sua incorporazione nelle proteine di nuova sintesi può essere rilevata in Western-blot utilizzando anticorpi anti-Puromicina. Rispetto alle cellule non trattate, Rap, Q o U0126 causavano diminuzione della sintesi proteica, mentre i trattamenti cellulari combinati, U0126+Rap o U0126+Q, risultavano ancora più efficaci (Figura 20 A, B). Questi risultati mostrano che la parziale inibizione di mTORC1 porta ad una diminuzione della sintesi proteica limitata dall'attivazione di ERK, in quanto questa MAPK contrasta non solo l'inibizione di 4EBP1 ma anche l'attivazione di eIF2 α .

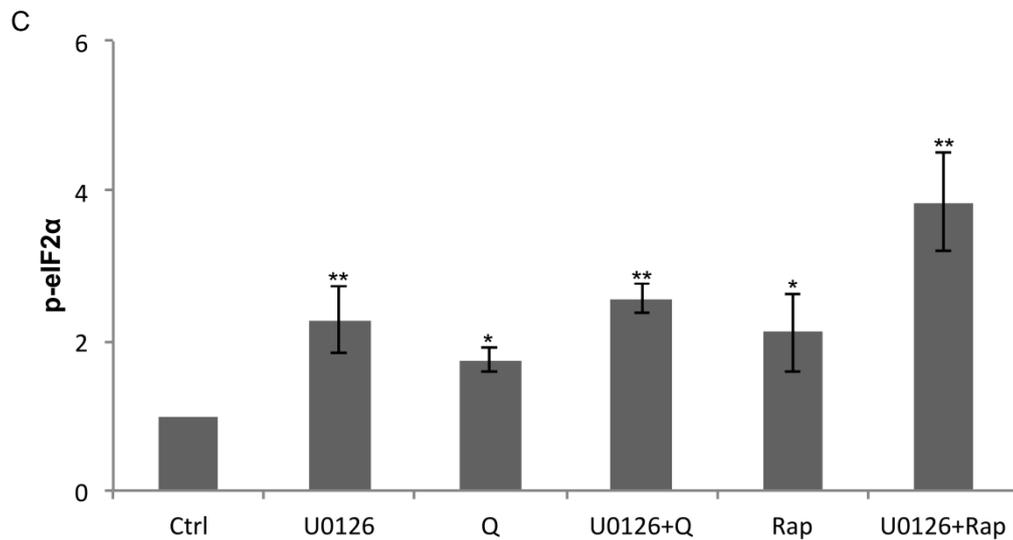
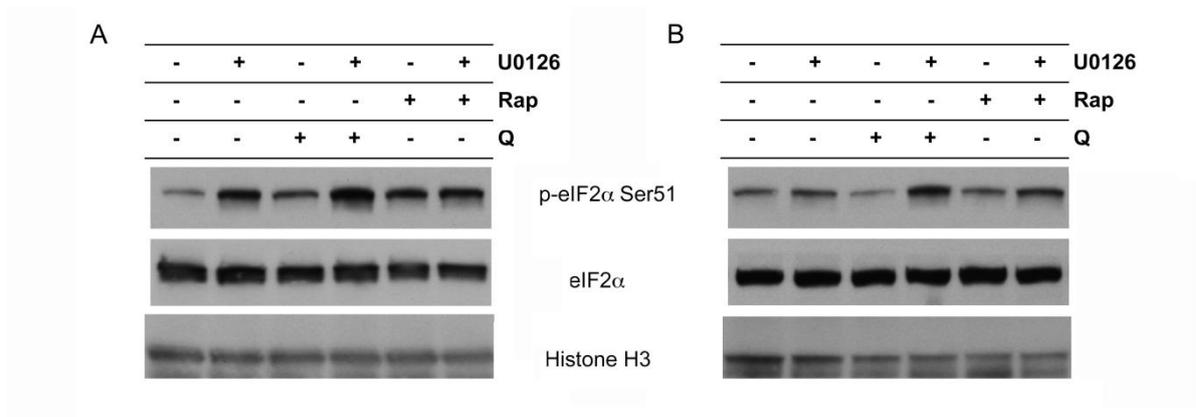


Figura 19: ERK contrasta la fosforilazione (=inibizione) di eIF2α. **A,B)** Analisi in Western-blot di p-eIF2α e eIF2α in lisati di cellule U937 pretrattate o non con U0126 (20μM, per 15 minuti) e trattate o non per 6 ore con Q 10μM o Rap 0.1μM (A) e in lisati di cellule THP1 pretrattate o non con U0126 (20μM, per 15 minuti) e trattate o non per 6 ore con Q 50μM o Rap 0.5μM (B). I livelli di Istone H3 vengono mostrati come controllo del caricamento proteico (A, B). **C)** Analisi densitometrica di p-eIF2α di lisati di cellule U937 trattate come in A. I valori mostrati rappresentano la Media±DS (n=3) ed erano ottenuti usando la formula riportata in figura 2. La significatività dei risultati (P), calcolata con il t-test di Student, è mostrata in figura, dove *≥0.05, **<0.01.

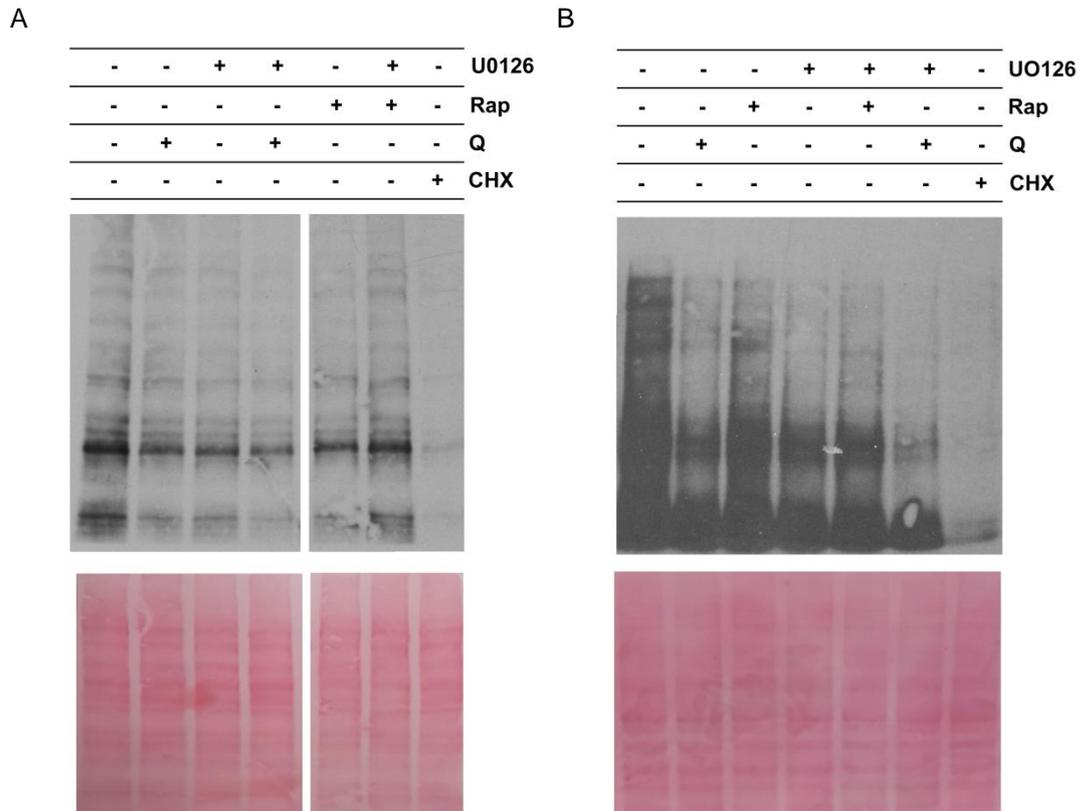


Figura 20: ERK contrastava l'inibizione della sintesi proteica. Analisi SUnSET della sintesi proteica, basata sulla valutazione di Puromicina mediante anticorpo specifico e anticorpo secondario coniugato a perossidasi in lisati di cellule U937 (A) o di cellule THP1 (B) pretrattate o non con U0126 (20 μ M, per 15 minuti) e, quindi, con o senza Q 10 μ M e Rap 0.1 μ M, nel caso di cellule U937, o con o senza Q 50 μ M e Rap 0.5 μ M, nel caso di cellule THP1. La Puromicina (10 μ M) veniva addizionata alle cellule negli ultimi 30 minuti dall'esperimento. Lisati di cellule trattati con Cicloesimide (CHX, 10 μ M) per 6 ore vengono mostrati (A, B) per validare il blocco della sintesi proteica. Le porzioni sottostanti A e B rappresentano le stesse membrane usate per il SUnSET, colorate con Red Ponceau per il controllo della uniformità del caricamento proteico. I risultati mostrati erano ottenuti in 3 distinti esperimenti con le cellule U937 e in 2 distinti esperimenti con le cellule THP1.

5.6 Tra ERK, AKT e mTORC1 esiste un cross-talk di meccanismi feedback inibitori

Nella prima parte di questo lavoro sperimentale abbiamo dimostrato che ERK contribuisce a mantenere l'omeostasi dipendente da mTORC1 in cellule leucemiche umane, trattate con la Q o la Rap, inibitori dello stesso mTORC1. Tuttavia, soprattutto 4EBP1, bersaglio di mTORC1, non risultava totalmente inibito, anche dopo l'inibizione di ERK. Questi risultati suggerivano l'esistenza di un'altra via di segnale capace di mantenere una attività residua di mTORC1.

È noto che la via di PI3K/AKT è fondamentale per l'attivazione di mTORC1 (Rozegurt E et al., 2014) e, inoltre, che questa via è particolarmente attiva nelle cellule U937, nelle quali è presente una delezione di PTEN (Martelli AM et al., 2012; Kubota Y et al., 2004; Xu Q et al., 2003; Grandage VL et al., 2005), fosfatasi di PI3K (Mukherjee R et al., 2021). Abbiamo, pertanto, investigato la relazione tra AKT, ERK e mTORC1 in cellule U937 trattate con la Q o con la Rap e nelle quali veniva inibito AKT con MK2206 1 μ M (Cheng Y et al., 2011) o ERK con U0126 20 μ M. La Q o la Rap inducevano la fosforilazione di AKT in Ser473 a ciascuna delle concentrazioni testate (Q 5, 10, 30, 50 μ M; Rap 0.1, 0.3, 0.5 μ M) (Figura 21 A). La Q 10 μ M e la Rap 0.1 μ M inducevano anche l'attivazione di ERK (Figure 21 B, 13 A–B, 14 A–B). Interessantemente, la inibizione di ERK con U0126 20 μ M causava anch'essa l'attivazione di AKT, paragonabile a quella indotta dalla Q 10 μ M o dalla Rap 0.1 μ M, ed era di poco aumentata dal trattamento combinato con Q oppure Rap (Figure 21 B, 22). MK2206 efficacemente preveniva l'attivazione di AKT in Ser473 sia costitutiva che indotta da Q, Rap o U0126, ma causava una forte attivazione di ERK costitutivo, che risultava maggiore nelle cellule trattate anche con la Q oppure con la Rap (Figure 21 B, 22). Questi risultati mostravano un cross-talk tra ERK e AKT presente in modo costitutivo nelle cellule U937, per cui all'inibizione di AKT fa seguito l'attivazione di ERK e all'inibizione di ERK fa seguito l'attivazione di AKT. Abbiamo, quindi, esaminato il grado di fosforilazione dei bersagli di mTORC1. In modo simile a quanto già sopra riportato, la fosforilazione di P70S6K in Thr389 era parzialmente

inibita dalla Q 10 μ M (60%) e efficacemente inibita dalla Rap 0.1 μ M (>90%), mentre la fosforilazione di 4EBP1 in Ser65 era parzialmente inibita sia dalla Q (50%) che dalla Rap (38%) (Figure 21 B, 22, 13 A–B). Veniva qui confermato che l’inibizione di ERK con U0126 (20 μ M) causava per sé una riduzione della fosforilazione di P70S6K (40%) e di 4EBP1 (40%); il trattamento combinato U0126+Q riduceva efficacemente la fosforilazione di P70S6K (90%) e quella di 4EBP1 (70%) e il trattamento combinato U0126+Rap non modificava l’inibizione efficace di P70S6K (>90%), mentre riduceva la fosforilazione di 4EBP1 (70%) (Figure 21 B, 22, 14 A–D). Abbiamo esaminato anche il ruolo di AKT in questo contesto e abbiamo osservato che la sua inibizione con MK2206 causava per sé la riduzione della fosforilazione di P70S6K in Thr389 (50%) e di 4EBP1 (40%), ma riduceva ulteriormente queste fosforilazioni quando associata con la Q (80% inibizione di P70S6K e 70% inibizione di 4EBP1) (Figure 21 B, 22). Il trattamento combinato MK2206+Rap restava efficace nell’inibire P70S6K (>90%) e aumentava la inibizione di 4EBP1 (60%) (Figure 21 B, 22). Nel loro insieme questi risultati mostrano l’esistenza di un cross-talk di meccanismi feedback inibitori tra ERK e AKT, per i quali l’inibizione di ciascuna chinasi comporta l’aumento dell’attivazione dell’altra. Questa oscillazione tra ERK e AKT permetterebbe una attività residua di mTORC1 in grado di mantenere, anche se limitata, soprattutto l’attivazione di 4EBP1.

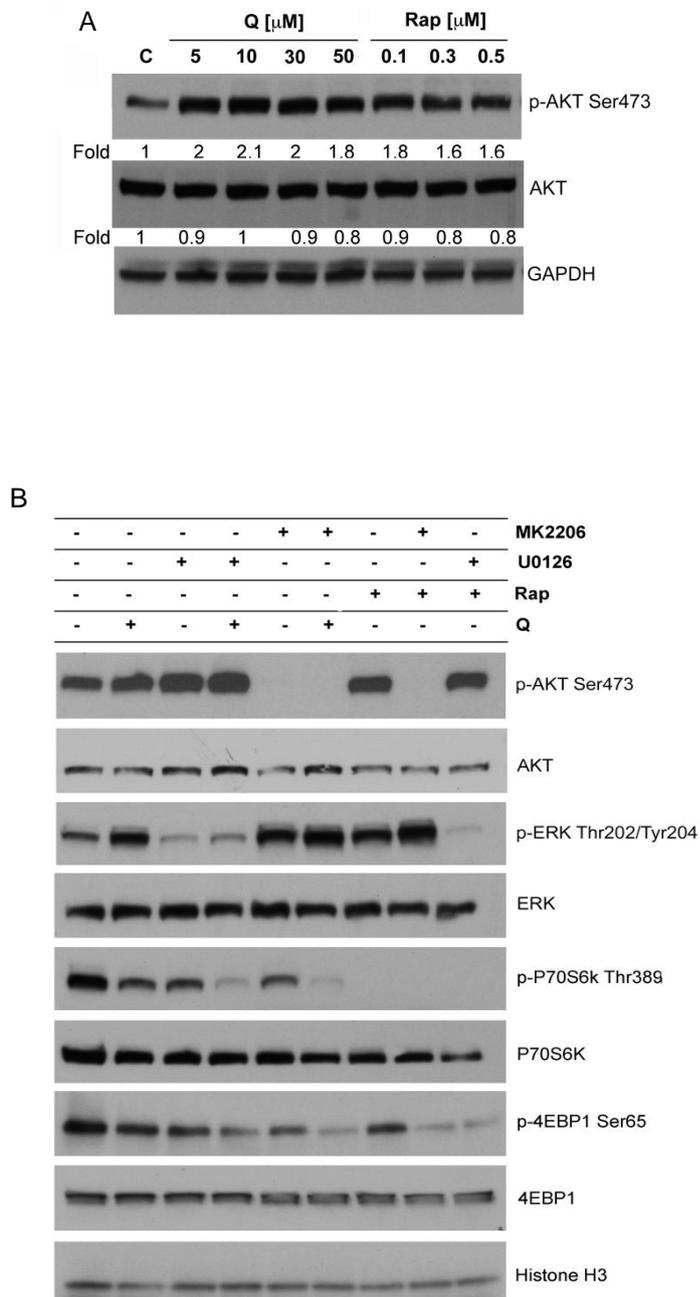


Figura 21: L'inibizione di ERK causa l'attivazione di AKT e l'inibizione di AKT causa l'attivazione di ERK con persistenza di una attività residua di mTORC1. A) Analisi in Western-blot di p-AKT e AKT in cellule U937 trattate con varie concentrazioni di Q o Rap per 6 ore. GAPDH è mostrato come controllo del caricamento proteico. I valori sotto le bande rappresentano il rapporto tra il valore densitometrico di ciascun campione e quello delle cellule di controllo, calcolato come in figure 1 e 4. **B)** Analisi in Western-blot di p-AKT, AKT, p-ERK, ERK, p-P70S6K, P70S6K, p-4EBP1, 4EBP1 in cellule U937 pretrattate o non con MK2206 1 μ M o U0126 20 μ M per 15 minuti e quindi trattate o non con Q 10 μ M o Rap 0.1 μ M per 6 ore. Le proteine blottate erano incubate con gli anticorpi anti-p-AKT Ser473, anti-AKT, anti-p-ERK Thr202/Tyr204, anti-ERK, anti-p-P70S6K Thr389, anti-P70S6K, anti-p-4EBP1 Ser65, anti-4EBP1, seguiti da anticorpi secondari coniugati a perossidasi. L'Istone H3 è mostrato come controllo del caricamento proteico.

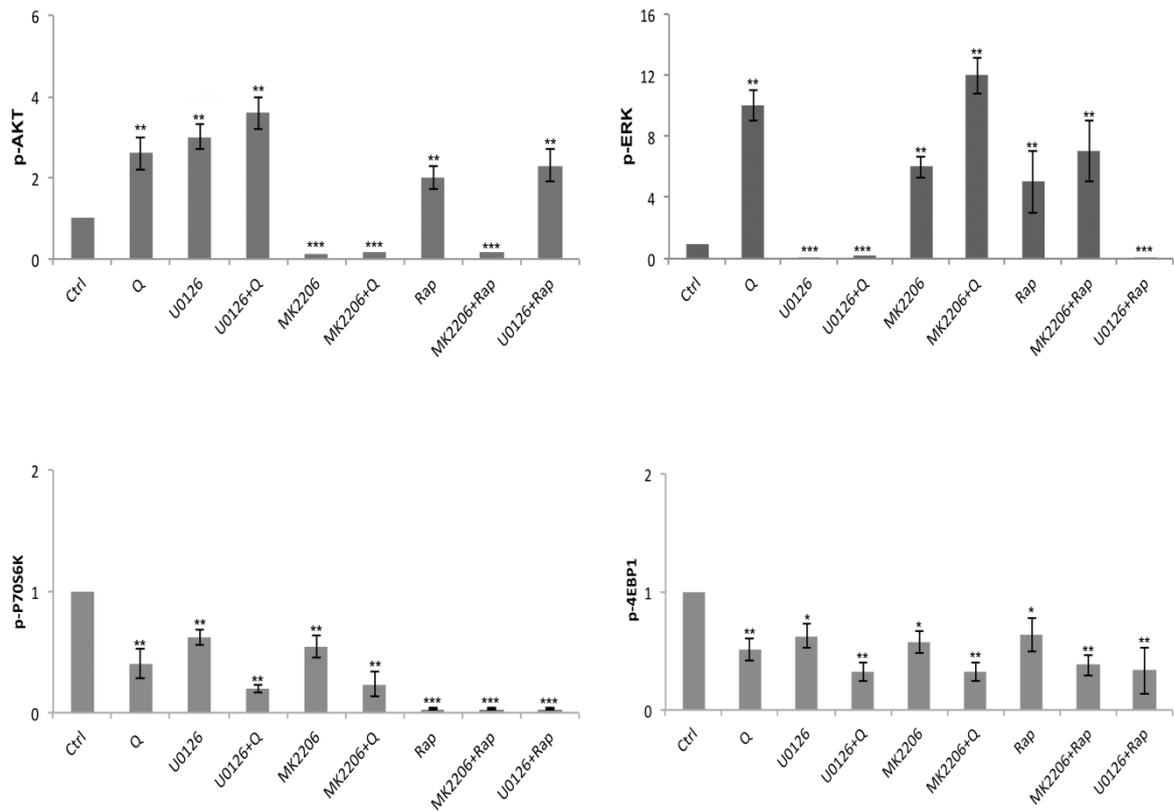


Figura 22: Oscillazione tra ERK e AKT e attività residua di mTORC1. Analisi densitometrica di p-AKT, p-ERK, p-P70S6K e p-4EBP1 in lisati di cellule U937 pretrattate per 15 minuti o non con MK2206 1 μ M o U0126 20 μ M e, quindi, trattate o non con Q 10 μ M o Rap 0.1 μ M per 6 ore. Le proteine blottate erano incubate con gli indicati anticorpi primari, seguiti da anticorpi secondari coniugati a perossidasi. I valori riportati negli istogrammi rappresentano la Media \pm DS dei risultati ottenuti in 5 esperimenti indipendenti. Tali valori erano ottenuti usando la formula: (valore densitometrico della banda in esame / valore densitometrico della banda del prodotto di un gene "housekeeping" nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda esaminata nel lisato delle cellule non trattate / valore densitometrico della banda del prodotto del gene "housekeeping" nel lisato delle cellule non trattate). La significatività dei risultati era studiata con il t-test di Student, analizzando i risultati ottenuti per ciascun trattamento in confronto ai dati ottenuti nelle cellule di controllo (Ctrl) e viene riportata in figura, dove: * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

5.7 L'inibizione contemporanea di ERK e AKT è necessaria per la completa inibizione di mTORC1 e per una efficace morte cellulare

I risultati prima riportati hanno mostrato che l'inibizione di ERK o di AKT non era sufficiente a inibire completamente mTORC1. Ma, in queste cellule si aveva l'attivazione della segnalazione a monte AKT-dipendente o ERK-dipendente, a seconda che veniva inibito ERK o AKT. Questa osservata oscillazione poteva essere determinante per garantire una attività residua di mTORC1. Abbiamo quindi investigato l'effetto dell'inibizione contemporanea di ERK e AKT sui bersagli di mTORC1, P70S6K e 4EBP1, in cellule U937 trattate o non con Q o Rap. Rispetto ai singoli trattamenti con U0126 o MK2206, il trattamento con entrambi gli inibitori preveniva efficacemente la fosforilazione costitutiva sia di AKT in Ser473 che di ERK in Thr202/Tyr204, ma anche quella di P70S6K in Thr389 (>70%) e quella di 4EBP1 in Ser65 (>50%) (Figura 23 A, B). Quindi, quest'ultimo evento appariva ancora protetto nelle cellule U937. Tuttavia, l'inibizione combinata di ERK e AKT insieme alla Q o alla Rap riuscivano ad annullare anche questa fosforilazione (>90%) (Figura 23 A, B). Come ERK e mTORC1, AKT è una molecola cruciale nella segnalazione per la crescita e sopravvivenza cellulare (Mendoza MC et al., 2011; Bilanges B et al., 2019). Abbiamo, quindi, valutato la vitalità cellulare a distanza di 24 ore dai trattamenti cellulari, in termini di eventi subG1. La doppia inibizione di ERK con U0126 e di AKT con MK2206 risultava più citotossica (31%) rispetto al trattamento singolo con U0126 (20%) o con MK2206 (14%). L'azione citotossica della Q (33%) risultava rinforzata da U0126 (43%) o da MK2206 (52%), ma in modo maggiore dalla doppia inibizione (60%) (Figura 24). Pertanto, ERK e AKT mediano un segnale pro-sopravvivenza e l'attivazione compensatoria di una via quando l'altra è inibita permette a mTORC1 di non essere completamente inibito e alle cellule di sopravvivere.

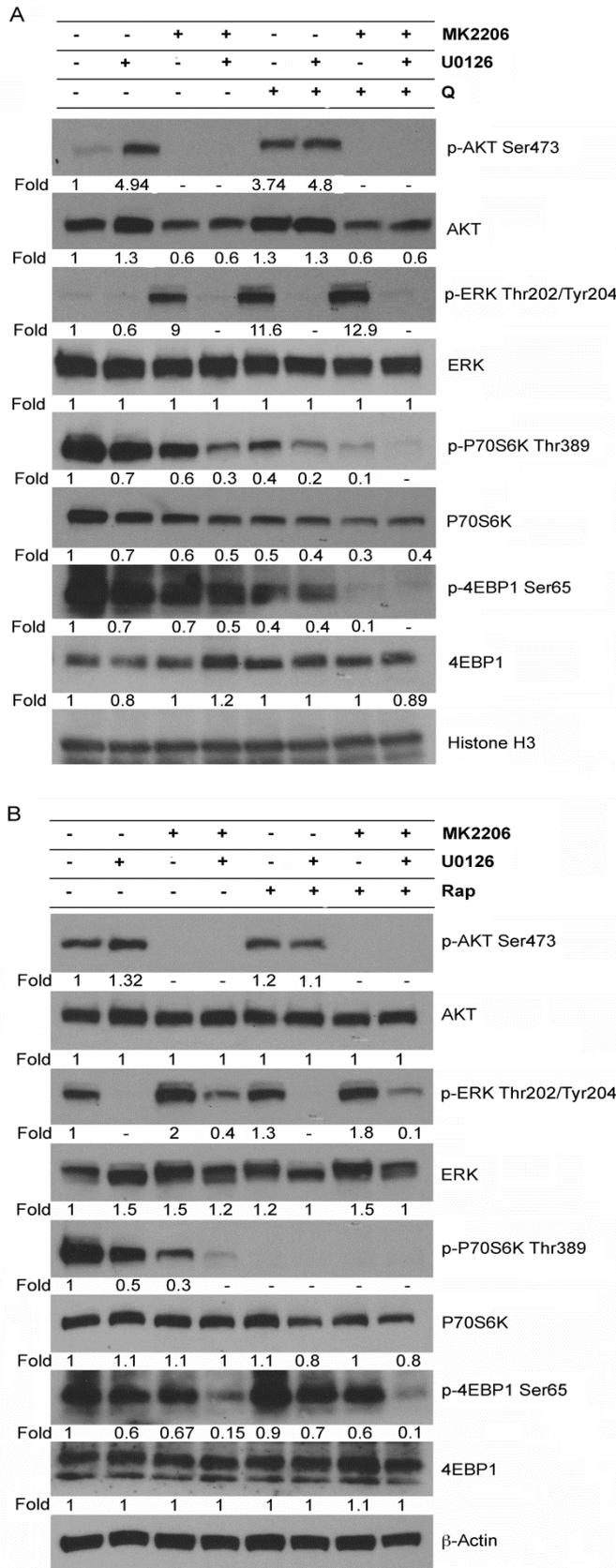


Figura 23: La doppia inibizione di ERK e AKT permette alla Q e alla Rap di inibire completamente mTORC1. Analisi in Western-blot di p-AKT, AKT, p-ERK, ERK, p-P70S6K, P70S6K, p-4EBP1, 4EBP1 in lisati di cellule U937 pretrattate o non per 15 minuti con MK2206 1 μ M, U0126 20 μ M o con entrambi gli inibitori e, poi, trattate o non per 6 ore con Q 10 μ M (A) o con Rap 0.1 μ M (B). I livelli di Istone H3 (A) o di β -Actina (B) sono mostrati come controllo della uniformità del caricamento proteico. I blot sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. Ciascuna proteina era rilevata con anticorpo specifico seguito da anticorpi coniugati a perossidasi. I valori sotto ciascuna banda erano ottenuti usando la seguente formula: (valore densitometrico della banda in esame / valore densitometrico della banda del prodotto di un gene "housekeeping" nello stesso lisato) / (valore densitometrico della banda in esame nel lisato delle cellule non trattate / valore densitometrico di un gene "housekeeping" nel lisato di cellule non trattate).

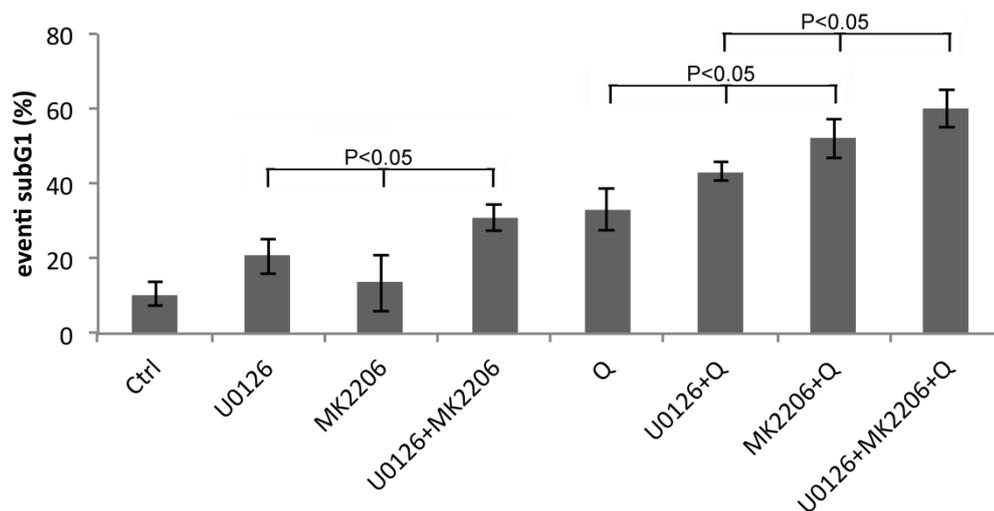


Figura 24: La doppia inibizione di ERK e AKT aumenta la morte cellulare. La morte cellulare era investigata in cellule U937, calcolando la percentuale di eventi subG1 nel ciclo cellulare, mediante acquisizione in citofluorimetria di ≥ 10000 eventi per campione. Le cellule erano pretrattate o non con MK2206 $1\mu\text{M}$, U0126 $20\mu\text{M}$ o con entrambi gli inibitori per 15 minuti e, quindi, trattate o non per 24 ore con Q $10\mu\text{M}$. I valori riportati rappresentano la Media \pm DS (n=4). I dati della morte cellulare indotta dal trattamento combinato MK2206+U0126 risultavano statisticamente significativi quando confrontati con i dati dei singoli trattamenti con U0126 o MK2206 ($P<0.05$). Anche i dati della morte cellulare indotta da U0126+Q o MK2206+Q risultavano significativi quando confrontati con il trattamento con la Q da sola ($P<0.05$). Infine, i dati relativi alla morte cellulare causata da U0126+MK2206+Q risultavano significativi quando confrontati con U0126+Q o MK2206+Q ($P<0.05$).

6. Discussione

Cellule tumorali maligne dipendono in modo critico dalla attivazione di vie di segnale pro-sopravvivenza. È noto che in molti tumori maligni sono attivate molteplici cascate parallele di sopravvivenza. Le vie PI3K/AKT/mTORC1 e Ras-MEK-ERK rappresentano due delle vie di segnale più importanti, spesso disregolate da alterazioni genetiche, iperattive in molti tumori, cooperanti tra loro e responsabili della sopravvivenza di cellule tumorali. Le proteine chiave di queste due vie costituiscono bersagli farmacologici di "smart drugs", capaci di più efficaci terapie anti-tumorali. L'attivazione di queste vie di segnale è un aspetto caratteristico delle AML, un gruppo eterogeneo di malattie ematologiche maligne che progrediscono rapidamente. Lo studio di tali vie ha messo in evidenza che per una efficace terapia non è sufficiente interferire con un'unica via, a causa dell'esistenza di meccanismi feedback (Rozengurt E et al., 2014). Come dimostrato da Carracedo e suoi collaboratori mTORC1/P70S6K segnala attraverso un feedback negativo su IRS-1 e l'inibizione di questo feedback comporta un'eccessiva attivazione compensatoria di nodi di segnalazione che includono la via di PI3K/AKT e di ERK e che limitano gli effetti antiproliferativi degli inibitori di mTORC1 (Carracedo A et al., 2008), portando a farmacoresistenza.

In questo lavoro sperimentale abbiamo investigato l'esistenza di feedback inibitori in cellule derivate da AML umane, U937 e THP1, a seguito della inibizione di mTORC1. A questo fine abbiamo usato due inibitori di mTORC1, la Quercetina (Q) e la Rapamicina (Rap). Della Q non conosciamo il target principale, della Rap sappiamo che essa inibisce direttamente mTORC1, ma non mTORC2 (Ballou LM, Lin RZ, 2008). I risultati ottenuti con le due sostanze erano molto simili e, pertanto, indicano che sia la Q che la Rap inibiscono direttamente mTORC1, lasciando PI3K non coinvolta e, quindi, in grado di funzionare in diversi contesti di segnalazione. La

inibizione di mTORC1 era analizzata in termini di riduzione della fosforilazione dei suoi substrati, P70S6K in Thr389 e 4EBP1 in Ser65, mentre il grado di attivazione di ERK era valutato dalla sua fosforilazione in Thr202/Tyr204 e il grado di attivazione di AKT era valutato dalla sua fosforilazione in Ser473. Per questo ultimo sito di fosforilazione bisogna ricordare che esso è regolato dall'azione di mTORC2 e rappresenta l'evento di piena attivazione di AKT (Sarbasov DD et al., 2005; Facchinetti V et al., 2008; Ebner M et al., 2017).

Nelle linee cellulari da noi utilizzate abbiamo dimostrato che mTORC1, attraverso P70S6K, imponeva un feedback negativo su ERK. Infatti, l'inibizione di mTORC1/P70S6K con Q o Rap era associata all'attivazione di ERK e l'inibizione specifica di P70S6K con PF-4708671 rafforzava la fosforilazione di ERK indotta dalla Q o Rap. Quindi, i risultati qui riportati dimostrano che anche nelle AML umane è presente un feedback negativo tra mTORC1 e ERK, per cui all'inibizione del primo corrisponde una forte attivazione della MAPK. Interessantemente, la sottrazione al loop inibitorio dipendente da mTORC1 permetteva a ERK di garantire l'omeostasi della via di mTORC1 stesso. Infatti, l'inibizione farmacologica di ERK con U0126 causava una moderata riduzione della fosforilazione costitutiva di P70S6K nel residuo Thr389 e di 4EBP1 nel residuo Ser65 e una maggiore inibizione di tali substrati quando le cellule venivano trattate anche con Q o Rap. Inoltre, l'inibizione di ERK aumentava anche la citotossicità di Q o Rap. Quindi, mTORC1 e ERK sono legate da un doppio feedback, dove l'inibizione del primo comporta l'attivazione della MAPK che media un segnale di attivazione sullo stesso mTORC1. Questo cross-talk tra mTORC1 e ERK e tra ERK e mTORC1 si associa a sopravvivenza cellulare e, quindi, alla limitata efficacia dei farmaci anti-mTORC1 usati.

Nel mantenimento dell'omeostasi cellulare un ruolo fondamentale è giocato dall'autofagia che promuove il riciclo di nutrienti, controlla e media la degradazione di proteine e organuli citoplasmatici (Yu L et al., 2018). Il processo è attivato in condizioni di stress e/o carenza di nutrienti al fine di garantire un giusto equilibrio

energetico nella cellula. In condizioni ricche di nutrienti e/o aminoacidi, invece, l'autofagia è inibita da mTORC1 (Alers S et al., 2012; Wang H et al., 2019). Quindi, abbiamo investigato l'effetto dell'inibizione di mTORC1 nelle cellule U937 e THP1 trattate con Q o Rap e abbiamo osservato che sia nelle cellule trattate con Q sia nelle cellule trattate con Rap si aveva una riduzione del flusso autofagico, il quale risultava ulteriormente ridotto dopo l'inibizione farmacologica di ERK con U0126. Il pretrattamento cellulare con la Baf, in grado di bloccare le fasi degradative del flusso autofagico, (Klionsky DJ et al., 2016), evidenziava una riduzione dell'accumulo di LC3-II nelle cellule trattate con la Q o la Rap, ma anche in cellule con ERK inibito e trattate con Q o Rap. La proteina SQSTM1/p62 viene degradata nelle fasi finali dell'autofagia e, pertanto, la sua riduzione rappresenta una chiave di lettura del flusso autofagico. Rispetto alle cellule di controllo, i livelli di SQSTM1/p62 non erano influenzati da Rap, mentre nelle cellule trattate con Q si osservava un suo aumento, che risultava ancora maggiore nel trattamento combinato con U0126. Pertanto, ERK, sottratta dal loop inibitorio mTORC1-dipendente, contrastava l'inibizione dell'autofagia indotta da Q o Rap.

mTORC1 e ERK possono regolare l'autofagia trascrizionalmente. Infatti, la fosforilazione di TFEB, uno dei più importanti fattori di trascrizione di geni autofagici e della biogenesi lisosomiale (Settembre C et al., 2013), è regolata sia da mTORC1 che da ERK. Quando attivi, essi fosforilano TFEB che, nella forma fosforilata, resta sequestrato nel citoplasma (Settembre C et al., 2011; Settembre C et al., 2012; Vega-Rubin-de Celis S et al., 2017). In condizioni di stress in cui mTORC1 è inattivo, TFEB non è più fosforilato e nella forma defosforilata può migrare nel nucleo e attivare la trascrizione dei suoi geni bersaglio. Lo studio della traslocazione nucleo/citoplasma di TFEB attraverso il frazionamento cellulare ha dimostrato che il rallentamento del flusso autofagico non era associato alla modificata traslocazione di TFEB. Infatti, i diversi trattamenti cellulari qui investigati non modificavano la quantità di TFEB nei nuclei e nel citoplasma. Per escludere il coinvolgimento di altri fattori di trascrizione, abbiamo studiato l'espressione di alcuni geni autofagici

(BECN1, Map1LC3b, SQSTM1/p62, LAMP1, ULK1): rispetto alle cellule non trattate, i trattamenti con Q, U0126 o U0126+Q causavano una leggera diminuzione dei trascritti di LAMP1, SQSTM1/p62 e di BECN1, mentre non modificavano la trascrizione di Map1LC3b o ULK1. Pertanto, il rallentamento del flusso autofagico non era causato dall'inibizione trascrizionale di geni autofagici.

È noto che la via di PI3K/AKT e delle MAPK convergono su mTORC1 per regolare il processo della traduzione (Roux PP, Topisirovic I, 2018) i cui principali mediatori sono 4EBP1 e P70S6K. In particolare, 4EBP1 è un repressore traduzionale che quando fosforilato da mTORC1 si dissocia dal fattore d'inizio della traduzione eIF4E, consentendo l'assemblaggio dell'intero complesso d'inizio e permettendo l'avvio della traduzione CAP-dipendente. Dato che la Q o la Rap, ma anche l'inibizione di ERK e ancor più i trattamenti combinati causavano una riduzione della fosforilazione di P70S6K e 4EBP1, era possibile che la riduzione del flusso autofagico fosse dovuta a una inibizione della sintesi proteica. Inoltre, abbiamo analizzato anche eIF2 α , un'altra importante molecola chiave nel controllo traduzionale, la cui fosforilazione nel residuo Ser51 causa riduzione della traduzione in generale (Boye E, Grallert B, 2020), e abbiamo osservato che U0126 causava la sua fosforilazione nel residuo Ser51, la quale era aumentata dopo il trattamento combinato con Q o Rap. Effettivamente, la sintesi proteica in generale, investigata con il metodo SUnSet, era ridotta già nelle cellule trattate con la Q o con la Rap o con l'inibizione di ERK, ma ancora di più nelle cellule sottoposte ai doppi trattamenti. Quindi, la parziale inibizione di mTORC1 indotta da Q o Rap porta ad una diminuzione della sintesi proteica che è però limitata dall'attivazione di ERK. Questa MAPK funziona a sostegno della sintesi proteica, contrastando non solo l'inibizione di 4EBP1 ma anche l'attivazione di eIF2 α . Quindi, ERK, sottratta dal loop inibitorio mTORC1-dipendente, contrastava l'inibizione di mTORC1 indotta da Q o Rap e la loro azione citotossica, mediando un segnale di sopravvivenza. Inoltre, ERK contrastava l'inibizione dell'autofagia e l'inibizione della sintesi proteica indotte da Q o Rap. Tuttavia, la parziale inibizione

di 4EBP1, anche quando ERK era inibito farmacologicamente, suggeriva l'esistenza di un'altra via di segnale capace di mantenere un'attività residua di mTORC1.

Per l'attivazione di mTORC1 è molto importante la via di PI3K/AKT, la quale risulta particolarmente attiva nelle AML (Matelli AM et al., 2012).

Nella seconda parte di questo lavoro sperimentale abbiamo investigato il coinvolgimento di AKT nel regolare l'attività di mTORC1 e la sopravvivenza cellulare. Sia la Q che la Rap, ma anche l'inibizione di ERK inducevano la fosforilazione di AKT nel residuo Ser473 investigato. Come sopra anticipato, la fosforilazione di AKT in Ser473 dipende dalla attività di mTORC2 e questo complesso può essere inibito da mTORC1 (O'Really KE et al., 2006; Julien LA et al., 2010). Quindi, è possibile che l'inibizione di mTORC1 rimuova anche un loop inibitorio su mTORC2/AKT. Abbiamo investigato il ruolo di AKT esaminando gli effetti della sua inibizione specifica con MK2206 e abbiamo osservato la fosforilazione di ERK a prescindere dal trattamento con Q o Rap. Questi risultati mettono in evidenza l'esistenza di un cross-talk anche tra AKT e ERK, presente costitutivamente nelle cellule U937, per cui se si inibisce ERK o si inibisce AKT si ha l'attivazione compensatoria dell'altra via. In modo analogo all'inibizione di ERK con U0126, anche l'inibizione di AKT con MK2206 causava un'efficace riduzione della fosforilazione di P70S6K e una parziale riduzione dell'attività di 4EBP1, anche quando combinata con Q o Rap. ERK e AKT sono, quindi, interconnessi e collaborano tra loro per garantire un'attività residua di mTORC1, soprattutto su 4EBP1. Si riusciva ad annullare questa fosforilazione residua soltanto quando ERK e AKT erano contemporaneamente inibiti e ciò correlava con un aumento della morte cellulare. Quindi, l'attivazione compensatoria di una via quando l'altra è inibita impedisce l'inibizione totale di mTORC1 e questa oscillazione tra ERK e AKT consente alle cellule di sopravvivere.

Da questo lavoro emerge che gli inibitori di mTORC1, Q o Rap, non riescono a inibire totalmente il complesso, dal momento che vengono rimossi due meccanismi

feedback inibitori, con il risultato dell'attivazione sia di ERK che di AKT. Questi risultati sono rilevanti ai fini della dimostrazione di molecole che provocano la resistenza tumorale a inibitori di mTORC1. Lo studio di questi meccanismi di regolazione a feedback sta diventando un'area di fondamentale importanza per la progettazione di efficaci combinazioni di farmaci antitumorali, al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici.

7. Bibliografia

- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: Cross talk, shortcuts, and feedbacks*. Mol Cell Biol (2012); 32: 2–11.
- Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y. *Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1*. Cell Signal (2007); 19: 519–527.
- Asano J, Nakano A, Oda A, Amou H, Hiasa M, Takeuchi K, Miki H, Nakamura S, Harada T, Fujii S, Kagawa K, Endo I, Yata K, Sakai A, Ozaki S, Matsumoto T, Abe M. *The serine/threonine kinase Pim-2 is a novel anti-apoptotic mediator in myeloma cells*. Leukemia (2011); 25: 1182–1188.
- Assouline S, Cocolakis E, Borden KL. *The development of novel therapies for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. Cancers (Basel) (2012); 4: 1161–1179.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol (2008); 182: 685–701.
- Bahnan W, Boucher JC, Gayle P, Shrestha N, Rosen M, Aktas B, Adkins B, Ager A, Khan WN, Schesser K. *The eIF2 α Kinase Heme-Regulated Inhibitor Protects the Host from Infection by Regulating Intracellular Pathogen Trafficking*. Infect Immun (2018); 86: e00707–e00717.
- Ballou LM, Lin RZ. *Rapamycin and mTOR kinase inhibitors*. J Chem Biol (2008); 1: 27–36.
- Ben-Hur V, Denichenko P, Siegfried Z, Maimon A, Krainer A, Davidson B, Karni R. *S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1*. Cell Rep (2013); 3: 103–115.
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. *Targeting the translation machinery in cancer*. Nat Rev Drug Discov (2015); 14: 261–278.
- Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebrceck B. *PI3K isoforms in cell signaling and vesicle trafficking*. Nat Rev Mol Cell Biol (2019); 20: 515–534.

Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P. *Autophagy signaling and the cogwheels of cancer*. *Autophagy* (2006); 2: 67–73.

Boye E, Grallert B. *eIF2 α phosphorylation and the regulation of translation*. *Curr Genet*. (2020); 66: 293–297.

Braunstein S, Badura ML, Xi Q, Formenti SC, Schneider RJ. *Regulation of protein synthesis by ionizing radiation*. *Mol Cell Biol* (2009); 29: 5645–5656.

Broer S, Broer A. *Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms*. *Biochem J* (2017); 474: 1935–1963.

Browne GJ, Finn SG, Proud CG. *Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398*. *J Biol Chem* (2004); 279: 12220–12231.

Calabrese MF, Rajamohan F, Harris MS, Caspers NL, Magyar R, Withka JM, Wang H, Borzilleri KA, Sahasrabudhe PV, Hoth LR, Geoghegan KF, Han S, Brown J, Subashi TA, Reyes AR, Frisbie RK, Ward J, Miller RA, Landro JA, Londregan AT, Carpino PA, Cabral S, Smith AC, Conn EL, Cameron KO, Qiu X, Kurumbail RGI. *Structural basis for AMPK activation: Natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms*. *Structure* (2014); 22: 1161–1172.

Cao Y, Liu S, Liu K et al. *Molecular mechanisms relating to amino acid regulation of protein synthesis*. *Nutr Res Rev* (2019); 32: 183–191.

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, C Kozma S, Papa A, Nardella C, C Cantley L, Baselga J, Pandolfi PP. *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. *J Clin Invest* (2008); 118: 3065–3074.

Carracedo A, Pandolfi PP. *The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and crosstalks*. *Oncogene* (2008); 27: 5527–5541.

Cedric M, Eugene K, Estela J. *Targeting mTOR and metabolism in cancer: lessons and innovations*. *Cells* (2019); 8: 1584.

Cheng Y, Ren X, Zhang Y, Patel R, Sharma A et al. *eEF-2 Kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK2206*. *Cancer Res* (2011); 71: 2654–2663.

Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL. *TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase*. J Biol Chem (2006); 281: 8313–8316.

Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P, James D, Howard Z, Dudley P, Hughes G, Smith L, Maguire S, Hummersone M, Malagu K, Menear K, Jenkins R, Jacobsen M, Smith GCM, Guichard S, Pass M. *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 Res (2010); 70: 288–298.

Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F, Fimia GM. *The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy*. J Cell Biol (2010); 191: 155–168.

Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. *TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1*. Mol Cell (2012); 47: 535–546.

Dibble CC, Manning BD. *Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output*. Nat Cell Biol (2013); 15: 555–564.

Dikic I, Elazar Z. *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol (2018); 19: 349–364.

Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. *The eIF2 α kinases: their structures and functions*. Cell Mol Life Sci (2013); 70: 3493–3511.

Dooley HC, Wilson MI, Tooze SA. *WIPI2B links PtdIns3P to LC3 lipidation through binding ATG16L1*. Autophagy (2015); 11: 190–191.

Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. *mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs*. Science (2010); 328: 1172–1176.

Duran RV, Hall MN. *Regulation of TOR by small GTPases*. EMBO Rep (2012); 13: 121–128.

Ebner M, Sinkovics B, Szczygiel M, Ribeiro DW, Yudushkin I. *Localization of mTORC2 activity inside cells*. J Cell Biol (2017); 216: 343–353.

- Efeyan A, Sabatini DM. *mTOR and cancer: many loops in one pathway*. *Curr Opin Cell Biol* (2010); 22: 169–176.
- Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E. *The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C*. *Embo J* (2008); 27: 1932–1943.
- Faller WJ, Jackson TJ, Knight JR, Ridgway RA, Jamieson T, Karim SA, Jones C, Radulescu S, Huels DJ, Myant KB, Dudek KM, Casey HA, Scopelliti A, Cordero JB, Vidal M, Pende M, Ryazanov AG, Sonenberg N, Meyuhos O, Hall MN, Bushell M, Willis AE, Sansom OJ. *mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth*. *Nature* (2015); 517: 497–500.
- Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM. *Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2*. *PLoS Biol* (2009); 7: e38.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. *The machinery of macroautophagy*. *Cell Res* (2014); 24: 24–41.
- Fenton TR, Gout IT. *Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases*. *Int J Biochem Cell Biol* (2011); 43: 47–59.
- Figlin RA, Kaufmann I, Brechbiel J. *Targeting PI3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: New strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors*. *Int J Cancer* (2013); 133: 788–796.
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. *Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system*. *Nature* (2007); 447: 1121–1125.
- Franke TF. *PI3K/AKT: getting it right matters*. *Oncogene* (2008); 27: 6473–6488.
- Fu LL, Cheng Y, Liu B. *Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer*. *Int J Biochem Cell Biol* (2013); 45: 921–924.
- Gan X, Wang J, Su B, Wu D. *Evidence for Direct Activation of mTORC2 Kinase Activity by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate*. *J Biol Chem* (2011); 286: 10998–11002.

- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy.* J Biol Chem (2009); 284: 12297–12305.
- Gao T, Furnari F, Newton AC. *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth.* Mol Cell (2005); 18: 13–24.
- Gao W, Estey E. *Moving toward targeted therapies in acute myeloid leukemia.* Clin Adv Hematol Oncol (2015); 13: 748–754.
- Gao Y, Gao J, Li M, Zheng Y, Wang Y, Zhang H, Wang W, Chu Y, Wang X, Xu M, Cheng T, Ju Z, Yuan W. *Rheb1 promotes tumor progression through mTORC1 in MLL-AF9-initiated murine acute myeloid leukemia.* J Hematol Oncol (2016); 9: 36.
- Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2.* Mol Cell (2003); 11: 1457–1466.
- García-Gómez R, Bustelo XR, Crespo P. *Protein-protein interactions: Emerging oncotargets in the RAS-ERK pathway.* Trends Cancer (2018); 4: 616–633.
- Garcia-Martinez JM, Alessi DR. *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1).* Biochem J (2008); 416: 375–385.
- Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR. *Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR).* Biochem J (2009); 421: 29–42.
- Gewirtz DA. *The four faces of autophagy: Implications for cancer therapy.* Cancer Res (2014); 74: 647–651.
- Ghosh J, Kapur R. *Role of mTORC1-S6K1 signaling pathway in regulation of hematopoietic stem cell and acute myeloid leukemia.* Exp Hematol (2017); 50: 13–1.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism.* Genes Dev (1999); 13: 1422–1437.
- Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. *Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1.* Genes Dev (2001); 15: 2852–2864.

- Gout I, Minami T, Hara K, Tsujishita Y, Filonenko V, Waterfield MD, Yonezawa K. *Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region.* J Biol Chem (1998); 273: 30061–30064.
- Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. *PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, MapKinase and p53 pathways.* Leukemia (2005); 19: 586–594.
- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor.* J Biol Chem (2007); 282: 30107–30119.
- Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey PJ, Price DJ, Avruch J, Woodgett JR. *Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini.* Mol Cell Biol (1991); 11: 5541–5550.
- Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, Zhu T, Taylor J, Barber TD, Vojtek AB. *Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt.* J Biol Chem (2000); 275: 27354–27359.
- Guertin DA, Sabatini DM. *Defining the role of mTOR in cancer.* Cancer Cell (2007); 12: 9–22.
- Gulluni F, De Santis MC, Margaria JP, Martini M, Hirsch E. *Class II PI3K function in cell biology and disease.* Trends Cell Biol (2019); 29: 339–359.
- Gupta S, R Ramjaun A, Haiko P, Wang Y, H Warne P, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. *Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice.* Cell (2007); 129: 957–968.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.* Mol Cell (2008); 30: 214–226.
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. *FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells.* J Cell Biol (2008); 181: 497–510.
- Hardie DG. *AMPK: Positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis.* Curr Opin Cell Biol (2015); 33: 1–7.

- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. *Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase.* J Biol Chem (1996); 271: 27879–27887.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. *Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase.* Cell Metab (2005); 2: 9–19.
- Hay N, Sonenberg N. *Upstream and downstream of mTOR.* Genes Dev (2004); 18: 1926–1945.
- Haystead TA, Haystead CM, Hu C, Lin TA, Lawrence JC, Jr. *Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes.* J Biol Chem (1994); 269: 23185–23191.
- He C, Klionsky DJ. *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy.* Ann Rev Genet (2009); 43: 67–93.
- Hershey JW. *The role of eIF3 and its individual subunits in cancer.* Biochim Biophys Acta (2015); 1849: 792–800.
- Hindupur SK, González A, Hall MN. *The Opposing Actions of Target of Rapamycin and AMP-Activated Protein Kinase in Cell Growth Control.* Cold Spring Harb Perspect Biol (2015); 7: a019141.
- Hinnebusch AG. *The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation.* Annu Rev Biochem (2014); 83: 779–812.
- Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. *Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs.* Science (2016); 352: 1413–1416.
- Hirsch E, Gulluni F, Martini M. *Phosphoinositides in cell proliferation and metabolism.* Adv Biol Regul (2020); 75: 100693.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J-L, Oshiro N, Mizushima N. *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy.* Mol Biol Cell (2009); 20: 1981–1991.

- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S-i, Natsume T, Hara T, Mizushima N. *Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13*. *Autophagy* (2014); 5: 973–979.
- Huang J, Dibble CC, Matsukazi M, Manning BD. *The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2*. *Mol Cell Biol* (2008); 28: 4104–4115.
- Hurley JH, Young LN. *Mechanisms of Autophagy Initiation*. *Ann Rev Biochem* (2017); 86: 225–244.
- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. *J Biol Chem* (2005); 280: 29060–29066.
- Inoki K. *mTOR signaling in autophagy regulation in the kidney*. *Semin Nephrol* (2014); 34: 2–8.
- Inoki K, Kim J, Guan KL. *AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2012); 52: 381–400.
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. *Genes Dev* (2003); 17: 1829–1834.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang C-Y, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan K-L. *TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth*. *Cell* (2006); 126: 955–968.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. *Cell* (2003); 115: 577–590.
- Ishimura R, Nagy G, Dotu I, Chuang JH, Ackerman SL. *Activation of GCN2 kinase by ribosome stalling links translation elongation with translation initiation*. *Elife* (2016); 5: e14295.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010); 11: 113–127.
- Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. *Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles*. *J Cell Sci* (2004); 117: 4837–4848.
- Jain R, Watson U, Vasudevan L, Saini DK. *ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs*. *Int Rev Cell Mol Biol* (2018); 338: 79–109.

- Jennings MD, Kershaw CJ, Adomavicius T, Pavitt GD. *Fail-safe control of translation initiation by dissociation of eIF2 α phosphorylated ternary complexes*. *Elife* (2017); 18: 6.
- Jewell JL, Guan KL. *Nutrient signaling to mTOR and cell growth*. *Trends Biochem Sci* (2013); 38: 233–242.
- Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. *mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling*. *Mol Cell Biol* (2010); 30: 908–921.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. *Mol Biol Cell* (2009); 20: 1992–2003.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. *EMBO J* (2000); 19: 5720–5728.
- Kapp LD, Lorsch JR. *GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2*. *J Mol Biol* (2004); 335: 923–936.
- Kenney JW, Moore CE, Wang X, Proud CG. *Eukaryotic elongation factor 2 kinase, an unusual enzyme with multiple roles*. *Adv Biol Regul* (2014); 55: 15–27.
- Kim J, Guan KL. *mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth*. *Nat Cell Biol* (2019); 21: 63–71.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. *Nat Cell Biol* (2011); 13: 132–141.
- Kim SJ, DeStefano MA, Oh WJ, Wu CC, Vega-Cotto NM, Finlan M, Liu D, Su B, Jacinto E. *mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8*. *Mol Cell* (2012); 48: 875–887.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. *Autophagy* (2016); 12: 1–222.
- Komar AA, Hatzoglou M. *Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states*. *Cell Cycle* (2011); 10: 229–240.

Kubota Y, Ohnishi H, Kitanaka A, Ishida T, Tanaka T. *Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation*. *Leukemia* (2004); 18: 1438–1440.

Kuchitsu Y, Fukuda M. *Revisiting Rab7 functions in mammalian autophagy: Rab7 knockout studies*. *Cells* (2018); 7: 215.

Kumar CC. *Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia*. *Genes Cancer* (2011); 2: 95–107.

Lane HA, Breuleux M. *Optimal targeting of the mTORC1 kinase in human cancer*. *Curr Opin Cell Biol* (2009); 21: 219–229.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature* (1994); 367: 645–648.

Laplanche M, Sabatini DM. *mTOR signaling in growth control and disease*. *Cell* (2012); 149: 274–293.

Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. *Targeting autophagy in cancer*. *Nat Rev Cancer* (2017); 17: 528–542.

Lim KH, Staudt LM. *Toll-like receptor signaling*. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* (2013); 5: a011247.

Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, Su B, Wei W. *PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex*. *Cancer Discov* (2015); 5: 1194–1209.

Liu P, Gan W, Inuzuka H, Lazorchak AS, Gao D, Arojo O, Liu D, Wan L, Zhai B, Yu Y, Yuan M, Byeong Mo Kim, Shavali Shaik, Suchithra Menon, Steven P. Gygi, Tae Ho Lee, John M. Asara, Brendan D. Manning, John Blenis, Bing Su, Wenyi We. *Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis*. *Nat Cell Biol* (2013) ;15: 1340–1350.

Liu Q, Chang JW, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Markhard A, Hur W, Zhang J, Sim T, Sabatini DM, Gray NS. *Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin 2(1H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer*. *J Med Chem* (2010); 53: 7146–7155.

- Liu W, Akhand AA, Takeda K, Kawamoto Y, Itoigawa M, Suzuki H, Ishikawa N, Nakashima I. *Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal*. *Cell Death Differ* (2003); 10: 772–781.
- Loris S, Hamai A, Mehrpour M, Codogno P. *Autophagy regulation and its role in cancer*. *Semin Cancer Biol* (2013); 23: 361–379.
- Lu PD, Harding HP, Ron D. *Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response*. *J Cell Biol* (2004); 167: 27–33.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. *Cell* (2005); 121: 179–193.
- Ma XM, Blenis J. *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009); 10: 307–318.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. *Biochem J* (2012); 441: 1–21.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C. *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*. *Mol Cancer Ther* (2008); 7: 1851–1863.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. *Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1*. *EMBO J* (2007); 26: 2527–2539.
- Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroemer G. *Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes*. *Cell Death Differ*. (2009); 16: 87–93.
- Majeski AE, Dice JF. *Mechanisms of chaperone-mediated autophagy*. *Int J Biochem Cell Biol* (2004); 36: 2435–2444.
- Mallon R, Feldberg LR, Lucas J, Chaudhary I, Dehnhardt C, Santos ED, Ayralkaloustian S, Venkatesan A, Hollander I. *Antitumor efficacy of PKI-587, a highly potent dual PI3K/mTOR kinase inhibitor*. *Clin Cancer Res* (2011); 17: 3193–3203.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3 kinase/akt pathway*. Mol Cell (2002); 10: 151–162.

Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, Bressanin D, Fini M, McCubrey J. *Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment*. Oncotarget (2012); 3: 371–394.

Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L. *Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutic implications for human acute myeloid leukemia*. Leukemia (2006); 20: 911–928.

Martena JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. *MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB*. Autophagy (2012); 8: 903–914. Martineau Y, Wang X, Alain T, Petroulakis E, Shahbazian D, Fabre B, Bousquet-Dubouch MP, Monsarrat B, Pyronnet S, Sonenberg N. *Control of Paip1-eukaryotic translation initiation factor 3 interaction by amino acids through S6 kinase*. Mol Cell Biol (2014); 34: 1046–1053.

McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/ AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*. Advan Enzyme Regul (2006); 46: 249–279.

Mckay MM, Morrison DK. *Integrating signals from RTK to ERK/MAPK*. Oncogene (2007); 26: 3113–3121.

Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, Montefusco S, Scotto-Rosato A, Prezioso C, Forrester A, Settembre C, Wang W, Gao Q, Xu H, Sandri M, Rizzuto R, De Matteis MA, Ballabio A. *Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB*. Nat Cell Biol (2015); 17: 288–299.

Meloche S, Pouyssegur J. *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition*. Oncogene (2007); 26: 3227–3239.

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci (2011); 36: 320–328.

Meng D, Frank AR, Jewell JL. *mTOR signaling in stem and progenitor cells*. Development (2018); 145: dev152595.

Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. *Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome*. Cell (2014); 156: 771–785.

Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. *A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy*. Autophagy (2014); 5: 649–662.

Merrick WC, Pavitt GD. *Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol (2018); 10: a033092.

Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. *Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum*. Autophagy (2011); 7: 673–682.

Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. *Landscape of phosphatidylinositol-3-kinase pathway alterations across 19784 diverse solid tumors*. JAMA Oncol (2016); 2: 1565–1573.

Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. *Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia*. Blood (2003); 102: 2969–2975.

Mizushima N. *The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation*. Curr Opin Cell Biol (2010); 22: 132–139.

Mizushima N, Komatsu M. *Autophagy: Renovation of cells and tissues*. Cell (2011); 147: 728–741.

Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schweneker M. *Regulation of Raf-Akt Cross-talk*. J Biol Chem (2002); 277: 31099–31106.

Morel E, Mehrpour M, Botti J, Dupont N, Hamai A, Nascimbeni AC, Codogno P. *Autophagy: a druggable process*. Annu Rev Pharmacol Toxicol (2017); 57: 375–398.

Mukherjee R, Vanaja KG, Boyer JA, Chandarlapaty S, Levchenko A, Rosen N. *Regulation of PTEN translation by PI3K signaling maintains pathway homeostasis*. Molecular Cell (2021); 81: 708–723.

Nakayama Y, Plisch EH, Sullivan J, Thomas C, Czuprynski CJ, Williams BRG, Suresh M. *Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection*. PLoS Pathog (2010); 6: e1000966.

Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, Cecconi F. *mTOR inhibits autophagy by controlling*

ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. Nat Cell Biol (2013); 15: 406–416.

Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. *Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein.* J Biol Chem (2007); 282: 13123–13132.

Ofran Y, Tallman MS, Rowe JM. *How I treat acute myeloid leukemia presenting with preexisting comorbidities.* Blood (2016); 128: 488–496.

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. *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.* Cancer Res (2006); 66: 1500–1508.

Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A. *Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways.* Hum Mol Genet (2011); 20: 3852–3866.

Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, Lotfi P, Stinnett GR, Seymour ML, et al. *mTORC1-dependent TFEB activation via AKT inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases.* Nat Commun (2017); 8: 14338.

Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC, Sonenberg N. *mRNA helicases: the tacticians of translational control.* Nat Rev Mol Cell Biol (2011); 12: 235–245.

Parzych KR, Klionsky DJ. *An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation.* Antioxid Redox Signal (2014); 20: 460–473.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.* Cell (2005); 122: 927–939.

Pearce LR, Alton GR, Richter DT, Kath JC et al. *Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 Kinase (S6K1).* Biochem J (2010); 431: 245–255.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. *S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway.* Mol Cell Biol (2004); 24: 3112–3124.

Pfeffer SR. *Rab GTPases: master regulator that establish the secretory and endocytic pathways*. Mol Biol Cell (2017); 28: 712–715.

Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, Torreadell M, Díaz-Beyá M, Camós M, Colomer D, Hoyos M, Sierra J, Esteve J. *Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden LFT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutations: Relevance to post-remission therapy*. Blood (2013); 121: 2734–2738.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DCO, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. Physiol Rev (2010); 90: 1383–1435.

Recher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastra B. *mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia*. Cell Cycle (2005); 4: 1540–1549.

Roboz GJ. *Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia*. Hematol Am Soc Hematol Educ Progr (2011); 2011: 43–50.

Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC, Ferguson SM. *The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis*. Sci Signal (2012); 5: ra42.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*. Nature (1994); 370: 527–532.

Romeo Y, Moreau J, Zindy PJ, Saba-El-Leil M, Lavoie G, Dandachi F, Baptissart M, Borden KLB, Meloche S, Roux PP. *RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth*. Oncogene (2013); 32: 2917–2926.

Rose AJ, Alsted TJ, Jensen TE, Kobbero JB, Maarbjerg SJ, Jensen J, Richter EA. *A Ca²⁺-calmodulin-eEF2K-eEF2 signalling cascade, but not AMPK, contributes to the suppression of skeletal muscle protein synthesis during contractions*. J Physiol (2009); 587: 1547–1563.

Rosenfeldt MT, Ryan KM. *The multiple roles of autophagy in cancer*. Carcinogenesis (2011); 32: 955–963.

- Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci USA (2004); 101: 13489–13494.
- Roux PP, Topisirovic I. *Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation*. Mol Cell Biol (2018); 38: e00070–e00018.
- Rozengurt E. *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. J Cell Physiol (2007); 213: 589–602.
- Rozengurt E, Soares HP, Sinnett-Smith J. *Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: An unintended consequence leading to drug resistance*. Mol Cancer Ther (2014); 13: 2477–2488.
- Sakamoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, Pouleur AC, Dutta A, Prescott AR, Vanoverschelde JL, Ashworth A, Jovanovic A, Alessi DR, Bertrand L. *Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1*. Am J Physiol Endocrinol Metab (2006); 290: E780–E788.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. *Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process*. Ageing Res Rev (2013); 12: 520–534.
- Samuels Y, Velculescu VE. *Oncogenic mutations of PI3KCA in human cancers*. Cell Cycle (2004); 3: 1221–1224.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. *Phosphorylation and regulation of AKT/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science (2005); 307: 1098–1101.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. *A gene network regulating lysosomal biogenesis and function*. Science (2009); 325: 473–477.
- Saultz JN, Garzon R. *Acute myeloid leukemia: a concise review*. J Clin Med (2016); 5: 33.
- Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. *SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis*. Nat Methods (2009); 6: 275–277.

Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinztein DC, Ballabio A. *TFEB links autophagy to lysosome biogenesis*. *Science* (2011); 332: 1429–1433.

Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. *Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2013); 14: 283–296.

Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A. *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB*. *EMBO J* (2012); 31: 1095–1108.

Sha Y, Rao L, Settembre C, Ballabio A, Eissa NT. *STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway*. *EMBO J* (2017); 36: 2544–2552.

Shaw RJ, Cantley LC. *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. *Nature* (2006); 441: 424–430.

Shen HM, Mizushima N. *At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy*. *Trend Biochem Sci* (2014); 39: 61–71.

Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. *Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade*. *Mol Cancer Ther* (2005); 4: 1533–1540.

Shimobayashi M, Hall MN. *Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014); 15: 155–162.

Shin S, Wolgamott L, Roux PP, Yoon SO. *Casein kinase 1epsilon promotes cell proliferation by regulating mRNA translation*. *Cancer Res* (2014); 74: 201–211.

Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux PP, Yoon SO. *Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1*. *Oncogene* (2014); 33: 1690–1699.

Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J, Yoon SO. *Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011); 108: 1204–1213.

- Shuda M, Velasquez C, Cheng E, Cordek DG, Kwun HJ, Chang Y, Moore PS. *CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap dependent protein translation*. Proc Natl Acad Sci U S A (2015); 112: 5875–5882.
- Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. *Ras proteins and their regulators in human disease*. Cell (2017); 170: 17–33.
- Soares HP, Ming M, Mellon M, Young SH, Han L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. *Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2*. Mol Cancer Ther (2015); 14: 1014–1023.
- Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. *Different patterns of AKT and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells*. PLoS One (2013); 8: e57289.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell (2009); 136: 731–745.
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. *The functions and regulation of the PTEN tumor suppressor*. Nat Rev Mol Cell Biol (2012); 13: 283–296.
- Song Y, Zhao Y, Wang F, Tao L, Xiao J, Yang C. *Autophagy in hepatic fibrosis*. Biomed Res Int (2014); 2014: 436242.
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. *Translation regulation of gene expression during conditions of cell stress*. Mol Cell (2010); 40: 228–237.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell (1998); 95: 29–39.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis*. Leukemia (2004); 18: 189–218.
- Stern-Ginossar N, Thompson SR, Mathews MB, Mhor I. *Translation control in virus-infected cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol (2019); 11: a033001.
- Sundström C, Nilsson K. *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer (1976); 17: 565–577.

- Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet P, Cornillet-Lefebvre P, Lioure B, Ugo V, Blanchet O, Ifrah N, Witz F, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D. *Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients*. *Blood* (2007); 110: 1025–1028.
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. *Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice*. *Nature* (2000); 406: 902–906.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. *Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy*. *Autophagy* (2005); 1: 84–91.
- Tanti JF, Jager J. *Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation*. *Curr Opin Pharmacol* (2009); 9: 753–762.
- Tavares MR, Pavan IC, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD, Simabuco FM. *The S6K protein family in health and disease*. *Life Sci* (2015); 131: 1–10.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. *Curr Biol* (2003); 13: 1259–1268.
- Tsuchiya S, *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *Int J Cancer* (1980); 26: 171–176.
- Valasek LS, Zeman J, Wagner S, Beznoskova P, Pavlikova Z, Mohammad MP, Hronova V, Herrmannova A, Hashem Y, Gunisova S. *Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle*. *Nucleic Acids Res* (2017); 45: 10948–10968.
- Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. *Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex*. *J Biol Chem* (2001); 276: 48627–48630.
- Vega-Rubin-de Celis S, Peña-Llopis S, Konda M, Brugarolas J. *Multistep regulation of TFEB by mTORC1*. *Autophagy* (2017); 13: 464–472.
- Velasquez C, Cheng E, Shuda M, Lee-Oesterreich PJ, Pogge von Strandmann L, Gritsenko MA, Jacobs JM, Moore PS, Chang Y. *Mitotic protein kinase CDK1*

phosphorylation of mRNA translation regulator 4E-BP1 Ser83 may contribute to cell transformation. Proc Natl Acad Sci U S A (2016); 113: 8466–8471.

Venkatesan AM, Dehnhardt CM, Delos Santos E, Chen Z, Dos Santos O, Ayralkaloustian S, Khafizova G, Brooijmans N, Mallon R, Hollander I, Feldberg L, Lucas J, Yu K, Gibbons J, Abraham RT, Chaudhary I, Mansour TS. *Bis(morpholino-1,3,5-triazine) derivatives: potent adenosine 50-triphosphate competitive phosphatidylinositol-3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors: discovery of compound26 (PKI-587), a highly efficacious dual inhibitor.* J Med Chem (2010); 53: 2636–2645.

Wallin JJ, Edgar KA, Guan J, Berry M, Prior WW, Lee L, Lesnick JD, Lewis C, Nonomiya J, Pang J, Salphati L, Olivero AG, Sutherlin DP, O'Brien C, Spoerke JM, Patel S, Lensun L, Kassees R, Ross L, Lackner MR, Sampath D, Belvin M, Friedman LS. *GDC-0980 is a novel class I PI3K/mTOR kinase inhibitor with robust activity in cancer models driven by the PI3K pathway.* Mol Cancer Ther (2011); 10: 2426–2436.

Walter P, Ron D. *The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation.* Science (2011); 334: 1081–1086.

Wan W, You ZY, Zhou L, Xu YF, Peng C, Zhou TH, Yi C, Shi Y, Liu W. *mTORC1-Regulated and HUWE1-Mediated WIPI2 Degradation Controls Autophagy Flux.* Mol Cell (2018); 72: 303.

Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y, Lv Q, Chen X, Zhang Z. *The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases.* Cells (2019); 8: 1597.

Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. *Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation.* Science (2012); 338: 956–959.

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

Wang X, Regufe da Mota S, Liu R, Moore CE, Xie J, Lanucara F, Agarwala U, Pyrdit Ruys S, Vertommen D, Rider MH, Eyers CE, Proud CG. *Eukaryotic elongation factor 2 kinase activity is controlled by multiple inputs from oncogenic signaling.* Mol Cell Biol (2014); 34: 4088–4103.

Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.* Biochem Soc Trans (2006); 34: 7–11.

- White E. *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer (2012); 12: 401–410.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. Cell Metab (2005); 2: 21–33.
- Xie J, Wang X, Proud CG. *Who does TORC2 talk to?* Biochem J (2018); 475: 1721–1738.
- Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. *Survival of acute myeloid leukemia cells require PI3K activation*. Blood (2003); 102: 972–980.
- Yang F, Qian XJ, Qin W, Deng R, Wu XQ, Qin J, Feng GK, Zhu XF. *Dual phosphoinositide3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 has a therapeutic potential and sensitizes cisplatin in nasopharyngeal carcinoma*. PLoS ONE (2013); 8: e59879.
- Yang H, Jiang X, Li B, Yang HJ, Miller M, Yang A, Dhar A, Pavletich NP. *Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40*. Nature (2017); 552: 368–373.
- Yang J, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q et al. *ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation*. Nat Cell Biol (2008); 10: 138–148.
- Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. *Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity*. Genes Dev (2006); 20: 2820–2832.
- Yang Y, Wang Z. *IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome*. J Mol Cell Biol (2019); 11: 911–919.
- Yu L, Chen Y, Tooze SA. *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. Autophagy (2018); 14: 207–215.
- Yuan HX, Russell RC, Guan KL. *Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy*. Autophagy (2013); 9: 1983–1995.
- Yun CW, Lee SH. *The Roles of Autophagy in Cancer*. Int J Mol Sci (2018); 19: 3466.
- Zeng Y, Overmeyer JH, Maltese WA. *Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking*. J Cell Sci (2006); 119: 259–270.

Zhao L, Vogt PK. *Class I PI3K in oncogenic cellular transformation*. *Oncogene* (2008); 27: 5486–5496.

Zhen Y, Stenmark H. *Cellular functions of Rab GTPases at a glance*. *J Cell Sci* (2015); 128: 3171–3176.

Zimmermann S, Moelling K. *Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B)*. *Science* (1999); 286.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011); 12: 21–35.