

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑΣ ΤΟΥ ΛΥΚΟΥ ΚΑΙ ΣΕ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ
ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

&

ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΓΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ

Ε. Δαφνής Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

Χ. Στουρνάρας Καθηγητής Βιοχημείας

Π. Θεοδωρόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν καθοιονδήποτε τρόπο.

Καταρχάς τον διευθυντή μου και επίκουρο καθηγητή νεφρολογίας κ. Ευγένιο Δαφνή, δάσκαλο και εμπνευστή από τα πρώτα μου βήματα στο χώρο της νεφρολογίας.

Τον αείμνηστο καθηγητή κ. Δημήτρη Εμμανουήλ που μου ενέπνευσε την αγάπη στην Ιατρική και στη Νεφρολογία.

Τον καθηγητή κ. Νικόλαο Τσαπάρα για την προσπάθεια που κατέβαλε κατά τη διάρκεια της θητείας του ως διευθυντής της νεφρολογικής κλινικής για τη δημιουργία ενός σύγχρονου και παραγωγικού εργαστηρίου νεφρολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης. Επίσης για την πίστη του στις δυνατότητες και τη συνεχή υποστήριξη του, στο σύνολο των μελών του εργαστηρίου και της κλινικής.

Τους φίλους και συνεργάτες στο εργαστήριο νεφρολογίας, Ιωάννη Πετράκη, Βασιλική Μαυροειδή, Σταύρο Στρατάκη, Θεοδώρα Κατσαρού, Τάσο Ζωγραφίδη και Μαρτίνα Σαμιωτάκη, χωρίς την άοκνη υποστήριξη και τις εξαιρετικές ικανότητες των οποίων, θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τους φίλους και συνεργάτες στη νεφρολογική κλινική του ΠΑΓΝΗ, Ελευθερία Βαρδάκη, Κων/νο Περάκη και Σπύρο Στρατήγη, για την ηθική και έμπρακτη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής μου.

Τους καθηγητές κ Γεώργιο Χαλεπάκη, κ. Δημήτριο Μπούμπα, κ. Λύδια Νακοπούλου και τον παθολογοανατόμο Κων/νο Γιαννακάκη για την έμπρακτη υποστήριξη και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους σχετικά με τη διενέργεια των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος ευχαριστώ τη σύζυγό μου και συνάδελφο γαστρεντερολόγο Αγγελική Θεοδωροπούλου και τα παιδιά μας Γιώργο και Γιάννη για την υποστήριξη και την υπομονή τους.

Ηράκλειο 26-11-2010

Περιεχόμενα

A. Εισαγωγή

B. Περίληψη Ειδικού Μέρους

1α. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε φυσιολογικά ποντίκια.

1β. Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract)

2α. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε ποντίκια με νεφρίτιδα του Λύκου

2β. Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract)

Γ. Γενικό Μέρος

1. Ιστολογία του νεφρικού σπειράματος

1.1 Αδρή ιστολογική υφή του σπειράματος

1.2 Σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

1.2.1 Ανάπτυξη των ποδοκυττάρων

1.2.2 Δομή των ποδοκυττάρων

1.3 Βασική μεμβράνη του σπειράματος

1.4 Ενδοθηλιακά κύτταρα

1.5 Μεσάγγειο

2. Σπειραματικός ηθμός

2.1 Μοριακή δομή και βιολογία του σπειραματικού ηθμού

2.2 Οι πρωτεΐνες της πλαγίας επιφάνειας (διάφραγμα σχισμής διήθησης)

2.2.1 Νεφρίνη

2.2.2 Ποδοσίνη

2.2.3 CD2AP

2.2.4 ZO-1

2.2.5 FAT

2.2.6 P-καντερίνη

2.2.7 NEPH1

2.2.8 Densin

2.3 Πρωτεΐνες της κορυφαίας (αυλικής) επιφάνειας

2.3.1 Ποδοκαλυξίνη

2.3.2 Εζρίνη

2.3.3 NHERF2

2.3.4 Μεγκαλίνη

2.4 Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας

2.4.1 Ιντεγκρίνες

2.4.2 Δυστρογλυκάνη

2.4.3 Ρόλος των πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας

2.4.4 Κινάση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη (ILK)

2.5 Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων

2.5.1 Λειτουργίες του κυτταροσκελετού

2.5.2 F-ακτίνη (πολυμερής ακτίνη)

2.5.3 Συναπτοποδίνη

2.5.4 α-ακτινίνη-4

2.5.5 Rho κινάση

2.5.6 Φωσφατάσες

2.6 Σπειραματική βασική μεμβράνη

2.7 Συμπεράσματα

3. Η κινάση mTOR

3.1 mTOR: ένας κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού

3.2 Το σύμπλεγμα mTORC1

3.3 Το σύμπλεγμα mTORC2

3.4 Υπερκείμενοι ρυθμιστές της mTOR

3.4.1 Ρύθμιση της mTOR από θρεπτικές ουσίες

3.4.2 Ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες

3.4.3 Ρύθμιση της mTOR από τον ενεργειακό μεταβολισμό

3.4.4 Ρύθμιση της mTOR από το μονοπάτι των MAP κινασών

3.4.5 Ρύθμιση της mTOR από το μονοπάτι του TNFα.

3.5 Υποκείμενοι στόχοι της mTOR

3.5.1 Ρύθμιση της μετάφρασης

3.5.2 4E-BPs

3.5.3 S6K

3.5.4 S6K και το σύμπλοκο της ελικάσης του RNA

3.5.5 S6K, PDCD4 και eEF2K

3.5.6 Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)

3.6 Στόχοι της mTOR που σχετίζονται με τη μεταγραφή

4. Φαρμακολογία της ραπαμυκίνης (rapamycin ή sirolimus) και καθιερωμένες κλινικές εφαρμογές

- 4.1 Μηχανισμός δράσης
- 4.2 Φαρμακοκινητική
- 4.3 Μεταβολισμός
- 4.4 Μεταμόσχευση νεφρού σε ενήλικες
- 4.5 Ανεπιθύμητες ενέργειες
- 4.6 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις
- 4.6 Η χρήση της ραπαμυκίνης στη νεφρική μεταμόσχευση

5. Θεραπευτικές εφαρμογές της ραπαμυκίνης σε νεφρικές παθήσεις πέραν της μεταμόσχευσης νεφρού

- 5.1 Κύτταρα που παρουσιάζουν ευαισθησία στις επιδράσεις του sirolimus
- 5.2 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε ενδογενή νεφρικά κύτταρα
- 5.3 Επίδραση της ραπαμυκίνης στο φυσιολογικό νεφρό
 - 5.3.1 Σε ζώα
 - 5.3.2 Σε ανθρώπους
- 5.4 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στους πολυκυστικούς νεφρούς
- 5.5 Επίδραση της ραπαμυκίνης στον καρκίνο του νεφρού
 - 5.5.1. Διαυγοκυτταρικός νεφρικός καρκίνος
 - 5.5.2 Νεφρικοί όγκοι σχετιζόμενοι με οζώδη σκλήρυνση
- 5.6. Επίδραση της ραπαμυκίνης στην οξεία νεφρική βλάβη (ONB)
 - 5.6.1. Ζωικά πρότυπα
 - 5.6.2. Μελέτες σε ανθρώπους

6. Η επίδραση της ραπαμυκίνης σε πειραματικές παθήσεις.

6.1. Ζωικά πρότυπα

6.1.1. Πειραματικές παθήσεις που συνοδεύονται από νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία χωρίς υπερπλασία πειραματικών κυττάρων

6.1.2. Μεσαγγειοπερπλαστική ΣΝΦ (μοντέλο Anti-thy1)

6.1.3. Πειραματική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια

6.1.4. Πειραματικά πρότυπα νεφρίτιδας του λύκου (ΝΛ) σε επίμυες

6.1.5. Μηνοειδής ΣΝΦ

6.2. Μελέτες σε ανθρώπους

7. Επίδραση της ραπαμυκίνης στη διαβητική νεφροπάθεια

7.1. Ζωικά πρότυπα

7.2. Μελέτες σε ανθρώπους

8. Επίδραση της ραπαμυκίνης σε μη διαβητική χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ)

8.1. Ζωικά πρότυπα

8.1.1. Μονόπλευρη νεφρεκτομή

8.1.2. Πειραματικό πρότυπο εναπομείναντος νεφρού

8.1.3. Μονόπλευρη απόφραξης ουρητήρα

8.1.4. Άλλα πρότυπα

8.2. Δυνητική χρησιμότητα της ραπαμυκίνης στην ΧΝΝ του ανθρώπου

8.2.1. Επίδραση στην απώλεια της νεφρικής λειτουργίας σε ΧΝΝ

8.2.2. Επίδραση στην πρωτεϊνουρία σε ΧΝΝ

9. Συστηματικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης με πιθανή επίδραση στη νεφρική λειτουργία.

9.1. Υπέρταση

9.2. Υπερλιπιδαιμία

9.3. Υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη

10. Περίληψη και συμπεράσματα γενικού μέρους

Δ. Ειδικό Μέρος

Δ1. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε φυσιολογικά ποντίκια

1.1 Εισαγωγή

1.2 Υλικά και μέθοδοι

1.3 Αποτελέσματα

1.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Δ2. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε ποντίκια με νεφρίτιδα του Λόκου

2.1 Εισαγωγή

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.3 Αποτελέσματα

2.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Ε. Βιβλιογραφία

A. Εισαγωγή

Η ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας ή νεφρώνιο. Κάθε νεφρός αποτελείται από χιλιάδες νεφρώνια. Κάθε νεφρώνιο αποτελείται από ένα αγγειώδες σπείραμα και ένα νεφρικό σωληνάριο τα οποία συνδέονται μεταξύ τους στον ουρικό πόλο του σπειράματος. Τα σπειράματα είναι υπεύθυνα για την υπερδιήθηση του αίματος και την παραγωγή του πρώιμου διηθήματος ή προσούρου. Το πρώιμο διήθημα εισέρχεται ακολούθως στα νεφρικά σωληνάρια όπου υφίσταται συνεχή επεξεργασία για την παραγωγή του τελικού προϊόντος, δηλαδή των ούρων. Η επεξεργασία του πρώιμου διηθήματος στα σωληνάρια συνίσταται σε σημαντική συμπύκνωση των ούρων με παράλληλη ανάκτηση χρήσιμων ουσιών και αποβολή άχρηστων ουσιών και προϊόντων του μεταβολισμού. Η διήθηση του αίματος στο σπείραμα γίνεται μέσω ενός σύνθετου «φίλτρου», που ονομάζεται σπειραματικός ηθμός και ως διαδικασία είναι εξαιρετικά πολύπλοκη εξαρτώμενη από αιμοδυναμικούς, χυμικούς, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο σπειραματικός ηθμός αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: το ενδοθήλιο των τριχοειδών του σπειράματος, τη βασική μεμβράνη των τριχοειδών και τα επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα) που εφάπτονται στην έξω επιφάνεια της σπειραματικής βασικής μεμβράνης. Η υπερδιήθηση του αίματος είναι συνεχής και ο διηθούμενος όγκος υγρών είναι πολύ μεγάλος (π.χ στον άνθρωπο είναι περίπου 180 λίτρα την ημέρα). Η παρουσία επομένως στο αίμα βλαπτικών ουσιών (π.χ τοξίνες, αυτοαντισώματα, φάρμακα) συχνά επιβαρύνει ασύμμετρα τους νεφρούς σε σχέση με άλλα όργανα, οδηγώντας έτσι σε νεφρική νόσο. Οι νεφρικές παθήσεις χωρίζονται αδρά σε σπειραματικές και σωληναριακές, αν και συχνά συνυπάρχουν και οι δύο μορφές. Οι σπειραματικές παθήσεις χωρίζονται επίσης σε δυο μεγάλες κατηγορίες, το νεφριτιδικό σύνδρομο και το νεφρωσικό σύνδρομο. Το πρώτο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φλεγμονωδών και υπερπλαστικών βλαβών στα σπειράματα με ποικίλη προσβολή των σπειραματικών κυττάρων και οδηγεί στην εμφάνιση αιματουρίας, λευκωματουρίας και σχετικά ταχείας απώλειας της σπειραματικής διήθησης και της νεφρικής λειτουργίας. Το νεφρωσικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από εκλεκτική βλάβη του σπειραματικού ηθμού και κυρίως των ποδοκυττάρων, χωρίς σημαντική παρουσία φλεγμονωδών ή υπερπλαστικών βλαβών.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης βλάβης στο πειραματικό ηθμό και στην παθογένεια της λευκωματουρίας. Η αποκάλυψη της σημασίας των ποδοκυττάρων, των μηχανισμών αλληλεπίδρασης με τα υπόλοιπα δομικά και κυτταρικά στοιχεία που συνιστούν τον ηθμό αλλά και μιας σειράς πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οργάνωση και λειτουργία του ηθμού (όπως π.χ η νεφρίνη και ποδοσίνη), έχει δώσει σημαντική ώθηση στην κατανόηση της παθογένειας τόσο του νεφρωσικού όσο και του νεφριτιδικού συνδρόμου. Παράλληλα η εμφάνιση νέων φαρμάκων που άλλοτε δρουν ευεργετικά σε πειραματοπάθειες και άλλοτε τοξικά για τα πειράματα, προσφέρει νέες προκλήσεις για ερευνητές και κλινικούς γιατρούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ραπαμυκίνη που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων και στη θεραπεία διαφόρων νεοπλασμάτων. Η ουσία αυτή βρέθηκε αρχικά να αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκήτων και λίγο αργότερα τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε και η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη-στόχος που αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη, η κινάση mTOR (mammalian target of rapamycin). Σχετικά πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η ραπαμυκίνη αναστέλλει την mTOR όταν αυτή είναι συνδεδεμένη σε μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται συλλήβδην σύμπλεγμα-1 της mTOR (mTORC1), ενώ δεν την αναστέλλει όταν είναι συνδεδεμένη στο έτερο σύμπλεγμα πρωτεϊνών της mTOR, το mTORC2. Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ραπαμυκίνης οφείλεται στην αναστολή της μεταφοράς σήματος από υπερκείμενους ρυθμιστές (όπως οι αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες), σε υποκείμενες κινάσες που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση (πρωτεϊνοσύνθεση), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό λιπιδίων και γλυκόζης, την αυτοφαγία και την απόπτωση. Ο κυριότερος φυσιολογικός ρυθμιστής της λειτουργίας του mTORC1 στα κύτταρα είναι οι υπερκείμενες κινάσες PI3K και Akt, οπότε σήμερα έχει καθιερωθεί πλέον η ύπαρξη ενός νέου ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού, του PI3K/Akt/mTOR. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η ραπαμυκίνη δεν αναστέλλει απλά τη μεταφορά μηνυμάτων στο επίπεδο της mTOR αλλά έχει και άμεση επίδραση σε συστατικά του μονοπατιού, όπως η Akt και η mTOR, τόσο σε επίπεδο έκφρασης όσο και σε επίπεδο ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης). Οι διάφοροι ιστοί ή κύτταρα παρουσιάζουν διάφορου βαθμού ενεργοποίηση του μονοπατιού σε φυσιολογικές ή/και παθολογικές καταστάσεις, διαθέτουν δε διαφορετική ευαισθησία στη

ραπαμυκίνη καθώς και μηχανισμούς διαφυγής από τη δράση της. Πολύ πρόσφατα δεδομένα δείχνουν επίσης, ότι οι πρωτεΐνες του διαφράγματος της λεπτής σχισμής των ποδοκυττάρων, νεφρίνη και ποδοσίνη, ασκούν ρυθμιστική δράση στα ποδοκύτταρα μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR. Τα δεδομένα αυτά είναι όμως πολύ πρώιμα και ο ειδικός ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στη λειτουργία των ποδοκυττάρων τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις είναι ουσιαστικά άγνωστος.

Η ραπαμυκίνη μετά τη σχετική επιτυχία της στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων άρχισε να δοκιμάζεται και σε πειραματικά πρότυπα διαφόρων νεφρικών παθήσεων καθώς και σε ασθενείς με σπειραματοπάθειες. Προς την κατεύθυνση αυτή συνέβαλλε το γεγονός ότι η ραπαμυκίνη αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα του πολλαπλασιασμού των ανοσοποιητικών κυττάρων και των παρεγχυματικών νεφρικών κυττάρων. Όμως, παρά την αρχική επιτυχία στη μεταμόσχευση και την αίσθηση ότι στερείται νεφροτοξικής δράσης, σύντομα έγινε αντιληπτό ότι σε ορισμένους ασθενείς και σε ορισμένα πειραματικά πρότυπα εμφανίζει νεφροτοξικότητα είτε υπό τη μορφή της επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας είτε υπό τη μορφή της πρωτεϊνουρίας.

Σε φυσιολογικούς νεφρούς η ραπαμυκίνη θεωρείται γενικά μη τοξική αλλά η άποψη αυτή στηρίχθηκε σε προκαταρκτικά πειράματα σε ορισμένα μόνο είδη ζώων και πριν την ευρεία κλινική της εφαρμογή. Σε πάσχοντες νεφρούς η χρήση της βρέθηκε να είναι άλλοτε ωφέλιμη και άλλοτε βλαπτική, αναλόγως του τύπου της αρχικής νεφρικής νόσου. Οι επιδράσεις της ραπαμυκίνης είναι δύσκολο να προβλεφθούν και συχνά τα αποτελέσματα της χορήγησής της είναι αντιφατικά, τόσο σε πειραματικά πρότυπα όσο και σε ανθρώπους, γεγονός που έχει περιορίσει τον αρχικό ενθουσιασμό για τη χρήση της. Μία πιθανή εξήγηση για τα αντιφατικά αποτελέσματα αποτελεί ίσως η δόση που χρησιμοποιείται (ή τα επίπεδα στο αίμα και στους ιστούς) καθώς και η διάρκεια χορήγησής της.

Οι παραπάνω διαπιστώσεις για το διττό ρόλο της ραπαμυκίνης, αποτέλεσαν τον κύριο ερευνητικό στόχο της παρούσας διατριβής. Ποιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν να μελετηθούν **α)** η πιθανή νεφροτοξική της δράση σε υγιή ποντίκια και **β)** η πιθανή θεραπευτική της δράση σε πειραματικό πρότυπο μιας κλασσικής υπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας με πρωτεϊνουρία όπως είναι η νεφρίτιδα του Λύκου.

Και στις δυο περιπτώσεις εξετάστηκαν παράλληλα οι επιδράσεις του φαρμάκου στην έκφραση των πρωτεϊνών νεφρίνη και ποδοσίνη καθώς και οι επιδράσεις στη

δραστηριότητα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR. Η επιλογή των πρωτεϊνών αυτών βασίστηκε στο γεγονός ότι οι δυο πρώτες συμβάλλουν στη φυσιολογική λειτουργία του πειραματικού ηθμού, ενώ οι τελευταίες σε μεγάλη ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών περιλαμβανομένης της μεταγραφής, της μετάφρασης, του πολλαπλασιασμού και της ρύθμισης του κυτταροσκελετού σε πληθώρα κυττάρων. Επίσης οι κινάσες Akt και mTOR αποτελούν βασικό στόχο της ραπαμυκίνης και υπάρχουν ενδείξεις ότι συνδέονται λειτουργικά με τη νεφρίνη και την ποδοσίνη των ποδοκυττάρων. Η σύνδεση αυτή όμως δεν έχει καταδειχθεί σε ιστολογικό επίπεδο μέχρι σήμερα, και παραμένει άγνωστο σε ποιο ή ποια κυτταρικά διαμερίσματα του πειράματος εκφράζονται οι κινάσες αυτές. Εφόσον η ραπαμυκίνη είναι σε θέση αφενός να προκαλεί πρωτεϊνουρία και αφετέρου να δρα θεραπευτικά σε ορισμένες πρωτεϊνουρικές καταστάσεις θα πρέπει οι πρωτεΐνες στόχοι της να συμμετέχουν στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων του πειραματικού ηθμού ή να διαταράσσονται σε παθολογικές καταστάσεις. Για τους παραπάνω λόγους ήταν αναγκαίο να μελετηθεί η δράση της τόσο σε υγιή (μελέτη τοξικότητας) όσο και σε πάσχοντα πειράματα (μελέτη θεραπευτικής επίδρασης). Οι δύο αυτές μελέτες περιγράφονται περιληπτικά στην επόμενη ενότητα.

B. Περίληψη ειδικού μέρους

1. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε φυσιολογικά ποντίκια

Εισαγωγή: Στα φυσιολογικά νεφρά η ραπαμυκίνη θεωρείται μη νεφροτοξική αλλά η άποψη αυτή στηρίχθηκε σε ορισμένα μόνο είδη ζώων. Σε πάσχοντα νεφρά η ραπαμυκίνη είναι άλλοτε ωφέλιμη και άλλοτε βλαπτική, αναλόγως του τύπου της νεφρικής βλάβης. Μία πιθανή εξήγηση για τα αντιφατικά αποτελέσματα αποτελεί ίσως η δόση που χρησιμοποιείται καθώς και η διάρκεια χορήγησης.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε α) το αν η ραπαμυκίνη (σιρολίμη) είναι η όχι νεφροτοξική σε φυσιολογικά ποντίκια. Balb/c. β) να καθορίσουμε τις κλινικές εκδηλώσεις της νεφροτοξικότητας, δηλαδή εμφάνιση πρωτεϊνουρίας ή μείωση της σπειραματικής διήθησης. γ) στην περίπτωση που η ραπαμυκίνη είναι νεφροτοξική να καθορίσουμε το αν η τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη. δ) στην περίπτωση που η ραπαμυκίνη προκαλεί σπειραματική λευκοματουρία να μελετήσουμε τους μηχανισμούς δυσλειτουργίας των ποδοκυττάρων

Μέθοδοι: Σε ποντίκια Balb/c ηλικίας 2 μηνών χορηγήθηκαν 3 διαφορετικές δόσεις ραπαμυκίνης ενδοπεριτοναϊκά για 1 εβδομάδα (χαμηλή δόση ΧΔ: 1, ενδιάμεση δόση ΕΔ: 1.5, και υψηλή δόση ΥΔ: 3 mg/kg ΒΣ/ημέρα, 4 ποντίκια σε κάθε ομάδα – μοντέλο δόσης ΜΔ). Μια ενδιάμεση δόση ραπαμυκίνης (1.5mg/kg/ημέρα) χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά για 3 διαφορετικές περιόδους (σύντομη χορήγηση ΣυΧ: για 1 εβδομάδα, ενδιάμεση χορήγηση ΕνΧ: για 4 εβδομάδες και μακροχρόνια χορήγηση ΜαΧ: για 8 εβδομάδες, 4 ποντίκια σε κάθε ομάδα – μοντέλο χρόνου ΜΧ). Έξι ποντίκια έλαβαν μόνο το έκδοχο (DMSO) και χρησίμευσαν ως ομάδα ελέγχου (ΟΕ).

Η πρωτεΐνη ούρων 24ωρου και το σωματικό βάρος προσδιορίστηκαν στην αρχή της μελέτης και ανά εβδομάδα. Η αλβουμίνη ούρων 24ωρου στην αρχή και στο τέλος της μελέτης. Τα επίπεδα ραπαμυκίνης και κρεατινίνης στο αίμα προσδιορίστηκαν κατά τη θυσία. Η ιστολογία των νεφρών εξετάστηκε με φωτονικό (ΦΜ) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΗΜ) και με ανοσοφθορισμό (ΑΦ) για τις πρωτεΐνες νεφρίνη και ποδοσίνη. Επίσης έγινε WB & RT-PCR για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής και

γονιδιακής έκφρασης της νεφρίνης και ποδοσίνης. Τέλος η σπειραματική έκφραση της κινάσης Akt και η φωσφορυλίωσή της εξετάστηκαν με WB.

Αποτελέσματα: Όλα τα ζώα που έλαβαν θεραπεία παρουσίασαν μείωση της αποβολή ολικής πρωτεΐνης στα ούρα κατά τη διάρκεια της μελέτης, ενώ παρουσίασαν αύξηση της αλβουμινουρίας στατιστικά σημαντική για τις ομάδες ΥΔ και ΕνΧ. Η νεφρική λειτουργία και το σωματικό βάρος παρουσίασαν ελαφρά-μέτρια μείωση κυρίως στην ομάδα της ΥΔ (Κρεατινίνη ορού: 0.34 ± 0.03 vs. 0.24 ± 0.01 mg/dl στην ΟΕ, $p < 0.01$). Στο ΗΜ παρατηρήσαμε μια αύξηση της μέσης τιμής του πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων την 1^η εβδομάδα (ΟΕ 335nm, ΧΔ 385nm, ΕΔ&ΣυΧ 420nm, ΥΔ 420nm), η οποία επιδεινώθηκε περαιτέρω την 4^η εβδομάδα χορήγησης (ΕνΧ 456nm) και τελικά βελτιώθηκε την 8^η εβδομάδα (ΜαΧ 401nm). Τα επίπεδα mRNA της νεφρίνης και ποδοσίνης παρουσίασαν σημαντική πτώση την 1^η εβδομάδα (40-60% χαμηλότερα από την ΟΕ, όλα τα $p < 0.001$), ανεξαρτήτως χορηγούμενης δόσης, στη συνέχεια την 4^η εβδομάδα βελτιώθηκαν και επανήλθαν στο φυσιολογικό την 8^η εβδομάδα. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών νεφρίνης και ποδοσίνης παρουσίασαν οριακή πτώση την 4^η εβδομάδα και αποκαταστάθηκαν πλήρως την 8η εβδομάδα, ενώ στον ανοσοφθορισμό εκφράστηκαν φυσιολογικά στην περιφέρεια των τριχοειδικών αγκυλών. Τα επίπεδα της ολικής Akt παρέμειναν σταθερά και στα 2 μοντέλα αλλά η φωσφορυλίωσή της στη θέση Ser473 αυξήθηκε μέτρια στην ομάδα της ΥΔ και σημαντικά στις ομάδες ΕνΧ και ΜαΧ ($p < 0.005$)

Συμπεράσματα: Και στα δυο μοντέλα δόσης και χρόνου, παρατηρήσαμε σημαντικές μεταβολές στη νεφρική λειτουργία, στην αρχιτεκτονική των ποδοκυττάρων, στη μεταγραφή των πρωτεϊνών του λεπτού διαφράγματος και στη σπειραματική ενεργοποίηση της Akt. Οι μεταβολές αυτές παρατηρήθηκαν κυρίως στον πρώτο μήνα θεραπείας ενώ μακροπρόθεσμα βελτιώθηκαν σχεδόν πλήρως, υποδηλώνοντας πιθανά την ύπαρξη ενός φαινομένου «διαφυγής» από τη δράση της ραπαμυκίνης. Η αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt πιθανά σχετίζεται με μεταβολές της έκφρασης των πρωτεϊνών του λεπτού διαφράγματος ή την ενεργοποίηση κάποιας από τις κινάσες PDK2. Ωστόσο είναι άγνωστο αν η ενεργοποίηση της Akt συμμετέχει απλά στην παθογένεια των ιστολογικών μεταβολών των σπειραματικών κυττάρων και δη των ποδοκυττάρων ή αποτελεί αντιρροπιστικό μηχανισμό που συμβάλλει στην τελική αποκατάσταση της βλάβης.

Abstract: The effect of rapamycin in the structure and function of glomerular epithelial cells in normal mice.

Introduction: In the normal kidney, rapamycin is considered to be non-nephrotoxic based on initial studies in some animal species. In the diseased kidney, rapamycin may be beneficial or detrimental, depending on the type of renal injury. One explanation for the conflicting results maybe either the dose used, or the duration of rapamycin administration. The current study was undertaken a) to examine whether or not sirolimus is indeed non-nephrotoxic in normal Balb/c mice b) to define the clinical manifestations of the nephrotoxicity, proteinuria or decline of GFR c) in case that rapamycin is nephrotoxic to determine whether the toxicity is dose or time dependent d) in case that rapamycin induces glomerular proteinuria to study the molecular mechanisms of podocyte dysfunction

Methods: Two months old Balb/c mice were given three different doses of rapamycin i.p for 1 week (LD:1, ID:1.5, and HD:3mg/kgBW/day, 4 mice in each group - dose model). An intermediate dose of rapamycin (1.5mg/kg) was given i.p for three different periods 1, 4 and 8 weeks (4 mice in each group,-time model). Six Balb/c mice were injected with the rapamycin solvent (DMSO) and served as controls.

The 24h urine protein excretion and BW were estimated weekly. The 24h urine albumin excretion was measured at the beginning and the end of the study. Rapamycin and creatinine blood levels (Cr) were measured at sacrifice. Kidney morphology was examined by light microscopy, electron microscopy (EM) and immunofluorescence (IF for nephrin and podocin). WB & RT-PCR were performed to examine the expression of the slit diaphragm proteins nephrin and podocin. Glomerular Akt kinase expression and phosphorylation was examined by WB.

Results: All treated animals reduced urine protein excretion throughout the course of the study while urine albumin was increased statistically significantly in the HD and 4-weeks groups. Renal function and body weight showed a mild to moderate decline especially in the HD group (Cr: 0.34 ± 0.03 vs. 0.24 ± 0.01 mg.dl in controls, $p<0.01$). By EM, we noticed an increase in the mean foot process width on the first week (controls 335nm, LD 385nm, ID 420nm, HD 420nm), which was further deteriorated on the 4th week (456nm) and finally improved on week 8 (401nm). Podocin and Nephrin mRNA levels both showed a significant (40-60% lower vs. control, all

p<0.001) and dose-independent decrease on the first week, which improved on the 4th week and was restored to normal on week 8. Nephrin and podocin protein levels showed a more delayed and less pronounced decline (relative to mRNA levels) while on IF they were normally expressed in the periphery of the capillary loops. Total Akt levels remained stable in both models but Ser473phospho-Akt increased slightly in the HD group and significantly (p<0.005) in the 4 and 8-weeks groups.

Conclusions: In both models, significant alterations were noticed in kidney function, podocyte architecture, slit diaphragm proteins transcription and glomerular Akt activation. These alterations occurred mainly during the first month of treatment while they were completely restored in the long term, indicating that a rapamycin “escape phenomenon” may exist. The observed increase in Akt phosphorylation may be related to the concomitant alterations of the slit diaphragm proteins or the induction of a member of the PDK2s family of kinases. It is not clear though, if it is part of the pathogenetic mechanism for the observed glomerular alterations especially in podocytes or it represents a compensatory mechanism eventually leading to resolution of the lesions.

2. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε ποντίκια με νεφρίτιδα του Λύκου

Εισαγωγή: Ο αναστολέας της mTOR ραπαμυκίνη έχει φανεί να αναστέλλει την εξέλιξη της νεφρίτιδας του Λύκου (ΝΛ) σε τρωκτικά, χάρη στις ισχυρές ανοσοκατασταλτικές της ιδιότητες. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων/Akt (PI3K/Akt) αποτελεί τον κυριότερο υπερκείμενο ρυθμιστή της δραστηριότητας της mTOR και εμπλέκεται στην προαγωγή της νεοπλασίας και της αυτοανοσίας. Η δραστηριότητα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR στη νεφρίτιδα του λύκου δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Μέθοδοι: Σε NZBW/F1 θηλυκά ποντίκια, εξετάσαμε τη σπειραματική έκφραση των κινασών Akt και mTOR με ανοσοφθορισμό και western blot. Ελέγξαμε επίσης για συγκεκριμένες φωσφορυλιώσεις των κινασών αυτών που συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR. Χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά ραπαμυκίνη για 4μήνες, ξεκινώντας είτε πριν (προληπτική ομάδα, PG) είτε μετά την ανάπτυξη παθολογικής πρωτεϊνουρίας (>20 mg/ημέρα, θεραπευτική ομάδα, TG). Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μη πρωτεϊνουρικά ποντίκια χωρίς θεραπεία (ομάδα υγιών μυών, HC) και πρωτεϊνουρικά ποντίκια με ΝΛ χωρίς θεραπεία (ομάδα λύκου, UG).

Αποτελέσματα: Βρήκαμε ότι στα μη θεραπευμένα ζώα, σε αντίθεση με τα υγιή, οι Akt και mTOR υπερεκφράζονται και είναι φωσφορυλιωμένες σε θέσεις κλειδιά για την ενεργοποίησή τους. Η ραπαμυκίνη παρατείνει την επιβίωση, διατηρεί φυσιολογική τη νεφρική λειτουργία, ομαλοποιεί την πρωτεϊνουρία, αποκαθιστά τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης, μειώνει τους τίτλους των anti-dsDNA, προλαμβάνει ή εξαλείφει τις ιστολογικές βλάβες και περιορίζει την έκφραση και ενεργοποίηση των κινασών Akt and mTOR στα σπειράματα.

Συμπεράσματα: Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι: 1) Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νεφρίτιδας του λύκου σε ποντίκια NZBW γεγονός που δικαιολογεί τη χορήγηση θεραπείας με ραπαμυκίνη. 2) Στη νεφρίτιδα του λύκου, η ραπαμυκίνη δεν σταματάει απλά την μεταφορά του σήματος στην κατωφέρεια της ενεργοποιημένης mTOR αλλά αναστέλλει την

ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR στο σύνολο του 3) Η μονοθεραπεία με ραπαμυκίνη μπορεί να προλάβει πλήρως την εξέλιξη της νόσου εάν χορηγηθεί πρώιμα, αλλά και να αναστρέψει σε σημαντικό βαθμό τις εκδηλώσεις της ήδη εγκατεστημένης νόσου. Η μελέτη της δραστηριότητας του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα και γνώση πάνω στην παθογένεια της νεφρίτιδας του λύκου στους ανθρώπους και να οδηγήσει σε πιο εξατομικευμένες και λιγότερο τοξικές θεραπείες της νόσου.

Abstract: The effect of rapamycin in the structure and function of glomerular epithelial cells in mice with lupus nephritis

Introduction: The mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, rapamycin, inhibits the progression of murine lupus nephritis by virtue of its potent immunosuppressive properties. The phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway is a major upstream activator of mTOR and has been implicated in the propagation of cancer and autoimmunity. However, the activation status of the PI3K/Akt/mTOR pathway in lupus nephritis has not been studied so far.

Methods: In NZBW/F1 female mice the glomerular expression of Akt and mTOR was examined by immunofluorescence and western blot. We also searched for specific phosphorylations of these kinases known to ensue during activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. In parallel, we examined the therapeutic role of rapamycin either before or after the development of overt lupus nephritis.

Results: In untreated mice, as opposed to healthy controls, Akt and mTOR were over-expressed and phosphorylated at key activating residues. Rapamycin prolonged survival, maintained normal renal function, normalized proteinuria, restored nephrin and podocin levels, reduced anti-dsDNA titers, ameliorated histological lesions and reduced Akt and mTOR glomerular expression-activation.

Conclusions: The PI3K/Akt/mTOR pathway is upregulated in murine lupus nephritis, supporting the role of rapamycin in the treatment of this disease. Rapamycin not only blocks mTOR, but also negatively regulates the PI3K/Akt/mTOR pathway and is an effective treatment of murine lupus nephritis.

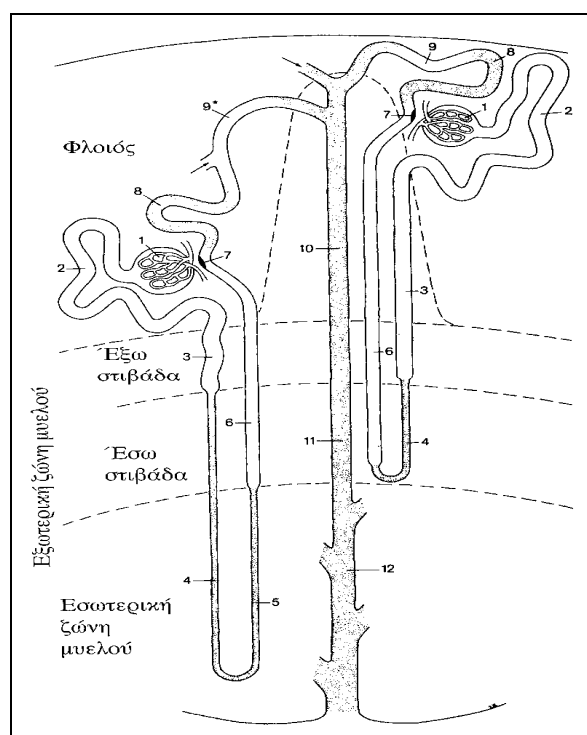
Investigation of the PI3K/Akt/mTOR pathway may offer new insights into the pathogenesis of lupus nephritis in humans and may lead to more individualized and less toxic treatment.

Γ. Γενικό Μέρος

1. Ιστολογία του νεφρικού σπειράματος

1.1 Αδρή ιστολογική υφή του σπειράματος

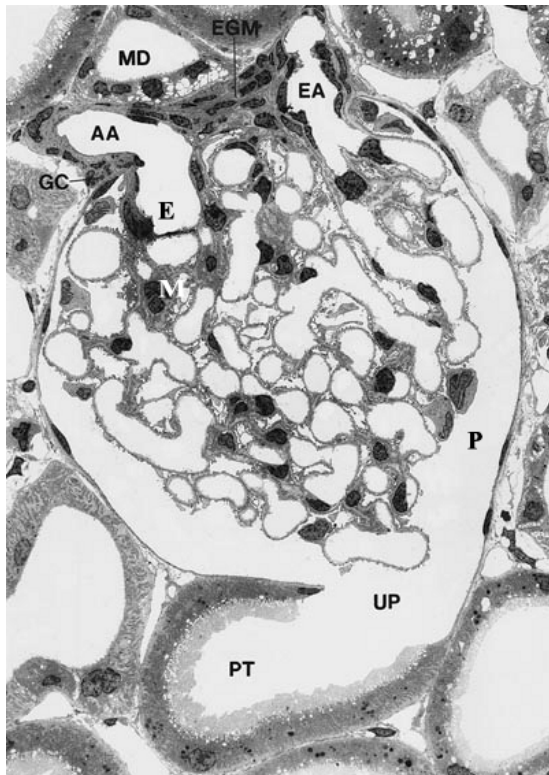
Η ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας, ο οποίος αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα με την κάψα του Bowman που το περιβάλλει, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, την παρασπειραματική συσκευή και το αθροιστικό σωληνάριο (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του νεφρώνα. 1) Αγγειώδες σπείραμα, 2) Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, 3) Εγγύς ευθύ σωληνάριο, 4) Λεπτό κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, 5) Λεπτό ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, 6) Άπω ευθύ σωληνάριο, 7) Παρασπειραματική συσκευή, 8) Άπω εσπειραμένο σωληνάριο, 9) Συνδετικό σωληνάριο, (10,11,12) Αθροιστικό σωληνάριο.

Τα τριχοειδή του σπειράματος τροφοδοτούνται με αίμα από τα προσαγωγά αρτηρίδια. Κάθε προσαγωγό αρτηρίδιο διακλαδίζεται σε πολλές (6-8) τριχοειδείς αγκύλες όπου γίνεται η υπερδιήθηση του αίματος. Οι τριχοειδείς αγκύλες συγκλίνουν στο απαγωγό αρτηρίδιο το οποίο εγκαταλείπει το σπείραμα για να σχηματίσει ένα δεύτερο τριχοειδικό δίκτυο που περιβάλλει τα νεφρικά σωληνάρια (Εικόνα 2Α και 2Β). Τα

τριχοειδή κάθε αγκύλης περιελίσσονται γύρω από μια κεντρική περιοχή, το μεσάγγειο και έτσι έχουν τη μια πλευρά ελεύθερη, στην οποία γίνεται η διήθηση και την απέναντι πλευρά συνεχόμενη με το μεσάγγειο (Εικόνα 2Γ). Στην ελεύθερη πλευρά και εκ των έξω προς τα έσω διακρίνουμε τρεις στιβάδες: τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων ή ποδοκυττάρων, τη βασική μεμβράνη του σπειράματος (ΣΒΜ) και τη στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην μεσαγγειακή πλευρά των τριχοειδών το ενδοθήλιο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μεσάγγειο το οποίο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσάγγειο θεμέλια ουσία.

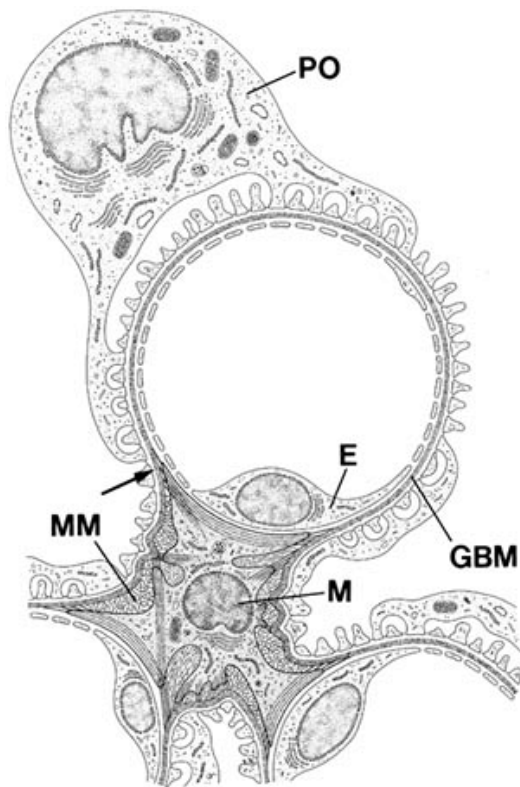


Εικόνα 2Α: Επιμήκης τομή του σπειράματος. Το προσαγωγό αρτηρίδιο (AA) διακλαδίζεται σε πολλές (6-8) τριχοειδείς αγκύλες όπου γίνεται η υπερδιήθηση του αίματος. Οι τριχοειδείς αγκύλες συγκλίνουν στο απαγωγό (EA) το οποίο εγκαταλείπει το σπείραμα. Τα τριχοειδή του σπειράματος περιβάλλονται από την κάψα του Bowman και αποτελούνται από τα θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα (E), τη βασική μεμβράνη σπειράματος και τα ποδοκύτταρα (P). M: μεσάγγειο, MD πυκνή κηλίδα, EGM εξωσπειραματικό μεσάγγειο, UP ουρικός πόλος, PT εγγύς σωληνάριο, GC κοκκιώδες κύτταρο.



Εικόνα 2Β: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δύο σπειραμάτων πειραματόζωου. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από το προσαγωγό αρτηρίδιο (Afferent

arteriole AA) και απάγει το αίμα στο απαγωγό αρτηρίδιο (Efferent arteriole EA). Από: Heptinstall's Pathology of the kidney, 6th edition

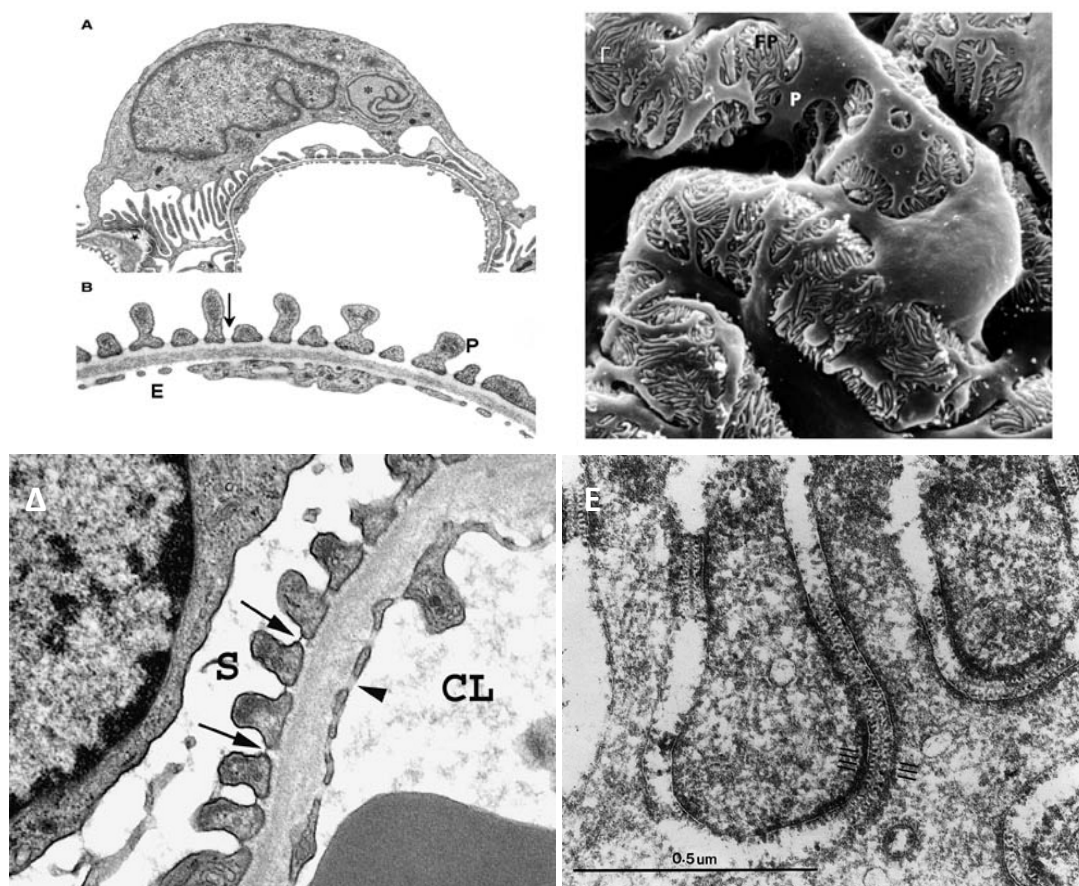


Εικόνα 2Γ: σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής μιας τριχοειδικής αγκύλης νεφρικού σπειράματος. PO: ποδοκύτταρο, E θυριδωτό ενδοθηλιακό κύτταρο, MM μεσαγγειακή θεμέλιος ουσία, M μεσαγγειακό κύτταρο, GBM σπειραματική βασική μεμβράνη. Από: Heptinstall's Pathology of the kidney, 6th edition, page 37.

1.2 Σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

Είναι κύτταρα τελικής διαφοροποίησης με απουσία ή πολύ αργό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σχηματίζουν την εξωτερική στιβάδα του τοιχώματος των τριχοειδών και προσκολλώνται στο εξωτερικό πέταλο της ΣΒΜ, (Εικόνα 3). Ονομάστηκαν έτσι γιατί διαθέτουν μεγάλο αριθμό πρωτογενών κυτταροπλασματικών προσεκβολών δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα του χταποδιού. Από τις προσεκβολές αυτές ξεκινά πλήθος μικρότερων δευτερογενών προσεκβολών που ονομάζονται ποδοκυτταρικές ή ποδικές εκβλαστήσεις ή ποδίσκοι οι οποίοι καλύπτουν τη ΣΒΜ και εισέρχονται σαΐτών σε βάθος 40-60 nm. Οι ποδίσκοι διαπλέκονται με τους αντίστοιχους των παρακείμενων κυττάρων και αφήνουν μεταξύ τους λεπτές σχισμές διηθήσεως διαμέτρου 30-40nm, οι οποίες επιτρέπουν τη διήθηση νερού και ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους. Οι λεπτές σχισμές καλύπτονται από ένα διάφραγμα (Διάφραγμα σχισμής διηθήσεως ή

λεπτό διάφραγμα, (ΛΔ)). Το ΛΔ με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φαίνεται σε εγκάρσια τομή σαν μια λεπτή κλωστή (Εικόνα 3, βέλη) που συγκρατεί δυο γειτονικές ποδικές εκβλαστήσεις ενώ σε τρισδιάστατη απεικόνιση έχει εμφάνιση



Εικόνα 3. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στην οποία απεικονίζεται: *A:* ποδοκύτταρο με τις προσεκβολές του επί της βασικής μεμβράνης του σπειράματος, *B:* τα ενδοθηλιακά κύτταρα (*E*) και οι ποδίσκοι (*P*) των ποδοκυττάρων. Το βέλος δείχνει τη λεπτή σχισμή διήθησης και το διάφραγμα της λεπτής σχισμής. *Γ:* εικόνα από ΗΜ σαρώσεως. Τα ποδοκύτταρα καλύπτουν τη ΣΒΜ με πλήθος κυτταροπλασματικών προσεκβολών δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα του χταποδιού. *Δ:* εικόνα του σπειραματικού ηθμού σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, *CL* τριχοειδικός αυλός, *S* ουρικός χώρος, βέλη λεπτά διαφράγματα, κεφαλή βέλους θυρίδα ενδοθηλιακού κυττάρου. *Ε:* επιμήκης(κατ'εφαπτομένη) τομή στο επίπεδο του λεπτού διαφράγματος, δομή σαν «φερμουάρ». Από: *Heptinstall's Pathology of the kidney*, 6th edition.

σαν «φερμουάρ» κατά μήκος των ποδικών εκβλαστήσεων (Εικόνα 3Δ). Η δομή αυτή δημιουργεί το **φραγμό μεγέθους** στη διήθηση ουσιών και συμβάλλει στην αύξηση της αντίστασης των σπειραματικών τριχοειδών στις δυνάμεις διατάσεως που προέρχονται από την αυξημένη πίεση στο εσωτερικό τους. Με τον τρόπο αυτό διατηρεί σε συνεχή συμπίεση και τη ΣΒΜ, γεγονός απαραίτητο για τη διατήρηση της δομής και συνεπώς και της λειτουργίας της.

Η επιφάνεια των ποδοκυττάρων και οι προσεκβολές τους καλύπτονται από ένα στρώμα σιαλογλυκοπρωτεϊνών με ισχυρό αρνητικό φορτίο που δημιουργούν ένα δεύτερο φραγμό στη διήθηση ουσιών, το **φραγμό φορτίου**. Εκτός από τα ποδοκύτταρα, στο φραγμό φορτίου συμμετέχουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η ΣΒΜ.

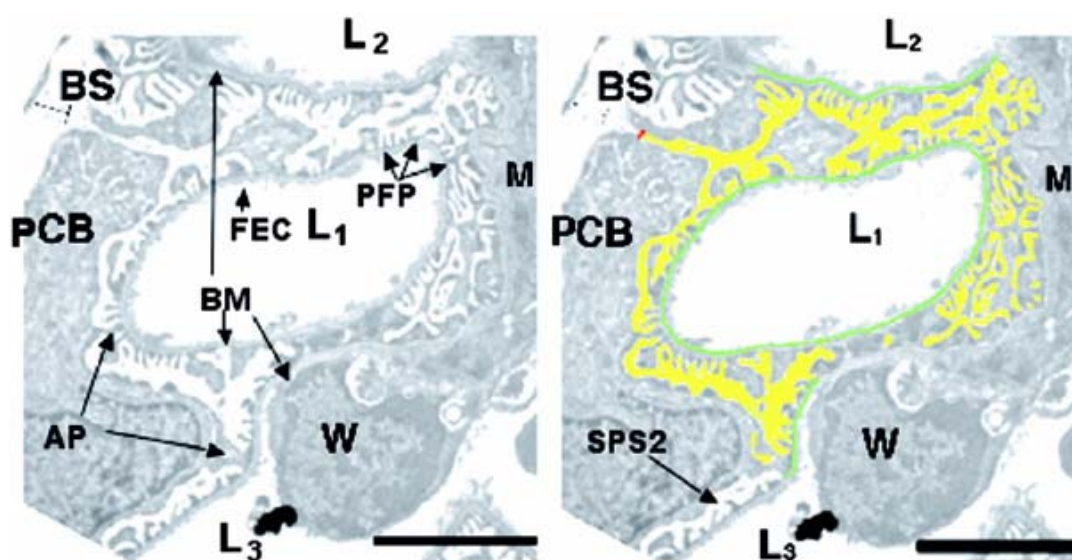
1.2.1 Ανάπτυξη των ποδοκυττάρων

Τα πρόδρομα κύτταρα των ποδοκυττάρων είναι απλά πολυγονικά κύτταρα τα οποία στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των σπειραμάτων συνδέονται μεταξύ τους με πλευρικές πρωτεΐνες όπως η ποδοκαλυξίνη και η ZO-1. Με την ωρίμανση των τριχοειδών του σπειράματος (στάδιο της δημιουργίας των τριχοειδικών αγκυλών), τα ποδοκύτταρα αρχίζουν να εμφανίζουν την χαρακτηριστική πολυσύνθετη αρχιτεκτονική τους με τη δημιουργία των ποδικών εκβλαστήσεων και του λεπτού διαφράγματος. Σε αυτό το στάδιο πολλές από τις αρχικές πρωτεΐνες εξαφανίζονται ενώ η ZO-1 ανιχνεύεται στο ΛΔ. Επίσης εμφανίζονται στην ίδια περιοχή άλλες πρωτεΐνες όπως η νεφρίνη, η ποδοσίνη και η CD2AP που οδηγούν στην τελική διαφοροποίηση και στην απώλεια της μιτωτικής δραστηριότητας των ποδοκυττάρων.

1.2.2 Δομή των ποδοκυττάρων

Τα ποδοκύτταρα έχουν ένα ογκώδες κυτταρόπλασμα, το οποίο βρίσκεται στον ουρικό χώρο της κάψας του Bowman. Περιέχουν έναν μεγάλο πυρήνα, πολύ αναπτυγμένο σύστημα Golgi και ενδοπλασματικό δίκτυο, χαρακτηριστικά λυσοσωμάτια και πολλά μιτοχόνδρια. Σε αντίθεση, οι ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις περιέχουν λίγα μόνο οργανίδια. Η πυκνότητα των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος υποδηλώνει την μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου. Τα ποδοκύτταρα συνθέτουν τα περισσότερα συστατικά της ΣΒΜ. Ο κυτταροσκελετός των ποδοκυττάρων δομείται

από ένα πολύπλοκο δίκτυο μικροϊνιδίων και μικροσωληνίσκων, αποτελούμενο κυρίως από ακτίνη, συναπτοποδίνη και άλλες πρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά συνδέονται με τη ΣΒΜ κυρίως μέσω των συμπλεγμάτων των $\alpha\beta 1$ -ιντεγκρινών. Ο σκελετός αυτός, αντιδρώντας σε μεγάλη ποικιλία παραγόντων, επιτρέπει στα ποδοκύτταρα να διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στο πειραματικό ηθμό. Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν επίσης τη σημασία του λεγόμενου υπο-ποδοκυτταρικού χώρου στη διαδικασία της υπερδιήθησης. Ο χώρος αυτός σχηματίζεται ανάμεσα στο σώμα του ποδοκυττάρου και τις δευτερογενείς ποδικές εκβλαστήσεις και οριοθετείται από τις πρωτογενείς εκβλαστήσεις (Εικόνα 4). Καλύπτει το 60% της επιφάνειας διήθησης και αυξάνει την αντίσταση στη ροή του διηθήματος σε καταστάσεις αυξημένης ενδοτριχοειδικής πίεσης. Πιστεύεται ότι είναι σε θέση να δημιουργήσει συνθήκες αναστροφής της φυσιολογικής ροής διηθήματος που λειτουργεί ως μηχανισμός «καθαρισμού» του πειραματικού ηθμού.¹



Εικόνα 4. Υπό-ποδοκυτταρικός χώρος. *BS* ουρικός χώρος του Bowman, *PCB* σώμα του ποδοκυττάρου, *BM* βασική μεμβράνη (πράσινο χρώμα δεξιά), *L1,2,3* αλλοί τριχοειδών, *PFP* ποδίσκοι, *M* μεσάγγειο, *FEC* θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα, *AP* πρωτογενείς εκβλαστήσεις αγκυροβολήσεως, *SPS* υπο-ποδοκυτταρικός χώρος (με κίτρινο χρώμα δεξιά), *W* ενδοθηλιακό κύτταρο (από αναφορά 1).

1.3 Βασική μεμβράνη του σπειράματος

Έχει πάχος 250-350 nm ανάλογα με την ηλικία και αποτελείται από τρεις διαφορετικές στιβάδες: μια παχιά κεντρική, το πυκνό πέταλο (Lamina Densa), το έσω πέταλο (Lamina Rara Interna) που έρχεται σε επαφή με το ενδοθήλιο και το έξω πέταλο (Lamina Rara Externa) που έρχεται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3B). Συντίθεται από τα ποδοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και V, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες.

1.4 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Το τοίχωμα των τριχοειδών καλύπτεται από στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που προσκολλώνται στην εσωτερική επιφάνεια της ΣΒΜ μέσω λεπτών ινιδίων. Το ενδοθήλιο εμφανίζει οπές διαμέτρου 50-100 nm (fenestrations), η πλειονότητα των οποίων φαίνεται να στερείται διαφράγματος με τις συνήθεις τεχνικές χρώσης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 2Γ και 3Δ). Νεότερες τεχνικές αποκαλύπτουν την παρουσία διαφραγμάτων σε μεγάλο αριθμό θυρίδων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα γλυκοπρωτεΐνης πλούσιας σε σιαλικό οξύ, η οποία φορτίζει αρνητικά την επιφάνεια των κυττάρων.

1.5 Μεσάγγειο

Αποτελεί εξειδικευμένο ιστό των νεφρώνων. Περιέχει μεσαγγειακά κύτταρα και μεταξύ αυτών άμορφη ουσία (Εικόνα 2Γ), η οποία καλείται μεσαγγειακή θεμέλιος ουσία (matrix). Τα κύτταρα του μεσαγγείου διακρίνονται σε αυτόχθονα ή τύπου I, σε κύτταρα τύπου II και κύτταρα τύπου III. Τα τύπου I προέρχονται πιθανότατα από τα λεία μυϊκά κύτταρα και είναι ικανά να εκτελούν ενδοκύττωση και φαγοκύττωση. Εκκρίνουν κολλαγόνο IV και V, ινδονεκτίνη και προσταγλανδίνες. Τα κύτταρα τύπου II εμφανίζουν χαρακτήρες μονοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ τα τύπου III προέρχονται από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα τα οποία παγιδεύονται στο μεσάγγειο του σπειράματος.

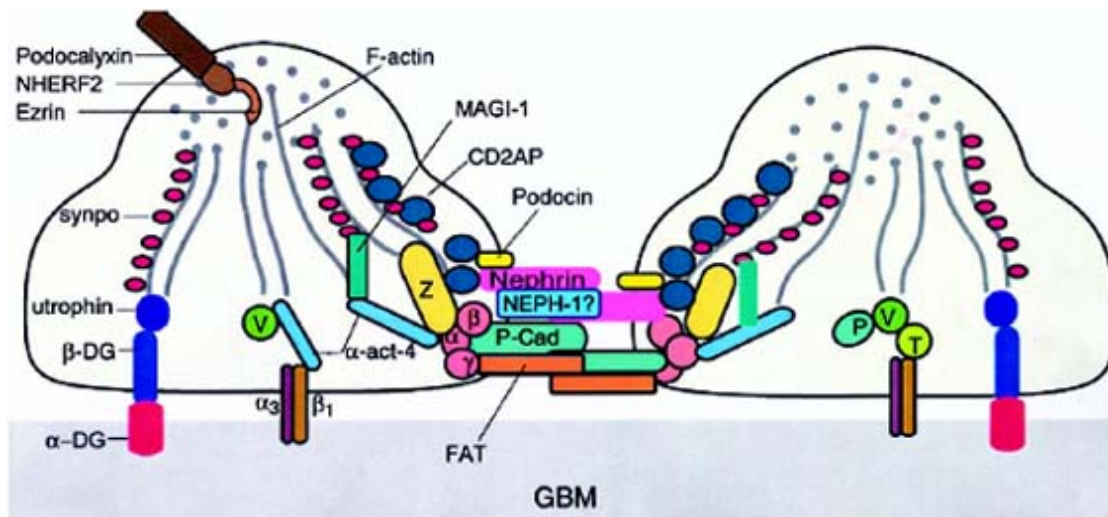
Η μεσαγγειακή ουσία αποτελείται από πλήθος μορίων που συντίθενται και εκκρίνονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως κολλαγόνο τύπου IV, ινδονεκτίνη, ακτινομυοσίνη και χονδροϊτίνη. Ένα τμήμα των τριχοειδών του σπειράματος βρίσκεται σε επαφή με το μεσάγγειο έτσι ώστε η διάμετρός τους να μεταβάλλεται

ανάλογα με τη συσπαστική ή διασταλτική δράση του μεσαγγείου. Οι κυριότερες λειτουργίες του μεσαγγείου είναι: α) πρόσληψη και απομάκρυνση μεγαλομοριακών ουσιών, όπως ανόργανα σωματίδια, πολυσακχαρίτες και ανοσοσυμπλέγματα β) ρύθμιση της σπειραματικής κυκλοφορίας γ) παραγωγή ορμονών και δομικών πρωτεογλυκανών και δ) τοπική ανοσορρύθμιση-παραγωγή ελευθέρων ριζών.

2. Σπειραματικός ηθμός

2.1 Μοριακή δομή και βιολογία του σπειραματικού ηθμού (από αναφορά ²).

Ο σπειραματικός ηθμός αποτελείται από το πορώδες ενδοθήλιο, τη σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) και τις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις με τα διαφράγματα (ΛΔ) που τις γεφυρώνουν. Είναι ελεύθερα διαπερατός από το νερό και τους ηλεκτρολύτες ενώ για μεγαλύτερες ουσίες όπως οι πρωτεΐνες η διαπερατότητα καθορίζεται από το μέγεθος και το ηλεκτρικό φορτίο. Το ΛΔ συνιστά τον φραγμό μεγέθους ενώ το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας των ποδοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και της ΣΒΜ συνιστά το φραγμό φορτίου. Το ΛΔ προέρχεται κατά την εμβρυογένεση από ένα μεσοκυττάριο σύνδεσμο και περιέχει από νωρίς την χαρακτηριστική πρωτεΐνη των στενοσυνδέσμων, τη ZO-1 (zonula occludens) στην κυτταροπλασματική του επιφάνεια. Σε επιμήκεις τομές το ΛΔ εμφανίζει μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού συνδέσμου με ευρύ μεσοκυττάριο χάσμα και μια κεντρική πυκνή γραμμή που διατρέχει τη λεπτή σχισμή καθόλο το μήκος των ποδικών εκβλαστήσεων (Εικόνα 7). Τα τελευταία χρόνια έχει σε μεγάλο βαθμό αποσαφηνιστεί η μοριακή δομή του ΛΔ, με την ανακάλυψη διαφόρων μορίων όπως η ZO-1, η νεφρίνη, η CD2AP, η FAT, η P-καντερίνη, η δεσμίνη και η ποδοσίνη. Πολλές απ'τις παραπάνω πρωτεΐνες (Εικόνα 5) παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του ΛΔ.



Εικόνα 5: Εγκάρσια τομή δύο γειτονικών ποδικών εκβλαστήσεων που συνδέονται με το λεπτό διάφραγμα. Διακρίνουμε την πλάγια επιφάνεια με τις πρωτεΐνες του λεπτού διαφράγματος, την βασική επιφάνεια που συνδέεται με τη ΣΒΜ και την αυλική επιφάνεια με την αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη ποδοκαλυξίνη. Και οι 3 επιφάνειες συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά μεταξύ τους μέσω του κυτταροσκελετού. Από αναφορά².

2.2 Οι πρωτεΐνες της πλαγίας επιφάνειας (διάφραγμα σχισμής διήθηση ή ΛΔ)

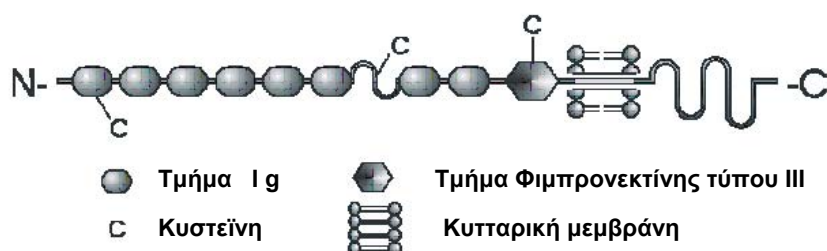
2.2.1 Νεφρίνη

Το γονίδιο της νεφρίνης *NPHS1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13, αποτελείται από 26 kb και περιέχει 29 εξόνια³. Το παραγόμενο mRNA έχει μήκος 4,3 kb και μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη που ονομάζεται νεφρίνη. Μετάλλαξη του γονιδίου προκαλεί τον Φιλανδικό τύπο συγγενούς νεφρωσικού συνδρόμου (CNF) που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και εμφανίζεται σε 1/10.000 γεννήσεις στη Φιλανδία. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 50 μεταλλάξεις του γονιδίου. Οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι: α) ο γονότυπος Fin-major που οφείλεται σε απαλοιφή 2 bp στο εξόνιο 2 η οποία μεταβάλλει το αναγνωστικό πλαίσιο και εισαγάγει ένα κωδικόνιο τερματισμού στο ίδιο εξόνιο και β) ο γονότυπος Fin-minor που οφείλεται σε nonsense μετάλλαξη στο εξόνιο 26 και προκαλεί πρόωμη διακοπή της μετάφρασης στην θέση Arg-1109⁴. Η νεφρίνη έχει MB 180 και ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Στο νεφρό εντοπίζεται αποκλειστικά και

μόνο στα ποδοκύτταρα όπου συμμετέχει στο σχηματισμό του ΛΔ. Η τριτοταγής δομή και η διαμεμβρανική της εντόπιση καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από γλυκοζυλίωση σε θέσεις αζώτου⁵.

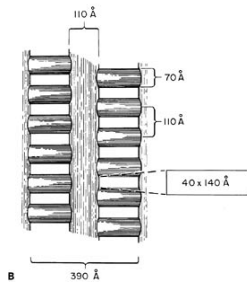
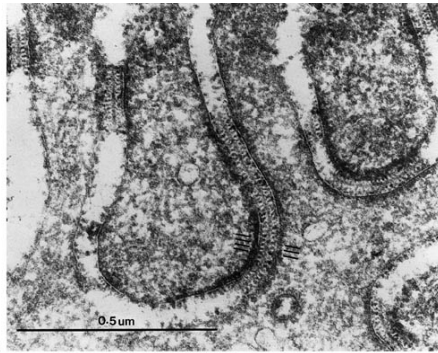
Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS1 χαρακτηρίζονται από μαζική πρωτεϊνουρία ήδη κατά την ενδομήτρια ζωή. Η θεραπεία των ασθενών με CNF συνίσταται σε πρόιμη νεφρεκτομή και αιμοκάθαρση έως ότου η ηλικία του παιδιού να καθιστά δυνατή τη νεφρική μεταμόσχευση. Η μεταμόσχευση εμφανίζει 20% ποσοστό υποτροπής του νεφρωσικού συνδρόμου εξαιτίας της δημιουργίας αντισωμάτων έναντι της νεφρίνης⁶. Κατά την οργανογένεση στα ποντίκια, η νεφρίνη εμφανίζεται στο στάδιο της τριχοειδικής αγκύλης ταυτόχρονα με τη μετατροπή των διακυτταρικών συνδέσμων σε λεπτά διαφράγματα. Στον άνθρωπο το mRNA της νεφρίνης ανιχνεύεται στο τέλος του σταδίου του νεφρικού σωματίου σχήματος S μεταξύ της 13^{ης} και 23^{ης} εβδομάδας της κύησης⁷.

Η νεφρίνη αποτελείται από ένα εξωκυττάριο NH₂-τελικό άκρο που περιέχει 8 Ig επαναλαμβανόμενα τμήματα και ένα τμήμα φμπρονεκτίνης τύπου III. Το ενδοκυττάριο τμήμα περιέχει 8 υπολείμματα τυροσίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η νεφρίνη εκτός από την κυτταρική πρόσφυση πιθανότατα συμμετέχει και στην κυτταρική επικοινωνία (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Δομή του μορίου της νεφρίνης

Σε μελέτες με ΗΜ κατά τη διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων η νεφρίνη είναι παρούσα σε συνδέσμους τύπου σκάλας και αργότερα εμφανίζεται στο ΛΔ καθώς οι σύνδεσμοι αυτοί αντικαθίστανται σταδιακά από ΛΔ. Η νεφρίνη εντοπίζεται επίσης



Εικόνα 7: Τα μόρια που συνιστούν το λεπτό διάφραγμα διατάσσονται αλληλοδιαδοχικά και σχηματίζουν μια δομή σαν φερμουάρ ανάμεσα σε δυο γειτονικές ποδικές εκβλαστήσεις. Σε επιμήκεις τομές το ΛΔ εμφανίζει μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού συνδέσμου με ευρύ μεσοκυττάριο χάσμα και μια κεντρική πυκνή γραμμή που διατρέχει τη λεπτή σχισμή καθόλο το μήκος των ποδικών εκβλαστήσεων

στον εγκέφαλο και στα β κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος. Σε σπειράματα με μετάλλαξη του γονιδίου NPHS1 δεν εμφανίζονται ούτε οι σύνδεσμοι τύπου σκάλας ούτε ΛΔ, ενώ οι πρωτεΐνες ZO-1 και P-καντερίνη εκφράζονται κανονικά. Πρώιμοι διακυτταρικοί σύνδεσμοι εμφανίζονται επίσης κανονικά στο στάδιο του νεφρώνα σχήματος S και στο στάδιο της τριχοειδικής αγκύλης γεγονός που σημαίνει ότι για το σχηματισμό των πρώιμων συνδέσμων δεν απαιτείται νεφρίνη. Η νεφρίνη είναι απαραίτητη στα επόμενα στάδια ωρίμανσης κατά την μετατροπή των πρώιμων συνδέσμων σε ΛΔ και την μετανάστευσή τους από την κορυφαία επιφάνεια στην πλαγία για την κάλυψη της λεπτής σχισμής⁷.

Το NH₂- άκρο της νεφρίνης με τις 8 ανοσοσφαιρινικές επαναλήψεις (ICAM) αλληλεπιδρά με το NH₂- άκρο της νεφρίνης της απέναντι ποδικής εκβλάστησης. Τα μόρια αυτά διατάσσονται αλληλοδιαδοχικά και σχηματίζουν μια δομή σαν φερμουάρ⁸ (Εικόνα 7).

Σε ποντίκια που έχουν υποστεί ομόλογο ανασυνδυασμό του γονιδίου της νεφρίνης (knock out), παρουσιάζεται μαζική πρωτεϊνουρία ήδη πριν από τη γέννηση ενώ πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση. Τα σπειράματα στερούνται ποδικών προσεκβολών και ΛΔ. Στη ΣΒΜ εκφράζεται φυσιολογικά η λαμινίνη, το κολλαγόνο τύπου IV και οι λοιπές πρωτεΐνες. Η μόνη διαταραχή αφορά στο κεντρικό πυκνό

πέταλο της ΣΒΜ το οποίο είναι λεπτότερο. Οι ZO-1, FAT και P-καντερίνη εκφράζονται κανονικά.

Ποντίκια Knock-out για την $\alpha 3$ άλυσσο του κολλαγόνου-IV παρουσιάζουν διαταραχή στη σύνθεση των $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ αλύσεων του κολλαγόνου καθώς και στη σύνθεση της λαμινίνης. Ωστόσο τις πρώτες 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση δεν εμφανίζεται πρωτεϊνουρία. Την 5^η εβδομάδα παρατηρείται σταδιακή εξαφάνιση της νεφρίνης, των $\Lambda\Delta$, των ποδίσκων και μαζική πρωτεϊνουρία⁷. Το γεγονός ότι μόνο μετά την εξαφάνιση της νεφρίνης εμφανίζεται πρωτεϊνουρία, αποδεικνύει τον κεντρικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη διατήρηση της ακεραιότητας του σπειραματικού ηθμού.

Η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του εξωκυτταρίου τμήματος της νεφρίνης (Mab 5-1-6) προκαλεί πρωτεϊνουρία με εστιακή μόνο σύντηξη των εκβλαστήσεων. Θεωρείται πιθανό ότι η σύνδεση του αντισώματος στη νεφρίνη επάγει τη γένεση και μεταφορά σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου που προκαλούν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων και ελάττωση του ανιονικού φορτίου της ΣΒΜ⁹.

Τα παραπάνω ευρήματα αναδεικνύουν την αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ της ΣΒΜ, του κυτταροσκελετού, και των 3 λειτουργικών επιφανειών των ποδίσκων.

Έκφραση της νεφρίνης σε σπειραματικές παθήσεις

Το γεγονός ότι η έλλειψη της νεφρίνης προκαλεί πρωτεϊνουρία ώθησε την έρευνα στην αντίστροφη κατεύθυνση, δηλαδή τι συμβαίνει αναφορικά με τη νεφρίνη στις διάφορες σπειραματοπάθειες με πρωτεϊνουρία, πειραματικές και μη.

Με τη χρήση RT-PCR σε απομονωμένα σπειράματα, βρέθηκε ότι το mRNA της νεφρίνης είναι ελαττωμένο σε ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (NEA) και μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια (ΜΣ)¹⁰. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι σε ασθενείς με NEA, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (ΕΤΣΣ) και ΜΣ (αλλά όχι σε IgAN) υπάρχει μειωμένη έκφραση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA της νεφρίνης καθώς και ανακατανομή της στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης που οδηγεί σε αποδιάταξη του πρωτεϊνικού συμπλέγματος που συνιστά το $\Lambda\Delta$ ¹¹. Στον ανοσοφθορισμό παρατηρείται μεταβολή της κατανομής της νεφρίνης από γραμμική σε κοκκιώδη καθόλη την επιφάνεια του κυττάρου και μάλιστα στις περιπτώσεις των

ασθενών με μεμβρανώδη, ανιχνεύεται νεφρίνη μέσα στις ενδομεμβρανικές ανοσοεναποθέσεις.

Παρόμοια ευρήματα παρατηρούνται και σε πειραματικά μοντέλα νεφρίτιδας από πουρομυκίνη, HgCl₂ και Mab 5-1-6¹².

Στη νεφρίτιδα του Heyman η νεφρίνη αποχωρίζεται απ' την ακτίνη και η έκφρασή της μειώνεται στα αρχικά στάδια αυτής της πειραματικής μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας¹³.

Τα ευρήματα στην διαβητική νεφροπάθεια είναι αντιφατικά. Σε νεφροπάθεια από στρεπτοζοτοκίνη και σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια, βρέθηκε σημαντική αύξηση του mRNA της νεφρίνης με ανακατανομή της πρωτεΐνης από την επιφάνεια προς το εσωτερικό του κυττάρου¹⁴. Αντίθετα σε άλλες μελέτες βρέθηκε μείωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA της νεφρίνης¹⁵. Στις μελέτες αυτές όμως η έκφραση της νεφρίνης μελετήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία από την έναρξη της σπειραματοπάθειας και συγκεκριμένα στις 4, 8 και 16 εβδομάδες στην πρώτη και στις 32 εβδομάδες στη δεύτερη μελέτη αντίστοιχα.

Σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων η χορήγηση MAC (C5b-9), πουρομυκίνης και ανοσοσυμπλεγμάτων IgG4, προκαλεί αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, ανακατανομή της νεφρίνης και απώλεια μορίων νεφρίνης από την κυτταρική μεμβράνη. Η κυτοχάλασίνη B αναστέλλει τις μεταβολές του κυτταροσκελετού και προλαμβάνει την ανακατανομή της νεφρίνης, αποδεικνύοντας έτσι τη σημασία του κυτταροσκελετού για τη διατήρηση της φυσιολογικής δομής του πειραματικού ηθμού¹¹.

Λίγα είναι μέχρι στιγμής γνωστά για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση της νεφρίνης. Η χορήγηση PMA (phorbol12-myristate13-acetate) διεγείρει την έκφραση της νεφρίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα για την έκφραση της νεφρίνης¹⁶. Επίσης οι κυτταροκίνες IL1b και TNF προκαλούν αύξηση της έκφρασης της νεφρίνης σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων και εμβρυικών νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων¹⁷. Τέλος σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η αναστολή της mTOR κινάσης από τη

ραπαμυκίνη προκαλεί μείωση της έκφρασης νεφρίνης και ποδοσίνης σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων¹⁸

Η νεφρίνη είναι σηματοδοτικό μόριο

Η νεφρίνη όπως ήδη ειπώθηκε ανήκει στην οικογένεια ICAM (Ig Cellular Adhesion Molecules). Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης συμβάλουν εκτός από την μηχανική σύνδεση των κυττάρων, στην επικοινωνία μεταξύ τους καθώς και στην επικοινωνία κυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Τα σήματα αυτά είναι σημαντικά για την διατήρηση της πρόσφυσης, την κινητικότητα, την αύξηση και επιβίωση των κυττάρων.

Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης (σηματοδοτικό τμήμα πλούσιο σε υπολείμματα τυροσίνης) όπως για παράδειγμα η μετάλλαξη C3325T που προκαλεί απαλοϊφή των τελευταίων 132 αμινοξέων του COOH-τελικού ενδοκυττάρου τμήματος, οδηγούν σε πρωτεϊνουρία και εξάλειψη των ποδίσκων⁵.

Οι περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης όπου βρίσκεται η νεφρίνη είναι φτωχή σε χοληστερόλη. Ένα μικρό ποσοστό της νεφρίνης εντοπίζεται σε περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και γαγγλιοσίδια στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών εκβλαστήσεων, όπου μαζί με την CD2AP συνδέεται στον κυτταροσκελετό. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται «λιπιδικές σχεδίες» και περιέχουν ομάδες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μετάδοση σημάτων προς το κύτταρο. Χορήγηση του αντισώματος 27A έναντι της GD3 γαγγλιοσίδης που εντοπίζεται στις λιπιδικές σχεδίες, προκαλεί πρωτεϊνουρία και τυροσινική φωσφορυλίωση της νεφρίνης^{19, 20}. Το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης φωσφορυλιώνεται από κινάσες της οικογενείας src, όπως η κινάση Fyn και Yes που καθιζάνουν μαζί με τη νεφρίνη κατά τον κλασματικό διαχωρισμό των λιπιδικών σχεδιών²¹. Η απαλοϊφή της Fyn κινάσης σε ποντίκια, προκαλεί μεταβολές στη μορφολογία των ποδικών προσεκβολών²¹. Επίσης έχει βρεθεί ότι η νεφρίνη και η CD2AP αλληλεπιδρούν με την κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3K) και μαζί με την ποδοσίνη ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης Akt το οποίο προκαλεί φωσφορυλίωση πολλαπλών πρωτεϊνών στόχων στα ποδοκύτταρα περιλαμβανομένης της Bad²².

2.2.2 Ποδοσίνη

Είναι μια πρωτεΐνη με MB 42Kda σε σχήμα φουρκέτας καθώς το NH₂-τελικό και COOH-τελικό άκρο της βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας των στοματινών-καβεολινών. Εντοπίζεται στο σημείο αγκυροβολήσεως του ΛΔ στην κυτταρική μεμβράνη. Ολιγομερή της ποδοσίνης εντοπίζονται σε «λιπιδικές σχεδίες» όπου μέσω του COOH-τελικού τους άκρου συνδέονται με τη νεφρίνη και την CD2AP²³. Άλλα μέλη της οικογένειας έχουν ανιχνευθεί σε κύτταρα του νευρικού ιστού, όπου συνδέουν ιοντικά κανάλια με τον κυτταροσκελετό. Παρόμοια λειτουργία είναι πιθανή και στα ποδοκύτταρα. Πέρα από τη δομική της λειτουργία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση της σηματοδοτικής λειτουργίας της νεφρίνης. Το γονίδιο της ονομάζεται NPHS2, μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν το **ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο** που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και εξελίσσεται γρήγορα σε ΤΣΧΝΑ. Δεν συνοδεύεται από εξωνεφρικές εκδηλώσεις και δεν υποτροπιάζει μετά τη μεταμόσχευση νεφρού⁷.

2.2.3 CD2AP

Η πρωτεΐνη αυτή με MB 80Kda, εντοπίστηκε αρχικά στην κυτταρική μεμβράνη των T- λεμφοκυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων (NK), όπου συνδέεται με το ενδοκυττάριο τμήμα της CD2 συμβάλλοντας στην αγκυροβολήση της CD2 πάνω στη μεμβράνη. Η CD2 διευκολύνει την σύνδεση των παραπάνω κυττάρων με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ανοσολογική σύναψη).

Η CD2AP περιέχει 3 SH3 ομάδες με μία από τις οποίες συνδέεται με τη CD2. Με το NH₂-τελικό της άκρο συνδέεται στο κυτταροσκελετό της ακτίνης. Τέλος περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη. Στο νεφρό εντοπίζεται στα ποδοκύτταρα και σε κύτταρα του ΕΕΣ και του αθροιστικού σωληναρίου²⁴. Στα ποδοκύτταρα η CD2AP συνδέεται με τη νεφρίνη, την ακτίνη, την α-ακτινίνη-4 και τις πρωτεΐνες δεματοποίησης της ακτίνης κορτακτίνη και ARP2/3²⁵.

Σε CD2AP Knock-out ποντίκια, παρατηρείται πρωτεϊνουρία και νεφρική ανεπάρκεια. Κατά την γέννηση δεν παρατηρούνται διαταραχές στο σχηματισμό των ποδικών εκβλαστήσεων και του ΛΔ αλλά με την πάροδο του χρόνου τα ποντίκια χάνουν σταδιακά την νεφρίνη, μέχρις εξαφανίσεως, από τα περισσότερα σπειράματα. Την 1η

εβδομάδα μετά τη γέννηση παρατηρείται απώλεια των ποδικών εκβλαστήσεων που γενικεύεται την 2η εβδομάδα οπότε εμφανίζονται και μεσαγγειακές εναποθέσεις. Την 4η εβδομάδα παρατηρείται σκλήρυνση των σπειραμάτων, διάταση των τριχοειδικών αγκυλών, επίταση των μεσαγγειακών εναποθέσεων και νεφρική ανεπάρκεια.

Τα γονίδια της CD2AP και της ποδοσίνης (NPHS2), περιέχουν ρυθμιστικές περιοχές που συνδέουν τον παράγοντα Lmx1b. Σε Lmx1b Knock-out ποντίκια, παρατηρείται μειωμένη έκφραση της CD2AP, της ποδοσίνης και της α4 αλύσου του κολλαγόνου τύπου IV. Στον άνθρωπο η μετάλλαξη του γονιδίου Lmx1b προκαλεί το σύνδρομο Neil-patella που χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων από σπειραματοπάθεια η οποία θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη μειωμένη έκφραση της CD2AP και της ποδοσίνης με επακόλουθο την αδυναμία σχηματισμού ΛΔ και ποδικών εκβλαστήσεων²⁶.

Σε ποντίκια με μετάλλαξη του γονιδίου της β2 αλύσου της λαμινίνης παρατηρείται ανακατανομή των μορίων της CD2AP και άθροισή τους κατά ομάδες με ταυτόχρονη σύντηξη των ποδικών εκβλαστήσεων. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η CD2AP είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του ΛΔ και της αρχιτεκτονικής του ποδοκυττάρου μετά τη γέννηση²⁴.

2.2.4 ZO-1

Η πρωτεΐνη αυτή έχει MB 225Kda και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των μεσοκυττάρων συνδέσμων. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK (membrane associated guanylate kinase). Περιέχει 3 PDZ τμήματα και παίζει ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία και στην οργάνωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά των διακυτταρικών συνδέσμων όπως η οκλουντίνη (occludin), η α-κατενίνη και η ZO-2 καθώς και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη και σπεκτρίνη. Στα ποδοκύτταρα εκφράζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια στα σημεία όπου το ΛΔ εισχωρεί στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά την οργανογένεση εμφανίζεται ταυτόχρονα με τη νεφρίνη στο στάδιο του νεφρικού σωματίου σχήματος S. Σε νεφρά εμβρύων με CNF και γονότυπο Fin-major/Fin-major η ZO-1 εκφράζεται κανονικά. Αντιθέτως κατά την χορήγηση σε αρουραίους μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της νεφρίνης, παρατηρείται σταδιακή μείωση της ZO-1 και 5 μέρες μετά την πρόκληση του νεφρωσικού συνδρόμου δεν ανιχνεύεται καθόλου ZO-1. Το γεγονός αυτό σημαίνει

ότι η διαταραχή της λειτουργίας της νεφρίνης από το αντίσωμα πυροδοτεί στο εσωτερικό του ποδοκυττάρου σήματα που οδηγούν στην καταστολή της έκφρασης της ZO-1²⁷. Είναι ενδιαφέρον ότι σε ποντίκια MWF που εμφανίζουν **ιδιοσυστασιακά πρωτεϊνουρία**, παρατηρείται ανακατανομή της ZO-1 χωρίς διαταραχή των ποδικών εκβλαστήσεων και του ΛΔ²⁸

2.2.5 FAT

Η FAT ανήκει στην οικογένεια των καντερινών (cadherins), έχει MB 516 Kda και περιέχει 34 διαδοχικές εξωκυττάρια επαναλήψεις τύπου καντερίνης. Εντοπίζεται μαζί με τη νεφρίνη στη βάση του ΛΔ, το δε ενδοκυττάριο τμήμα της συνδέεται με την ZO-1²⁹. Το μεγάλο εξωκυττάριο μήκος της FAT προσδίδει στο ΛΔ την ιδιαιτερότητα ότι είναι πολύ πιο ευρύ σε σχέση με τους κανονικούς συνδέσμους και δεσμοσώματα και γι' αυτό θεωρείται από τους περισσότερους συγγραφείς ένα είδος τροποποιημένου κυτταρικού συνδέσμου.

2.2.6 P-καντερίνη

Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη MB 120 Kda. Περιέχει 5 διαδοχικά μόρια καντερίνης εξωκυττάρια και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που συνδέεται στην α- β- και γ-κατενίνη. Το σύμπλεγμα αυτό συνδέεται στην ZO-1 ή/και α-ακτινίνη⁴ συμβάλλοντας έτσι στη σύνδεση του ΛΔ με τον κυτταροσκελετό. Δυο μόρια P-καντερίνης συνδέονται μεταξύ τους γεφυρώνοντας την διαφραγματική σχισμή και σχηματίζουν τον πυρήνα πάνω στον οποίο χτίζεται το ΛΔ. Παρά ταύτα, σε CNF νεφρά η P-καντερίνη εκφράζεται κανονικά και σε knock-out για την P-καντερίνη ποντίκια δεν εμφανίζεται νεφρωσικό σύνδρομο. Η παρουσία επομένως της P-καντερίνης δεν είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία του ΛΔ γεγονός που ισχύει και για το άλλο μέλος της οικογενείας την FAT.

2.2.7 NEPH1

Η NEPH1 παρουσιάζει ομολογία με τη νεφρίνη καθώς περιέχει 5 ανοσοσφαιρινικές επαναλήψεις. Φαίνεται πιθανό να συνδέεται ομοιοφιλικά με άλλα μόρια NEPH1 ή και με την νεφρίνη δεδομένης της ομολογίας που εμφανίζουν. Μεταλλάξεις του γονιδίου της προκαλούν πρωτεϊνουρία και τήξη των εκβλαστήσεων. Σε knockout ποντίκια παρατηρείται αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα και νεφρωσικό σύνδρομο με

αύξηση της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας και πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων.

2.2.8 Densin

Η densin απομονώθηκε αρχικά σε μετασυναπτικούς νευρώνες στον πρόσθιο εγκέφαλο των αρουραίων. Οι περιοχές αυτές εμφανίζονται ως μια πυκνή πάχυνση της μετασυναπτικής μεμβράνης στο ΗΜ (PSD : Post-Synaptic Density). Αποτελείται από 1495 αμινοξέα με εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα και έχει ΜΒ 167 Kda. Η κύρια λειτουργία των PSD πρωτεϊνών πιστεύεται ότι είναι η διατήρηση της σύνδεσης της προσυναπτικής και μετασυναπτικής μεμβράνης σε γλουταμινεργικούς νευρώνες. Η densin ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών LAR από τα αρχικά LRR And PDZ καθώς περιέχει τμήματα LRR και PDZ. Τα LRR (leucine reach repeats) είναι τμήματα πλούσια σε λευκίνη μικρά σε μέγεθος (20-22 αμινοξέα) και παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών μεταξύ τους, όπως π.χ στη σύνδεση μιας ορμόνης στον υποδοχέα της, ρύθμιση ενζύμων, κυτταρική πρόσφυση και μεταφορά. Τα PDZ τμήματα αποτελούνται από 90 αμινοξέα και εντοπίζονται υπό μορφή επαναλήψεων στο COO-τελικό τμήμα διαφόρων πρωτεϊνών, όπου παίζουν ρόλο σύνδεσης και οργάνωσης των πρωτεϊνών αυτών σε συμπλέγματα πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. PDZ τμήματα βρέθηκαν αρχικά στην μετασυναπτική πρωτεΐνη PSD-95, στην πρωτεΐνη DLG (disc large protein) της *Drosophila melanogaster* και στη ZO-1. Απ'τα αρχικά αυτών των πρωτεϊνών πήραν το όνομά τους τα PDZ τμήματα. Εκτός από τα LRR και PDZ τμήματα η densin περιέχει και ένα τμήμα τύπου βλενίνης και ένα RGD πεπτίδιο το οποίο είναι τριπεπτίδιο αποτελούμενο από Arg-Gly-Asp που περιγράφηκε αρχικά στη φιμπρονεκτίνη ως υπεύθυνο για τη σύνδεση με την κυτταρική μεμβράνη. Αργότερα βρέθηκε και σε άλλες πρωτεΐνες άσχετες με την κυτταρική πρόσφυση.

Πρόσφατα βρέθηκε, με τη χρήση της RT-PCR, ότι τα ποδοκύτταρα εκφράζουν mRNA της Densin. Με ανοσοφθορισμό βρέθηκε έντονη χρώση των σπειραμάτων για την densin και με ΗΜ εντοπίστηκε στην περιοχή του ΛΔ όπου καθιζάνει μαζί με τη νεφρίνη. Σε CNF το mRNA της Densin καθώς και η πρωτεΐνη είναι αυξημένα³⁰.

2.3 Πρωτεΐνες της κορυφαίας (αυλικής) επιφάνειας (εκτεταμένη ανασκόπηση στις αναφορές^{7, 31})

2.3.1 Ποδοκαλυξίνη

Στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών προσεκβολών το δίκτυο της ακτίνης συνδέεται σε διαμεμβρανικά μόρια υπεύθυνα για τη δημιουργία του αρνητικού φορτίου της επιφάνειας των ποδοκυττάρων. Η κυριότερη αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη της κορυφαίας επιφάνειας είναι η ποδοκαλυξίνη³². Ο μεταγραφικός παράγοντας WT1 ρυθμίζει την έκφραση της ποδοκαλυξίνης στα ποδοκύτταρα. Η ποδοκαλυξίνη είναι γλυκοζυλιωμένη από υδατάνθρακες πλούσιους σε θεικές ομάδες και σιαλικό οξύ που της προσδίδουν έντονα αρνητικό φορτίο, το οποίο εξυπηρετεί όχι μόνο στην απώθηση αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών του πλάσματος αλλά και στη διατήρηση των ποδικών εκβλαστήσεων σε απόσταση μεταξύ τους ώστε να σχηματίζεται η λεπτή σχισμή διήθησης. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με ανεπαρκή έκφραση ποδοκαλυξίνης δεν αναπτύσσουν ποδικές προσεκβολές και ΛΔ και πεθαίνουν στην περιγεννητική περίοδο. Σε διάφορες σπειραματοπάθειες η παρουσία ποδοκαλυξίνης στα ούρα σχετίζεται με τη βαρύτητα της βλάβης των ποδοκυττάρων³³.

2.3.2 Εζρίνη

Η Εζρίνη συνδέει το κυτταροπλασματικό τμήμα της ποδοκαλυξίνης με τον κυτταροσκελετό. Ανήκει στην οικογένεια των συνδετικών πρωτεϊνών ERM (ezrin/radixin/moesin) που θεωρούνται υπεύθυνες για τη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων.

2.3.3 NHERF2

Ο ρυθμιστικός παράγοντας του ανταλλάκτη Na⁺/H⁺ (NHERF2) είναι το δεύτερο μόριο του συμπλέγματος και συνδέεται μέσω PDZ επαναλήψεων στο NH₂-άκρο της φωσφορυλιωμένης σε Tyr567 εζρίνης. Η χορήγηση πρωταμίνης, σιαλικού οξέος ή πουρομυκίνης σε αρουραίους έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της εζρίνης και την αποσύνδεση του συμπλέγματος από τον κυτταροσκελετό.

2.3.4 Μεγκαλίνη

Άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που θεωρείται υπεύθυνη για τη διαδικασία ενδοκύττωσης ποικίλων ουσιών είναι η μεγκαλίνη ή γλυκοπρωτεΐνη 330 (gp330). Η

μεγαλίνη συνδέεται στο κυτταροσκελετό μέσω της Mag1. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια MAGUK οι οποίες αποτελούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες συγκέντρωσης, οργάνωσης και οριοθέτησης άλλων πρωτεϊνών πάνω στην κυτταρική μεμβράνη³⁴. Η Mag1 συνδέεται στο κυτταροσκελετό μέσω της συναπτοποδίνης και α-ακτινίνης 4.

2.4 Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας (ανασκόπηση στις αναφορές^{7,31})

2.4.1 Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στη θεμέλιο ουσία. Αποτελούνται από α και β υπομονάδες. Κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει χαρακτηριστικό συνδυασμό α και β υπομονάδων. Ο συνδυασμός α3β1 μπορεί να συνδεθεί με κολλαγόνο-IV φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη, εντακτίνη και νιδογόνο. Η σύνδεση των διμερών της ιντεγκρίνης με τα συστατικά της ΒΜ επάγει την εστιακή άθροιση των μορίων ιντεγκρίνης, με τρόπο ώστε να σχηματίζονται εστιακές προσφύσεις στην κυτταρική μεμβράνη, όπου συγκλίνουν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες (παξιλλίνη, ταλίνη, βινκουλίνη, α-ακτινίνη4) οι οποίες συνδέονται στη β1 υπομονάδα της ιντεγκρίνης και στο κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Αντισώματα έναντι της β1 υπομονάδας προκαλούν αποκόλληση των ποδοκυττάρων και μαζική πρωτεϊνουρία. Ανάλογα ισχύουν για την α3 υπομονάδα. Η έκφραση της ιντεγκρίνης μελετήθηκε σε διάφορες πειραματοπάθειες με πρωτεϊνουρία αλλά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Ένα γενικό συμπέρασμα από τις μελέτες αυτές είναι ότι δεν αλλάζει η ποσοτική έκφραση της ιντεγκρίνης αλλά μάλλον τροποποιείται η λειτουργία της ως μόριο μετάδοσης σημάτων από και προς το ποδοκύτταρο.

2.4.2 Δυστρογλυκάνη

Αποτελεί και αυτή υποδοχέα της βασικής επιφάνειας των ποδίσκων που συνδέεται εξωτερικά με συστατικά της ΣΒΜ (λαμινίνη, αγκρίνη, περλεκάνη) και εσωτερικά με τον κυτταροσκελετό μέσω της ουτροφίνης. Η ποσοτική έκφραση του συμπλέγματος

της δυστρογλυκάνης συσχετίζεται αρνητικά με τη δραστηριότητα της νόσου σε ζωικά μοντέλα πρωτεϊνουρίας και σε NEA σε ανθρώπους.

2.4.3 Ρόλος των πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας:

Η μεταβολή της σύστασης της ΣΒΜ σε παθολογικές καταστάσεις όπως π.χ στην antiGBM νεφρίτιδα και στην νεφρίτιδα από πουρομυκίνη ακολουθείται από μεταβολές του κυτταροσκελετού που οδηγούν σε απώλεια των ποδίσκων και του ΛΔ. Κατά τη διαδικασία αυτή, σημαντικός είναι ο ρόλος των ιντεγκρινών οι οποίες εκτός από μόρια μηχανικής σύνδεσης, αποτελούν και μόρια μετάδοσης σημάτων από και προς το κύτταρο.

Τα προερχόμενα από το κύτταρο σήματα ρυθμίζουν τον βαθμό συγγένειας και σύνδεσης των ιντεγκρινών με τη θεμέλιο ουσία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη δομή της ΣΒΜ.

Η κινάση των εστιακών προσφύσεων (FAK) είναι τυροσινική κινάση που συνδέεται με το ενδοκυττάριο τμήμα της β-ιντεγκρίνης. Όταν η ιντεγκρίνη συνδέεται στο υπόστρωμά της στη ΣΒΜ προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση της FAK και ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταφοράς σήματος Ras. Το ίδιο μονοπάτι χρησιμεύει και κατά την αντίστροφη μεταφορά σημάτων από το κύτταρο (Ras-FAK-ιντεγκρίνη) και η ενεργοποίηση του προκαλεί αύξηση της πρόσφυσης στη θεμέλιο ουσία. Τα επίπεδα και ο βαθμός φωσφορυλίωσης της FAK έχουν βρεθεί αυξημένα σε διάφορες πειραματοπάθειες, όπως διαβητική νεφροπάθεια³⁵, αντί-GBM νεφρίτιδα³⁶ και νεφρίτιδα του λύκου σε ποντίκια *lpr/lpr*³⁷.

Στη νεφρίτιδα από πουρομυκίνη τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ZO-1 βρέθηκαν αυξημένα αλλά παραμένει άγνωστη η υπεύθυνη κινάση. Σε ανθρώπινες βιοψίες από ασθενείς με NEA και μεμβρανώδη ΣΝΦ, τα επίπεδα των πρωτεϊνών FAK, ταλίνη, βινκουλίνη, παξιλλίνη, ιντεγκρίνη, ZO-1 και ZO-2 δεν μεταβλήθηκαν αλλά αυξήθηκε ο βαθμός φωσφορυλίωσής τους³⁸. Σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων ποδοκυττάρων μετά από επώαση με πουρομυκίνη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ολικής φωσφοτυροσίνης (πρωτεΐνες φωσφορυλιωμένες σε θέσεις τυροσίνης) και το ίδιο παρατηρείται και στο in vivo μοντέλο. Ωστόσο παρά τις συνεχείς προσπάθειες δεν είναι ακόμα γνωστό πιο ή πια σηματοδοτικά μόρια είναι υπεύθυνα για την αυξημένη

φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων και δεν είναι καν γνωστό αν πρόκειται μόνο για κινάσες ή και για αναστολείς φωσφατασών.

2.4.4 Κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνη (ILK)

Σε μια προσπάθεια να βρεθούν υποψήφια σηματοδοτικά μόρια σε καταστάσεις πρωτεϊνουρίας, έγινε έλεγχος σπειραμάτων σε παιδιά με συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο (CNF). Από τον έλεγχο αυτό βρέθηκε ένα νέο σηματοδοτικό μόριο, η ILK, το mRNA της οποίας υπερεκφράζεται στα σπειράματα αυτά. Η ILK είναι σερίνη-θρεονίνη κινάση που συνδέεται στο κυτταροπλασματικό άκρο της β1-ιντεγκρίνης. Η σύνδεση της ιντεγκρίνης σε φυσιολογικά συστατικά της BM καταστέλλει την κινάση αυτή³⁹ ενώ η σύνδεση σε παθολογικά συστατικά (π.χ κολλαγόνο τύπου I) την επάγει. Σε τρία μοντέλα σπειραματικής πρωτεϊνουρικής βλάβης (CNF, antiGBM, ΕΤΣΣ) έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του mRNA της ILK στα ποδοκύτταρα⁴⁰. Η υπερέκφραση της ILK σε κυτταροκαλλιέργειες προκαλεί μείωση της πρόσφυσης των ποδοκυττάρων και μέσω των μονοπατιών Akt και GSK σε κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό⁴¹. Η ILK σε κυτταρικό επίπεδο ρυθμίζεται επίσης από την PI3K και είναι σε θέση να φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473⁴²

Η ILK συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ της βασικής (ιντεγκρίνη-BM) και πλαγίας (ΛΔ) επιφάνειας των ποδίσκων προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, μέσω του μονοπατιού Wnt, με μετακίνηση της β-κατενίνης και του LEF-1 προς τον πυρήνα, καταστολή της P-καντερίνης και αύξηση των επιπέδων της MMP-9⁴³.

Φαινοτυπικά προκαλεί αλλαγή των ποδοκυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα με εκβλαστήσεις σε αδιαφοροποίητα κύτταρα χωρίς εκβλαστήσεις και χωρίς ΛΔ. Επομένως η κινάση αυτή και γενικότερα ο μηχανισμός πρόσφυσης, εμπλέκεται όχι μόνο στην κυτταρική επικοινωνία και στήριξη αλλά και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και του κυτταρικού κύκλου των ποδοκυττάρων. Επιπρόσθετη απόδειξη της συμμετοχής των κινάσων σερίνης-θρεονίνης, όπως η ILK, στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων αποτελεί το εύρημα ότι η χρησιμοποίηση μη ειδικών αναστολέων κινάσων σερίνης-θρεονίνης ευνοεί την ανάπτυξη εκβλαστήσεων σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων⁴⁴.

2.5 Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων

2.5.1 Λειτουργίες του κυτταροσκελετού: Η κυριότερες λειτουργίες του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων είναι η σύνδεση του συμπλέγματος των πρωτεϊνών του ΛΔ με το σύστημα πρόσφυσης στην ΣΒΜ, η διατήρηση της πολικότητας του ποδοκυττάρου, η απόσβεση των δυνάμεων διάτασης και η ομοιόμορφη κατανομή τους κατά μήκος του τριχοειδικού τοιχώματος και η μεταφορά κυστιδίων εντός του κυτταροπλάσματος. Αποτελεί ένα σύστημα ινιδίων με στατικές και δυναμικές λειτουργίες. Τα ινίδια αυτά είναι 3 ειδών: μικροϊνίδια (διαμέτρου 7-9 nm), ενδιάμεσα ινίδια (διαμέτρου 10 nm) και μικροσωληνίσκοι (24 nm). Οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια σχηματίζουν το σκελετό πάνω στον οποίο στηρίζεται το κυτταρικό σώμα και οι πρωτογενείς εκβλαστήσεις. Οι ποδικές εκβλαστήσεις περιέχουν ένα πυκνό δίκτυο μικροϊνιδίων ακτίνης τα οποία συνδέονται στο ΛΔ και στις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης μέσω πρωτεϊνών σύνδεσης (ενδιάμεσα συνδετικά μόρια, linker proteins or adapter molecules), όπως π.χ οι πρωτεΐνες ZO-1, οι κατενίνες και η CD2AP.

2.5.2 F-ακτίνη (πολυμερής ακτίνη): αποτελεί μια εξαιρετικά δυναμική δομή καθώς μπορεί να μεταβάλλεται ταχύτατα με προσθήκη ή αφαίρεση μονομερών ακτίνης. Έτσι τα ινίδια αυτά μπορούν να αυξάνονται σε μήκος, να διακλαδίζονται ή/και να αποσυρναμολογούνται. Μπορούν να σχηματίζουν χαλαρό δίκτυο ή παράλληλα δεμάτια με τη βοήθεια πρωτεϊνών δεματοποίησης. Τα δεμάτια αυτά σχηματίζουν αγκύλες που διατρέχουν κατά μήκος τις ποδικές εκβλαστήσεις. Οι δυο άκρες της αγκύλης συνδέονται στο πέλμα δύο διαδοχικών ποδίσκων με τις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης και η κορυφή της συνδέεται στην ρίζα των ποδίσκων με τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια των πρωτογενών εκβλαστήσεων. Η κινητήρια πρωτεΐνη μυσίνη επιτρέπει την ισομετρική ή ισοτονική σύσπαση των ινιδίων στα κύτταρα.

2.5.3 Συναπτοποδίνη: εκφράζεται στα ποδοκύτταρα και στο νευρικό ιστό και συνδέεται με την ακτίνη. Ο ρόλος της είναι ως επί το πλείστον άγνωστος, αλλά ομόζυγος απαλοιφή της σε ποντίκια προκαλεί αυξημένη ευαισθησία του πειραματικού ηθμού σε βλαπτικούς παράγοντες.

2.5.4 α-ακτινίνη-4: αποτελεί ένα νέο μόριο της οικογένειας της ακτίνης και συμβάλλει στη σύνδεση-δεματοποίηση των ινιδίων της ακτίνης. Στο πειραματικό νεφρωσικό σύνδρομο από πουρομικίνη και σε πειραματική anti-GBM νεφρίτιδα, παρατηρείται σημαντική αύξηση της α-ακτινίνης και αποδιάταξη των ινιδίων της ακτίνης πριν την σύντηξη των εκβλαστήσεων^{45, 46}. Μεταλλάξεις του γονιδίου της (ACTN4), συνοδεύονται από οικογενή ΕΤΣΣ όψιμης έναρξης, που μεταβιβάζεται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα⁴⁷.

2.5.5 Rho κινάση: Η εφαρμογή μηχανικού στρες σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων με κυκλική εναλλαγή διάτασης και χαλάρωσης του υποστρώματος, είχε ως αποτέλεσμα τα ποδοκύτταρα (και όχι τα ενδοθηλιακά ή μεσαγγειακά κύτταρα) να εμφανίζουν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού με ελάττωση του μεγέθους του κυτταρικού σώματος, λέπτυνση των πρωτογενών εκβλαστήσεων και αύξηση των ινιδίων στρες της ακτίνης στις δευτερογενείς εκβλαστήσεις, μια διαδικασία εξαρτώμενη από ασβέστιο και την Rho κινάση⁴⁸. Η Rho κινάση προκαλεί δεματοποίηση των ινιδίων της ακτίνης και ανήκει στις μικρές GTPases οι οποίες ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Αναστολή της Rho κινάσης συνοδεύεται από κατάργηση των μεταβολών που προκαλεί το μηχανικό στρες. Απ'την άλλη μεριά η υπερέκφραση της Rho κινάσης μέσω μετάλλαξης/απαλοιφής του αναστολέα της Rho-GDIa, προκαλεί επίσης βλάβη των εκβλαστήσεων με υπερβολική άθροιση δεματιών ακτίνης στις περιοχές της βλάβης⁴⁵.

2.5.6 Φωσφατάσες: Οι μεταβολές του κυτταροσκελετού που προκαλούνται από την πουρομικίνη και την πρωταμίνη χαρακτηρίζονται από συνολική αύξηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού σε θέσεις τυροσίνης⁴⁹. Η χορήγηση βαναδίου (vanadate) που είναι μη ειδικός αναστολέας φωσφατασών επιφέρει παρόμοιο αποτέλεσμα. Σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων έχει ανιχνευθεί μεγάλος αριθμός φωσφατασών μεταξύ των οποίων και η πειραματική επιθηλιακή πρωτεΐνη (GLEPP1), των οποίων ο ρόλος στην οργάνωση του κυτταροσκελετού παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστος. Στο μοντέλο του νεφρωσικού σ. από πουρομικίνη τα επίπεδα της GLEPP1 είναι μειωμένα γεγονός που εξηγεί ίσως την συνολική αύξηση της τυροσινικής φωσφορυλίωσης⁵⁰. Η GLEPP-1 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη των ποδοκυττάρων με ιδιότητες τυροσινικής φωσφατάσης. Πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στη δομή και τη λειτουργία του ποδοκυττάρου, ρυθμίζοντας το βαθμό

τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του. Σε ποντίκια με ανεπάρκεια της GLEPP1, τα ποδοκύτταρα εμφανίζουν δομικές αλλαγές όπως άμβλυση των εκβλαστήσεων, ελάττωση των επιπέδων της νεφρίνης, ελάττωση της επιφάνειας διήθησης και του ρυθμού σπειραματικής διήθησης⁵¹. Παρά ταύτα δεν ανιχνεύεται λευκωματουρία στα ποντίκια αυτά

2.6 Σπειραματική βασική μεμβράνη

Κατά την νεφρογένεση η ΣΒΜ δημιουργείται από 2 ξεχωριστά στρώματα που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα αντίστοιχα. Τα δυο αυτά στρώματα ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την ώριμη ΣΒΜ. Στο ώριμο σπείραμα τα ποδοκύτταρα συνεχίζουν να παράγουν συστατικά της ΣΒΜ, όπως κολλαγόνο-IV, λαμινίνη, εντακτίνη, αγκρίνη και περλεκάνη. Επιπλέον παράγουν και ένζυμα διάσπασης της θεμελίου ουσίας όπως η μεταλλοπρωτεάση MMP-9, εξασφαλίζοντας έτσι τη συνεχή ανακατασκευή της ΒΜ.

Από την άλλη μεριά, η ΣΒΜ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων. Για παράδειγμα σε ποντίκια με ανεπάρκεια σύνθεσης της β2-αλύσου της λαμινίνης παρατηρείται σύντηξη των ποδίσκων και πρωτεϊνουρία⁵².

Η λαμινίνη της ΣΒΜ είναι ετεροτριμερές αποτελούμενο από α, β και γ αλύσους. Συγκεκριμένα πρόκειται για λαμινίνη-521 (νέα ονοματολογία), αποτελούμενη από α5/β2/γ1 αλύσους. Έλλειψη οιασδήποτε αλύσου οδηγεί σε νεφρωσικό σύνδρομο και μάλιστα η έλλειψη της α5 οδηγεί σε πρόιμη διακοπή της νεφρογένεσης.

Γενετική τροποποίηση του κολλαγόνου τύπου IV μέσω αδρανοποίησης της α3 αλύσου προκαλεί αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής α1 και α2 αλύσεων και κλινική εικόνα παρόμοια με το σύνδρομο Alport. Ταυτόχρονα επηρεάζεται η σύσταση της λαμινίνης και παρατηρείται σύντηξη των ποδικών εκβλαστήσεων⁵³. Η ταυτόχρονη όμως αδρανοποίηση της α3 αλύσου του κολλαγόνου και της ιντεγκρίνης α3β1 δεν προκαλεί ούτε διαταραχή της παραγωγής λαμινίνης ούτε βλάβη των ποδίσκων. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η πρωταρχική βλάβη της ΣΒΜ (κολλαγόνο, λαμινίνη) επιφέρει δευτερογενείς βλάβες στα ποδοκύτταρα, μέσω μετάδοσης μηνυμάτων από τη ΣΒΜ προς το ποδοκύτταρο δια της ιντεγκρίνης α3β1. Ταυτόχρονη

βλάβη της ιντεγκρίνης διακόπτει τη μεταφορά του σήματος στα ποδοκύτταρα γεγονός που εξηγεί τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής τους στην περίπτωση της διπλής βλάβης.

2.7 Συμπεράσματα. Σε κάθε ποδίσκο μπορούμε να διακρίνουμε 3 επιφάνειες ή λειτουργικά τμήματα (Εικόνα 5): α) την πλάγια επιφάνεια στην οποία προσφύεται το $\Delta\Delta$ που αποτελεί τον βασικό ηθμό μεγέθους καθώς και μηχανισμό κυτταρικής επικοινωνίας και στήριξης, β) τη βασική επιφάνεια η οποία εφάπτεται στη ΣΒΜ μέσω πρωτεϊνών κυτταρικής πρόσφυσης και γ) την κορυφαία επιφάνεια η οποία φέρει πρωτεΐνες με ισχυρό αρνητικό φορτίο συμβάλλοντας στο φραγμό φορτίου και στη διατήρηση ανοικτής της λεπτής σχισμής. Τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα των τριών επιφανειών συνδέονται μεταξύ τους μέσω του κυτταροσκελετού και συμμετέχουν στη μεταφορά μηνυμάτων από και προς το κύτταρο. Διαταραχή της δομής ή της λειτουργίας των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σε οποιαδήποτε από τις 3 επιφάνειες των ποδίσκων η στη ΣΒΜ, οδηγεί σε μεταβολή της δομής του κυτταροσκελετού με επακόλουθη σύντηξη των προσεκβολών και πρωτεϊνουρία.

3. Η κίνηση mTOR

3.1 mTOR: ένας κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού

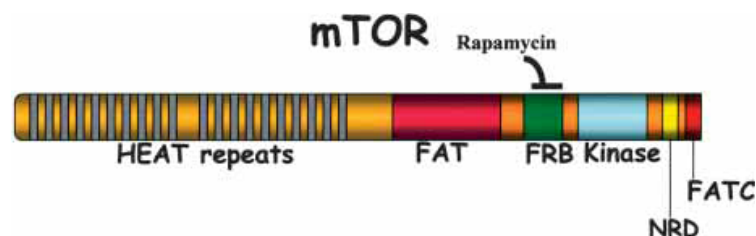
Στα κυριότερα επίπεδα ελέγχου του ρυθμού κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού σε μύκητες, φυτά και θηλαστικά, φαίνεται να εμπλέκεται σταθερά η ίδια πάντα πρωτεΐνη, η κίνηση σερίνης/θρεονίνης TOR (target of rapamycin). Η TOR είναι μια εξελικτικά διατηρημένη πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια ανεύρεσης της πρωτεΐνης-στόχου του ανοσοκατασταλτικού και αντιβιοτικού φαρμάκου ραπαμυκίνη. Η ραπαμυκίνη απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *streptomyces hygrosopicus*, από δείγματα εδάφους του νησιού Rapa Nui (Easter Island, νησί του Πάσχα) που συνέλλεξαν Ολλανδοί ερευνητές⁵⁴. Η ουσία αυτή βρέθηκε αρχικά να αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκήτων και λίγο αργότερα τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Το γονιδίωμα των μυκήτων κωδικοποιεί για 2 πρωτεΐνες TOR τις TOR1 και TOR2. Το γονιδίωμα των θηλαστικών και των μεταζώων, κωδικοποιεί μια μόνο πρωτεΐνη TOR (mammalian TOR, mTOR) με 42%

ομολογία αμινοξέων με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες TOR1 και TOR2 των μυκήτων. Οι TORs είναι πρωτεΐνες υψηλού MB (289kDa, 2549 αμινοξέα) που περιλαμβάνουν πολλαπλά, διακριτά, δομικά και διατηρημένα εξελικτικά τμήματα.

Η mTOR κλωνοποιήθηκε και προσδιορίστηκε ανεξάρτητα, από τέσσερις ερευνητικές ομάδες λίγο μετά την ανακάλυψη των γονιδίων TOR1 και TOR2 στους μύκητες, κατά τη προσπάθεια ανεύρεσης των αιτιών αντίστασης του *Saccharomyces cerevisiae* στη ραπαμυκίνη^{55,56,57}. Ονομάστηκε αρχικά FRAP (FKBP–rapamycin-associated protein), RAFT1 (rapamycin and FKBP target), ή RAPT1 (rapamycin target) ενώ σήμερα έχει επικρατήσει ο όρος mTOR^{58,59}.

Η ραπαμυκίνη ασκεί τη δράση της μετά τη διαμόρφωση ενός συμπλέγματος με τον ενδοκυττάριο δέκτη της, την FK506-δεσμευτική πρωτεΐνη (FKBP12). Το σύμπλεγμα FKBP12-ραπαμυκίνης συνδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών TOR (FRB τμήμα), εμποδίζοντας έτσι τη δραστηριότητα των TOR^{60,61}.

Το αμινοτελικό άκρο της TOR αποτελείται από 20 επαναλαμβανόμενα τμήματα HEAT (Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR1) που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Εικόνα 8). Το καρβοξυτελικό άκρο της TOR, περιλαμβάνει το τμήμα με δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης που, ενώ είναι παρόμοιο με το καταλυτικό τμήμα της κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων PI3K, ωστόσο δεν παρουσιάζει δραστηριότητα λιπιδικής κινάσης. Ακριβώς πριν το καταλυτικό τμήμα υπάρχει η θέση σύνδεσης FRB και ένα σχετικά μεγάλο τμήμα FAT (από FRAP, ATM, TRAP) που είναι κοινό σε όλες τις κινάσες της οικογένειας της PI3K (PIKK). Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα ακόμα τμήμα FAT που ονομάζεται FATC και είναι απολύτως απαραίτητο για τη λειτουργία της κινάσης καθώς ακόμα και απαλοιφή ενός οιοδήποτε αμινοξέος καταργεί τη δραστηριότητά της^{62,63}.



Εικόνα 8: Η δομή της mTOR (από αναφορά⁶⁴)

Τα τμήματα FAT & FATC αλληλεπιδρούν με τρόπο ώστε να μεταβάλλουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και να εκθέτουν το καταλυτικό της τμήμα. Τέλος υπάρχει ένα τμήμα με πιθανή αρνητική ρυθμιστική δράση (NRD) ⁶⁵.

Η mTOR ρυθμίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών, μέσω φωσφορυλίωσης-αδρανοποίησης μιας πρωτεΐνης σύνδεσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1)), και μέσω φωσφορυλίωσης-ενεργοποίησης της κινάσης S6 (S6K). Έτσι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 4E-BP1 και S6K αποτελεί το δείκτη δραστηριότητας της mTOR in vivo. Η mTOR έχει ενδογενή δραστηριότητα Ser/Thr κινάσης που οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση στη θέση Ser2481 ⁶². Δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αν η αυτοφωσφορυλίωση της mTOR είναι ικανή να προκαλέσει πλήρη ενεργοποίησή της με επακόλουθο τη φωσφορυλίωση των σχετιζόμενων κατωφερέστερων πρωτεϊνών 4E-BP1 και S6K ⁶⁶. Μετά την ανακάλυψή της έγινε γνωστό ότι η mTOR μπορεί να λειτουργήσει ως σκελετός σύνδεσης για άλλες πρωτεΐνες με καταλυτική δραστηριότητα όπως κινάσες και φωσφατάσες οι οποίες μπορούν να ρυθμίζουν in vivo τη δραστηριότητα της mTOR.

Η mTOR είναι παρούσα σε 2 πρωτεϊνικά συμπλέγματα, το mTORC1 που είναι ευαίσθητο και αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη και το mTORC2 που θεωρείται μη ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και τουλάχιστον άμεσα, δεν αναστέλλεται από αυτήν. Όμως, έχει πρόσφατα βρεθεί ότι η παρατεταμένη θεραπεία με ραπαμυκίνη μπορεί έμμεσα να αναστείλει και το mTORC2 σε κάποια κύτταρα. Συγκεκριμένα η νεοσυντιθέμενη mTOR δεσμεύεται αμέσως από το σύμπλοκο FKBP12-ραπαμυκίνης και αδυνατεί πλέον να σχηματίσει νέα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες που συνιστούν το mTORC2 ⁶⁷. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι σημαντικές λειτουργίες του mTORC1 εμφανίζουν αντοχή στην αναστολή από ραπαμυκίνη. Συγκεκριμένα σε ορισμένες κυτταρικές σειρές η ραπαμυκίνη ενώ αρχικά προκάλεσε μείωση της φωσφορυλίωσης της 4EBP1 στη συνέχεια και μετά από παρατεταμένη εφαρμογή, οδήγησε σε υπερφωσφορυλίωσή της και ανάνηψη της cap-εξαρτώμενης πρωτεϊνοσύνθεσης. Αντίθετα η λειτουργικότητα της S6K παραμένει πάντα κατεσταλμένη με την εφαρμογή της ραπαμυκίνης ⁶⁸. Σε άλλα πειράματα με τη χρήση περισσότερο ειδικών σε σχέση με τη ραπαμυκίνη αναστολέων της mTOR (πυραζολοπυριμιδίνες), βρέθηκε ότι η ραπαμυκίνη αποτελεί ασθενή αναστολέα της φωσφορυλίωσης της 4EBP1, ενώ

αντίθετα οι πυραζολοπυριμιδίνες προκαλούν πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της 4EBP1. Αυτό είχε ως συνέπεια μια ασήμαντη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης από τη ραπαμυκίνη σε αντίθεση με τις πυραζολοπυριμιδίνες που προκάλεσαν 30% μείωση της ολικής πρωτεϊνοσύνθεσης.

Φαίνεται επομένως ότι η γενική αρχή πως το mTORC1 είναι ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη δεν ευσταθεί πλήρως, αλλά και το ότι το mTORC2 είναι ανθεκτικό στην αναστολή από ραπαμυκίνη επίσης δεν ευσταθεί πλήρως.

3.2 Το σύμπλεγμα mTORC1

Το σύμπλεγμα mTORC1 αποτελείται από την mTOR, τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της mTOR (Regulatory associated protein of mTOR, *Raptor*), την *mSIN1* (mammalian stress activated protein kinase [SAPK]-interacting protein), την *mLST8* (mammalian lethal with Sec13 protein 8), την πρωτεΐνη υπόστρωμα της Akt πλούσια σε προλίνη [proline rich AKT substrate 40 kDa (*PRAS40*)] και τέλος την DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (*Deptor*)⁶⁹. Η *mLST8* γνωστή και ως GβL (G protein β-subunit-like protein) έχει MB 36-kDa, περιέχει 7 WD-40 επαναλήψεις και έχει διατηρηθεί εξελικτικά σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η πρωτεΐνη mLST8 δεν θεωρείται απολύτως απαραίτητη για τις μέχρι σήμερα γνωστές λειτουργίες του συμπλέγματος καθώς η απαλοιφή της δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του mTORC1 in vivo⁷⁰ αλλά διαταράσσει μόνο τη λειτουργία του mTORC2. Φαίνεται όμως να εμπλέκεται στη ρύθμιση του mTORC1 από τα θρεπτικά συστατικά, όπως αναλύεται στην επόμενη ενότητα.

Η PRAS40 και η Deptor θεωρούνται αρνητικοί ρυθμιστές του mTORC1. Όταν η δραστηριότητα του mTORC1 μειώνεται, τότε οι πρωτεΐνες PRAS40 και Deptor συνδέονται στο σύμπλεγμα και επιφέρουν την πλήρη αναστολή του. Αντίθετα όταν ενεργοποιείται το mTORC1 τότε φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες PRAS40 και Deptor, με αποτέλεσμα την αποσύνδεσή τους και την ελεύθερη πρόσβαση του mTORC1 στα υποστρώματά του. Ωστόσο ορισμένοι υπερκείμενοι ρυθμιστές του mTORC1 (π.χ η Akt) είναι σε θέση να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του συμπλέγματος και μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας της PRAS40, όπως θα δούμε παρακάτω. Σε μεγάλο αριθμό νεοπλασιών η έκφραση του Deptor είναι μειωμένη συνεπεία ενεργοποίησης του mTORC1 & mTORC2. Παρόλ' αυτά η έκφραση του Deptor έχει βρεθεί αυξημένη σε μια υποκατηγορία ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα η οποία οδηγεί σε αναστολή

της δράσης του mTORC1 και μείωση της δραστηριότητας της S6K. Η μειωμένη δραστηριότητα της S6K οδηγεί σε ανεμπόδιστη ενεργοποίηση της Akt από την PI3K με αποτέλεσμα ανεμπόδιστο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκινογένεση, παρά την καταστολή του mTORC1 ⁶⁹.

Η Raptor είναι μια πρωτεΐνη MB 150kDa που περιέχει μια διατηρημένη περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο, ακολουθούμενη από 3 επαναλήψεις HEAT και 7 επαναλήψεις WD-40 στο καρβοξυτελικό της άκρο ^{71, 72} και εκτός από την mTOR, μπορεί να συνδεθεί επίσης με την S6K1 και την 4E-BP1 ^{73, 74}. Το αμινοτελικό άκρο της mTOR (που περιέχει τις επαναλήψεις HEAT) είναι απαραίτητο για τη σύνδεση και την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τη Raptor. Όμως και το καρβοξυτελικό τμήμα της mTOR μπορεί να συνδεθεί ασθενώς με τη Raptor ⁷¹. Ποικίλες μεταλλάξεις της Raptor είτε στο αμινοτελικό άκρο της είτε στις επαναλήψεις HEAT διαταράσσουν την ικανότητα σύνδεσής της με την mTOR, υποδηλώνοντας έτσι ότι η Raptor αλληλεπιδρά με την mTOR μέσω πολλαπλών σημείων σύνδεσης. Η Raptor είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα της mTOR όπως φάνηκε σε πειράματα απαλοιφής της Raptor (με παρεμβολή RNA) σε κύτταρα θηλαστικών ^{71, 73}. Ενώ η Raptor θεωρείται θετικός ρυθμιστής της mTOR, σε μια αναφορά υποστηρίζεται ότι σε καταστάσεις στέρησης θρεπτικών συστατικών, οι δύο πρωτεΐνες (Raptor-mTOR) σταθεροποιούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε αναστέλλεται η δραστηριότητα της mTOR κινάσης ⁷¹. Η Raptor συνδέεται με την S6K και 4EBP1 σε μια περιοχή 5 αμινοξέων, που ονομάζεται TOS (TOR signaling)⁷⁴. Με τη σύνδεση αυτή η Raptor εξασφαλίζει την «επαφή» της mTOR με τα υποστρώματά της (S6K και 4EBP1) και την επακόλουθη φωσφορυλίωσή τους απ' την mTOR. Μεταλλάξεις στο τμήμα TOS, μειώνουν σημαντικά την ικανότητα της mTOR να φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά αυτά ⁷⁵.

3.3 Το σύμπλεγμα mTORC2

Ο σχηματισμός του mTORC2 απαιτεί τη σύνδεση της **mTOR** με την πρωτεΐνη **Rictor** (rapamycin-insensitive companion of mTOR), την παρατηρούμενη με τη Rictor πρωτεΐνη [protein observed with Rictor-1 (**Protor-1**)], την **mSIN1**, την **Deptor** και την **mLST8** η οποία είναι απαραίτητο δομικό και λειτουργικό συστατικό του mTORC2. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η Rictor και mSIN1 σταθεροποιούν η μια την άλλη

και δημιουργούν το δομικό υπόβαθρο για τη δημιουργία του mTORC2⁷⁶. Απαλοιφή τόσο της mSIN1 όσο και της Rictor, οδηγούν σε αναστολή του σχηματισμού του mTORC2 και αδυναμία φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Ser473. Το γεγονός αυτό έχει καταστήσει το mTORC2, ως το πιθανότερο υποψήφιο για το ρόλο της PDK2 κινάσης (της κινάσης που φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473). Ποντίκια με απαλοιφή της Rictor ή της mLST8, πεθαίνουν στην εμβρυική ηλικία λόγω διαταραχής της αγγειογένεσης και στερούνται της δραστηριότητας του mTORC2. Κατ'αναλογία με το mTORC1, η Deptor αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της δραστηριότητας του mTORC2⁶⁹.

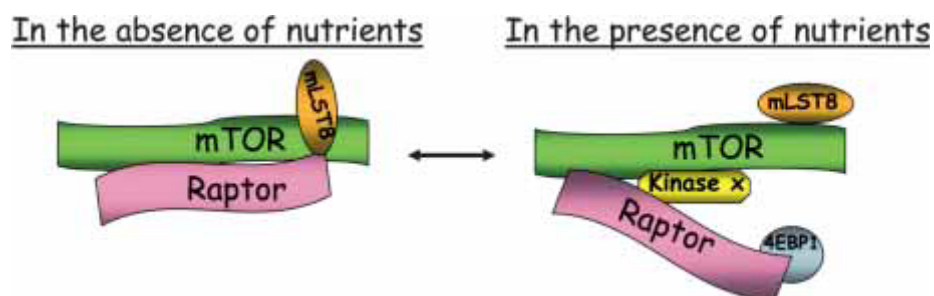
3.4 Υπερκείμενοι ρυθμιστές της mTOR

Η mTOR συγκεντρώνει ποικίλα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια μηνύματα για τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού που μπορούν να συνοψιστούν σε τέσσερις κύριες ομάδες: θρεπτικά συστατικά, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, ενέργεια και stress.

3.4.1 Ρύθμιση της mTOR από θρεπτικές ουσίες

Η δραστηριότητα των δύο πρωτεϊνών TOR των μυκήτων ρυθμίζεται από τις θρεπτικές ουσίες. Οι πρωτεΐνες TOR των μυκήτων ενεργοποιούνται όταν τα κύτταρα τους αναπτύσσονται σε θρεπτικό περιβάλλον πλούσιο σε άζωτο, όπως για παράδειγμα γλουταμίνη, και απενεργοποιούνται όταν τα θρεπτικά συστατικά μειωθούν^{77, 78 79}. Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες εκτός από τη ρύθμιση της λήψης θρεπτικών συστατικών ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που δρουν παράλληλα ή σε συμφωνία με τις θρεπτικές ουσίες. Έτσι η ρύθμιση της mTOR αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα ρύθμισης από παράλληλες οδούς που δρουν συντονισμένα σε φυσιολογικές καταστάσεις: ρύθμιση από επάρκεια θρεπτικών ουσιών και παράλληλη ρύθμιση από παρουσία αυξητικών παραγόντων-κυτοκινών. Στη ρύθμιση της δραστηριότητας του mTORC1 από τις θρεπτικές ουσίες σημαντικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη mLST8/GβL. Η mLST8/GβL αλληλεπιδρά με το τμήμα κινάσης της mTOR, ανεξάρτητα από την Raptor και τροποποιεί την σύνδεση ανάμεσα στην mTOR και τη Raptor ανάλογα με τις συνθήκες θρέψης⁸⁰. Η επάρκεια αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών

τροποποιεί τη διαμόρφωση του συμπλόκου mLST8–mTOR–Raptor και αυξάνει την ικανότητά του να φωσφορυλιώνει τις υποκείμενες κινάσες που θέτουν σε λειτουργία μηχανισμούς πρωτεϊνοσύνθεσης (Εικόνα 9).



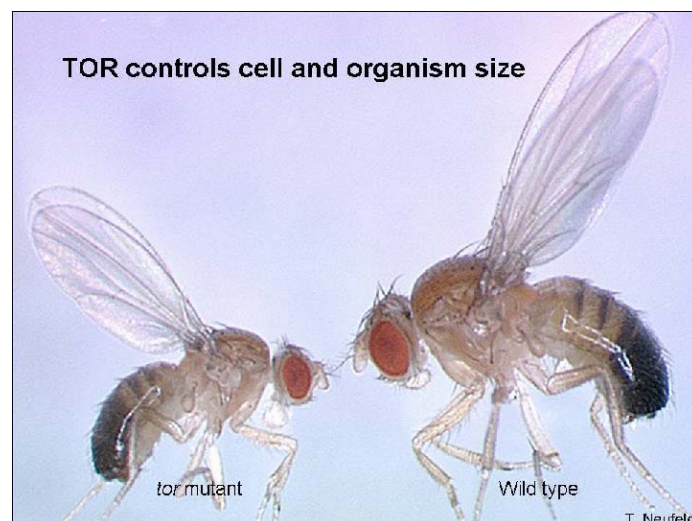
Εικόνα 9: Απουσία θρεπτικών συστατικών υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ mLST8–mTOR–Raptor που προλαμβάνει την επαφή της mTOR με τις πρωτεΐνες στόχους της. Επί παρουσίας θρεπτικών ουσιών προκαλείται αλλαγή στη στερεοδομή και αποσύνδεση της mLST8 από τη Raptor. Η Raptor είναι έτσι σε θέση να συνδεθεί με τις κινάσες S6K και 4EBP1, οι οποίες καθίστανται πλέον προσβάσιμες στην mTOR με επακόλουθο τη φωσφορυλίωσή τους (από αναφορά⁶⁴)

Αντίθετα η έλλειψη θρεπτικών συστατικών περιορίζει την ικανότητα του mTORC1 να φωσφορυλιώνει τις κινάσες S6K και 4EBP1 και να θέτει σε λειτουργία μηχανισμούς πρωτεϊνοσύνθεσης. Η ανακάλυψη της σχέσης και της σύνδεσης των πρωτεϊνών mLST8–mTOR–Raptor προσφέρει μια μερική εξήγηση για τον τρόπο με τον οποίο τα θρεπτικά συστατικά τροποποιούν τη δραστηριότητα του mTORC1. Υπάρχει όμως μια ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στην αναστολή του mTORC1 από τη στέρηση θρεπτικών ουσιών και την αναστολή από χορήγηση ραπαμυκίνης: η στέρηση θρεπτικών ουσιών δεν διακόπτει τη σύνδεση της Raptor με την mTOR ενώ η ραπαμυκίνη προκαλεί αποσύνδεση των δυο πρωτεϊνών⁸¹. Λεπτομερέστερη αναφορά στους μηχανισμούς ρύθμισης της δραστηριότητας της mTOR από συγκεκριμένες θρεπτικές ουσίες (αμινοξέα, γλυκόζη) και από την επάρκεια ενέργειας γίνεται σε επόμενες ενότητες.

3.4.2 Ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες

Κινάση των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K)

Το μονοπάτι της mTOR ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες μέσω της κινάσης των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K). Η σύνδεση της ινσουλίνης ή των προσομοιαζόντων στην ινσουλίνη αυξητικών παραγόντων (insulin-like growth factors IGFs) ή άλλων αυξητικών παραγόντων (PDGF, VEGF, TGF) στους υποδοχείς τους, οδηγεί σε φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (insulin receptor substrate, IRS), και ακολούθως οδηγεί σε ενεργοποίηση της PI3K. Η PI3K μετατρέπει την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP2) της κυτταρικής μεμβράνης σε 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP3). Τη σύνθεση και άθροιση της PIP3 ανταγωνίζεται η φωσφατάση των λιπιδίων και ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (phosphate and tensin homolog on chromosome 10). Μεταλλάξεις της PTEN προκαλούν ανεμπόδιση ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης S6K και 4EBP1^{82, 83}. Επίσης μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την PTEN οδηγούν στην εμφάνιση καρκινογένεσης και αυτοανοσίας^{84, 85}. Στη Δροσόφιλα η απώλεια της PTEN προκαλεί αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η απώλεια της TOR προκαλεί μείωση του μεγέθους τους (Εικόνα 10). Κύτταρα με ταυτόχρονη απώλεια και της PTEN και της TOR παρουσιάζουν φαινότυπο όπως αυτά με έλλειψη μόνο της TOR γεγονός που αποδεικνύει τον επιστατικό ρόλο της TOR επί της PTEN ή διαφορετικά ότι βρίσκεται κατωφερέστερα στη μετάδοση του ενδοκυττάριου σήματος από την PI3K^{86, 87}.



Εικόνα 10: Το μέγεθος των κυττάρων και του οργανισμού συνολικότερα βρίσκεται υπό τον έλεγχο της TOR.

Η χορήγηση των φαρμακολογικών αναστολέων της PI3K, βορτμαννίνης (wortmannin) και LY294002, προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των S6K και 4EBP1⁸⁸⁻⁹⁰ με συνέπεια την μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Υπερέκφραση μιας μη λειτουργικής (dominant negative) ρυθμιστικής υπομονάδας της PI3K (p85) προκαλεί σημαντική ελάττωση της φωσφορυλίωσης της S6K από την ινσουλίνη⁹¹. Επιπρόσθετα η υπερέκφραση της ενεργοποιημένης καταλυτικής υπομονάδας της PI3K (p110) σε κύτταρα HEK-293 επάγει τη φωσφορυλίωση της 4EBP1 ακόμα και επί απουσίας ινσουλίνης ή αυξητικών παραγόντων, κατά τρόπο ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη⁹². Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι η τροφική δράση της PI3K ασκείται μέσω της mTOR.

Akt: η κινάση που συνδέει την PI3K με την mTOR

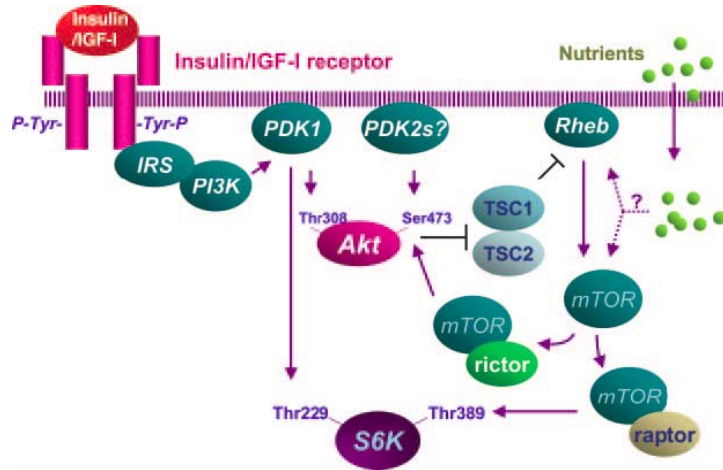
Η παραγωγή PIP3 από την ενεργοποιημένη PI3K, προκαλεί μετανάστευση των κινασών PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) και Akt1 στην κυτταρική μεμβράνη και παράλληλα, φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 (καταλυτική περιοχή) από την PDK1.

Η Akt ανήκει στις πρωτεΐνες AGC (αρχικά για cAMP dependent, cGMP dependent, and protein kinase C) και είναι γνωστή επίσης ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB). Στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζεται με 3 ισομορφές (Akt1, Akt2, Akt3) που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια. Άλλες κινάσες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια AGC πρωτεϊνικών κινασών είναι η S6K και η SGK (serum and glucocorticoid protein kinase).

Υπερέκφραση μιας ενεργοποιημένης μορφής της Akt σε κύτταρα HEK-293 προάγει τη φωσφορυλίωση της 4EBP1 ακόμα και επί απουσίας αυξητικών παραγόντων και κατά τρόπο μη ευαίσθητο στη βορτμαννίνη αλλά ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη⁹². Τα ευρήματα αυτά τοποθετούν την Akt στην κατωφέρεια της PI3K και άνωθεν της mTOR στη μετάδοση του σήματος.

Η φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 από την PDK1, έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ενεργοποίηση της Akt1. Κατ'αναλογία η ενεργοποιημένη PDK1 προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση της S6K στην καταλυτική της περιοχή (Thr229) και μερική ενεργοποίηση αυτής (Εικόνα 11). Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt1 και της S6K

απαιτεί μια δεύτερη φωσφορυλίωση στη θέση Ser473 (για την Akt1) και Thr389 (για την S6K) που βρίσκονται στις ρυθμιστικές υδρόφοβες περιοχές (**HM**) τους, οι οποίες επιτελούνται από μια άγνωστη μέχρι πρότινος κινάση που ονομάστηκε PDK2⁶⁴.



Εικόνα 11: Ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες και θρεπτικές ουσίες. Η φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 από την PDK1, έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ενεργοποίηση της Akt1. Κατ'αναλογία η ενεργοποιημένη PDK1 προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση της S6K στην καταλυτική της περιοχή (Thr229) και μερική ενεργοποίησή της. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt1 και της S6K απαιτεί μια δεύτερη φωσφορυλίωση στη θέση Ser473 (για την Akt1) και Thr389 (για την S6K) που βρίσκονται στις ρυθμιστικές υδρόφοβες περιοχές (**HM**) τους, οι οποίες επιτελούνται από μια άγνωστη μέχρι πρότινος κινάση που ονομάστηκε PDK2. Από τις διάφορες κινάσες που έχουν προταθεί, η πλέον πιθανή για το ρόλο της PDK2 είναι η mTOR η οποία όταν συνδέεται στη Rictor προκαλεί φωσφορυλίωση του HM (Ser473) τόσο της Akt όσο και της SGK, ενώ όταν συνδέεται με τη Raptor παίζει το ρόλο της PDK2 (φωσφορυλίωση του **HM**) για την S6K. Η πλήρως ενεργοποιημένη Akt, αναστέλλει το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της οξώδους σκλήρυνσης TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 και tuberous sclerosis complex 2). Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 μέσω αναστολής του Rheb.

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί διάφορες κινάσες που μπορούν να παίξουν το ρόλο της PDK2 όπως για παράδειγμα η ίδια η PDK-1, η κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνες [integrin-linked kinase (ILK)] που όπως αναφέραμε στην ενότητα 2.4 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων, η ίδια η Akt,

η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-dependent protein kinase), η πρωτεϊνική κινάση C (PKCβII), η κινάση 6 σχετιζόμενη με τη NIMA (never in mitosis gene A) (NEK6) και τέλος η mTOR (όταν είναι συνδεδεμένη με Rictor στο mTORC2)^{42, 93-98}. Από τις κινάσες αυτές η πλέον πιθανή για το ρόλο της PDK2 είναι η mTOR η οποία όταν συνδέεται στο Rictor προκαλεί φωσφορυλίωση του HM (Ser473) τόσο της Akt όσο και της SGK, ενώ όταν συνδέεται με το Raptor παίζει το ρόλο της PDK2 (φωσφορυλίωση του **HM**) για την S6K⁹⁸ (Εικόνα 11).

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προέκυψε από νεότερες έρευνες είναι ότι οι αναστολείς LY294002, PI-103 και NVP-BEZ235 που εθεωρούντο ειδικοί για την PI3K, φαίνεται να αναστέλλουν το ίδιο αποτελεσματικά και την mTOR. Επομένως δεν γνωρίζουμε σε ποιο βαθμό η ικανότητα αυτών των μορίων να αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της Akt αντιπροσωπεύει μόνο αναστολή της PI3K ή επιπρόσθετα αναστολή και της mTOR και σε τι βαθμό. Η χρήση νεότερων ειδικών αναστολέων της mTOR όπως η πυραζολοπυριμιδίνες PP242 και PP30 κατέδειξε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση της Akt ασκείται ειδικά από την mTOR (συνδεδεμένη στο mTORC2) και είναι ανεξάρτητη από την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt που ασκείται από την ενεργοποιημένη PI3K (η ποιο σωστά από την PDK1). Οι πυραζολοπυριμιδίνες είναι σε θέση να αναστείλουν και την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt αλλά σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις και με μια διαδικασία που εξαρτάται απόλυτα από την αναστολή της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser473⁹⁹. Επίσης αναστέλλουν και όλες τις γνωστές λειτουργίες του mTORC1, οπότε θεωρούνται ειδικοί αναστολείς της mTOR είτε αυτή βρίσκεται στο mTORC1 είτε στο mTORC2. Σε *in vivo* πειράματα φάνηκε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση στο λιπώδη και ηπατικό ιστό εξαρτάται απόλυτα από την ακεραιότητα του mTORC2 αλλά στο μυϊκό ιστό πρέπει να εμπλέκεται άλλη κινάση όπως η DNA-PK. Έτσι το πρόβλημα της φύσης της PDK2 φαίνεται να παραμένει ακόμα και σήμερα καθώς ενδέχεται η PDK2 να είναι διαφορετική στους διάφορους ιστούς.

Γενικά η 2^η φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Ser473 θεωρείται ότι αυξάνει την ενεργότητα της κατά 5 φορές⁹⁷. Η πλήρως ενεργοποιημένη Akt, αναστέλλει το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της οζώδους σκλήρυνσης TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 και tuberous sclerosis complex 2). Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί **αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1** (Εικόνα 12) και ως εκ τούτου η αναστολή του

από την Akt προκαλεί έμμεσα ενεργοποίηση του mTORC1^{64, 100}. Η Akt είναι όμως σε θέση να ενεργοποιήσει το mTORC1 και άμεσα, προκαλώντας φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση Ser2448^{65, 101-103}.

Η μεμονωμένη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 (σε κύτταρα MEF mSIN/- που δεν έχουν Ser473pAkt λόγω απώλειας του mTORC2) διατηρεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει το TSC1/TSC2 και την GSK3, αλλά καταργεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη FoxO στον πυρήνα των κυττάρων⁹⁹.

TSC1/TSC2

Οι πρωτεΐνες TSC1 (hamartin) και TSC2 (tuberin) κωδικοποιούνται από 2 ξεχωριστά γονίδια το *TSC1* και *TSC2* μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση της οζώδους σκλήρυνσης, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμαρτωμάτων και πολύ μεγάλων κυττάρων σε διάφορα όργανα. Μεταλλάξεις στα γονίδια της Δροσόφιλα *dTSC1* και *dTSC2* προκαλούν αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και των οργάνων παρόμοια με την αύξηση που παρατηρείται κατά την απαλοιφή του PTEN. Αντίθετα η ταυτόχρονη υπερέκφραση των γονιδίων *dTSC1* και *dTSC2* προκαλεί μείωση του μεγέθους και του αριθμού των κυττάρων καθώς και του μεγέθους των οργάνων στη Δροσόφιλα¹⁰⁴. Οι δύο πρωτεΐνες λειτουργούν ως ετεροδιμερές διότι υπερέκφραση μόνο της μια εκ των δυο δεν επιφέρει καμία μεταβολή στον φαινότυπο. Γενετικές μελέτες επιστασίας έδειξαν ότι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 λειτουργεί ανάμεσα στην Akt και την S6K στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης¹⁰⁴. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε το 2002, όταν βρέθηκε ότι η Akt φωσφορυλιώνει άμεσα το TSC2 τόσο in vivo όσο και in vitro. Η απαλοιφή της TSC2 σε κύτταρα HEK-293 προκαλεί μόνιμη φωσφορυλίωση της S6K & 4EBP1 κατά τρόπο ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, ενώ η υπερέκφραση του συμπλέγματος TSC1/TSC2 στα ίδια κύτταρα αναστέλλει την από την ινσουλίνη επαγόμενη φωσφορυλίωση της S6K & 4EBP1. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι έναν από τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της mTOR από την Akt είναι η φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση του TSC1/TSC2. Υπάρχουν διάφορες πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της ανθρώπινης TSC2 από την Akt, όπως η Ser939, Ser981, Ser1130 και η Thr1462 (εικόνα 14). Η φωσφορυλίωση του TSC2 πιθανά αποσταθεροποιεί το σύμπλεγμα TSC1/TSC2, οδηγώντας σε αποδόμηση των συστατικών του, άρση της ανασταλτικής του δράσης επί του

mTORC1, ενεργοποίηση αυτού και τελικά φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών S6K & 4EBP1¹⁰⁵. Εν τούτοις η απαλοιφή της Akt1 και Akt2 ενώ μειώνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση των S6K & 4EBP1 (δηλαδή τη δράση του mTORC1), δεν προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλιωμένης TSC2¹⁰⁶ γεγονός που συνηγορεί υπέρ της παρουσίας πρόσθετων μηχανισμών είτε για τη φωσφορυλίωση της TSC2 είτε για την ρύθμιση του mTORC1 από την Akt. Άλλωστε, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Akt μπορεί να προκαλέσει άμεσα ενεργοποίηση του mTORC1^{65, 101-103}, μέσω φωσφορυλίωσης της mTOR στη θέση Ser2448.

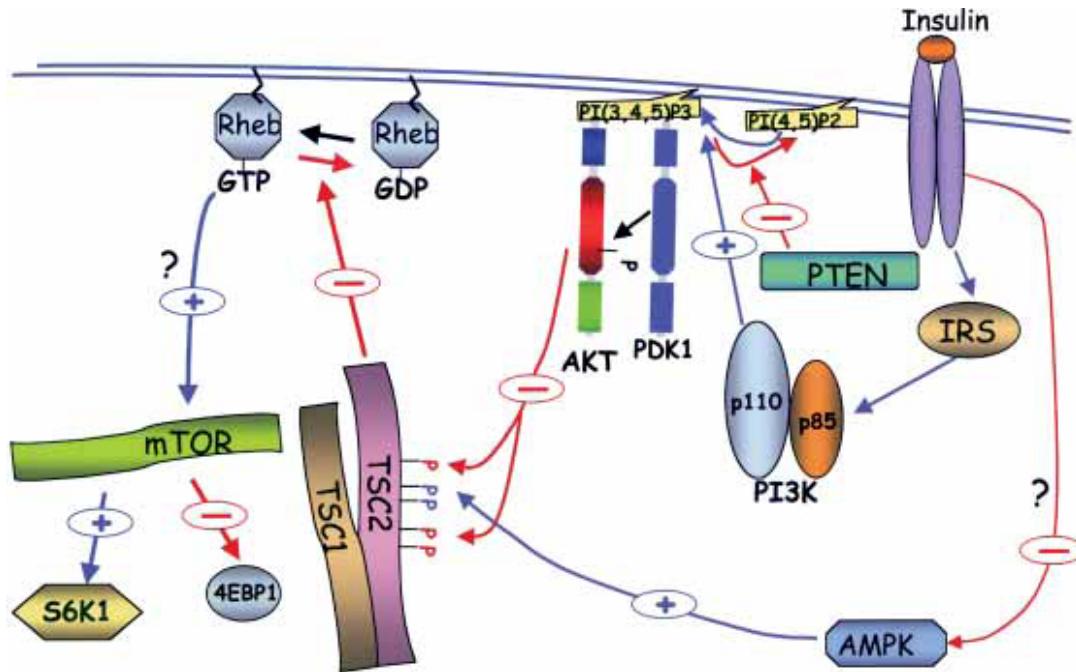
Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του mTORC2, καθώς η αναστολή της λειτουργικότητας του TSC1/TSC2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές, προκάλεσε την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Ser473 από το mTORC2. **Έτσι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 και θετικό ρυθμιστή του mTORC2**¹⁰⁷.

Rheb & Rag

Ο μηχανισμός αναστολής του mTORC1 από το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 διευκρινίστηκε το 2003, με την ανακάλυψη ότι η μικρή GTP-συνδεόμενη πρωτεΐνη Rheb (Ras homolog enriched in brain) έχει επιστατικό ρόλο ανάμεσα στο TSC1/TSC2 και στο mTORC1¹⁰⁸. Όταν η Rheb βρίσκεται υπό τη μορφή *GTP*-Rheb ενεργοποιεί το mTORC1 ενώ υπό τη μορφή *GDP*-Rheb το αναστέλλει. Το TSC1/TSC2 λειτουργεί ως GTPase (GAP) για την πρωτεΐνη Rheb μετατρέποντας την *GTP* μορφή σε *GDP*-Rheb και ως εκ τούτου αναστέλλει έμμεσα τη δραστηριότητα του mTORC1. Η αναστολή της GAP δραστηριότητας του TSC1/TSC2 από την Akt, αυξάνει την διαθέσιμη *GTP*-Rheb και ενεργοποιεί το mTORC1 (Εικόνα 12).

Η απώλεια οιασδήποτε από τις πρωτεΐνες TSC προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση του mTORC1 ακόμα και επί απουσίας των υπερκείμενων σημάτων που φυσιολογικά απαιτούνται για τη διατήρηση της δραστηριότητας του μονοπατιού PI3K/Akt/mTORC1. Η μόνη αξιοσημείωτη εξαίρεση είναι η παροχή αμινοξέων, καθώς το μονοπάτι του mTORC1 παραμένει ευαίσθητο στη στέρηση αμινοξέων (δηλαδή αναστέλλεται) ακόμα και σε κύτταρα που στερούνται είτε το TSC1 είτε το TSC2¹⁰⁹. Φαίνεται πως ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων,

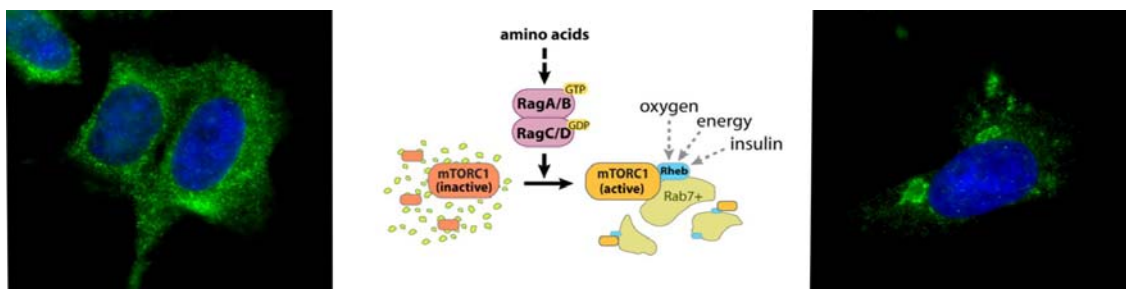
ινσουλίνης, ή ενεργοποιημένων πρωτεϊνών του σηματοδοτικού μονοπατιού (πχ PI3K, pAkt, TSC1/2, GTP-Rheb) το mTORC1 δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί σε καταστάσεις θρεπτικής στέρησης αμινοξέων.



Εικόνα 12: Η ρύθμιση της δραστηριότητας της mTOR από αυξητικούς παράγοντες μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την TSC2 αυξάνοντας έτσι την GTP-Rheb που είναι ο τελικός ενεργοποιητής της mTOR με ένα άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Επιπρόσθετα η TSC2 ενεργοποιείται από την κινάση AMPK που αποτελεί αισθητήρα της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου (από αναφορά ⁶⁴)

Επομένως η ενεργοποίηση του mTORC1 προϋποθέτει την ταυτόχρονη παρουσία αμινοξέων και αυξητικών παραγόντων για την ενεργοποίησή του. Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι οι πρωτεΐνες Rag συνδέονται με το Raptor, βοήθησε στην εξακρίβωση του μηχανισμού της υποχρεωτικής απενεργοποίησης του mTORC1 επί ελλείψεως αμινοξέων. Συγκεκριμένα επί απουσίας αμινοξέων το mTORC1 εντοπίζεται διάσπαρτο σε κυτταροπλασματικά οργανίδια όπως η συσκευή Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα ενδοσώματα. Η χορήγηση αμινοξέων γίνεται αντιληπτή από μικρές GTP-συνδέουσες πρωτεΐνες της οικογένειας Ras (Rag a, b, c, d). Οι πρωτεΐνες Rag αφενός ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια τακτοποίηση των περμεασιών των αμινοξέων και την αυτοφαγία και αφ'ετέρου προκαλούν

μετανάστευση του mTORC1 σε πρώιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα (Εικόνα 13). Όταν το mTORC1 μεταναστεύει στις θέσεις αυτές, «συναντά» την GTP-Rheb και δύναται έτσι να ενεργοποιηθεί. Απουσία αμινοξέων ή πρωτεϊνών Rag το mTORC1 δεν μεταναστεύει και αδυνατεί να ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες ή από ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένα τμήματα του μονοπατιού PI3K/Akt/TSC1-2/GTP-Rheb ¹⁰⁹.



Εικόνα 13: Οι πρωτεΐνες Rag «αισθάνονται» την παρουσία αμινοξέων και προκαλούν τη μετανάστευση του mTORC1 από το ενδοπλασματικό δίκτυο σε πρώιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Όταν μεταναστεύει στις θέσεις αυτές, το mTORC1 «συναντά» την GTP-Rheb και δύναται έτσι να ενεργοποιηθεί. (από αναφορά ¹⁰⁹)

Σε κύτταρα δροσόφιλας με ανεπαρκή έκφραση Rheb παρατηρείται, όπως είναι αναμενόμενο, μειωμένη δραστηριότητα mTORC1, αλλά το ποιο ενδιαφέρον είναι ότι αυξάνεται η δραστηριότητα της Akt. Αντίστοιχα στα ίδια κύτταρα η υπερέκφραση της Rheb ενεργοποιεί το mTORC1 και αναστέλλει τη δραστηριότητα της Akt. Επίσης σε κύτταρα στερούμενα TSC2, ξανά η δραστηριότητα του mTORC1 είναι αυξημένη και της Akt μειωμένη. Τα παραπάνω δείχνουν ότι υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ mTORC1 και Akt ο οποίος φαίνεται ότι ασκείται μέσω της S6K ¹¹⁰. Η S6K όταν φωσφορυλιωθεί από το ενεργοποιημένο mTORC1, ασκεί αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση επί του IRS, με αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης-ενεργοποίησης της Akt και αντιστρόφως (Εικόνα 14 παρακάτω).

Φωσφατιδικό οξύ

Κατά τη διέγερση του κυττάρου από αυξητικούς παράγοντες παρατηρείται ενεργοποίηση της φωσφορολιπάσης D1 (PLD1) μέσω της μικρής GTPase Cdc42. Η ενεργοποίηση της PLD1 προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του

φωσφατιδικού οξέως (ΦΟ). Το ΦΟ συνδέεται στο FRB τμήμα της mTOR και την ενεργοποιεί ¹¹¹. Δεν είναι σαφές αν ο μηχανισμός ενεργοποίησης της mTOR από το ΦΟ υπεισέρχεται σε κάποιο σημείο του κλασσικού μονοπατιού ενεργοποίησης ή είναι εντελώς ανεξάρτητος. Φαίνεται όμως ότι η υπερέκφραση του TSC1/2 υπερισχύει και αναστέλλει την από το ΦΟ προκαλούμενη ενεργοποίηση της mTOR. Τέλος η δραστηριότητα του TSC2 ελέγχεται και από άλλες κινάσες πέραν της Akt, όπως για παράδειγμα από την AMPK, την PKC και την MAPK. Ο έλεγχος από την AMPK θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα για τον ενεργειακό έλεγχο της δραστηριότητας της mTOR. Για το ρόλο της PKC και της MAPK, τα λίγα που είναι γνωστά μέχρι σήμερα αναλύονται επίσης παρακάτω, αλλά γενικά θεωρείται πιθανό να προκαλούν φωσφορυλίωση της TSC2 σε θέσεις που αναγνωρίζονται από τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες 14-3-3. Η σύνδεση των πρωτεϊνών 14-3-3 με την TSC2 προκαλεί απομάκρυνση και καταστροφή της TSC2 ¹¹².

3.4.3 Ρύθμιση της mTOR από τον ενεργειακό μεταβολισμό

AMPK

Η μετάφραση του RNA και η βιογένεση των ριβοσωμάτων, δυο διαδικασίες που εξαρτώνται σημαντικά από την mTOR, απαιτούν την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας. Η ικανότητα της ισουλίνης να ενεργοποιεί την mTOR περιορίζεται όταν μειώνονται τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP είτε από μειωμένη διαθεσιμότητα γλυκόζης είτε λόγω περιορισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής. Η επίδραση του ενδοκυττάρια ATP στη δραστηριότητα της mTOR έχει συσχετισθεί με την αναφερόμενη υψηλή σταθερά διάστασης του ATP από την mTOR ($K_m=1\text{mM}$) γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι η mTOR αποτελεί «αισθητήριο» πρωτεΐνη για το ATP ανεξάρτητα από τα επίπεδα αμινοξέων ¹¹³. Η μείωση της διαθεσιμότητας γλυκόζης όμως, έχει ως αποτέλεσμα τη σχετική μείωση των ενδοκυττάρια επιπέδων ATP κατά 2 φορές, μέγεθος που δεν αρκεί για να εξηγήσει την αναστολή της mTOR με βάση τη σταθερά διάστασης. Αντίθετα η δραστηριότητα της AMP-ενεργοποιούμενης πρωτεϊνικής κινάσης [AMP-activated protein kinase (AMPK)] ρυθμίζεται από μικρές μεταβολές του ATP, ενώ παράλληλα η AMPK είναι σε θέση να αντιληφθεί μεταβολές του λόγου AMP/ATP. Όταν μειώνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ATP (η αυξάνεται ο λόγος AMP/ATP) ενεργοποιείται η AMPK και

προκαλεί μείωση της ενεργότητας της mTOR¹¹⁴ με μέτρο τη φωσφορυλίωση της S6K. Αντίστοιχα με τη στέρηση γλυκόζης, η χορήγηση του φαρμάκου AICAR (5-aminomidazole-4-carboxamide) ενεργοποιεί την AMPK και αναστέλλει την επαγόμενη από ινσουλίνη φωσφορυλίωση της S6K. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από την mTOR καθώς η φωσφορυλίωση μιας μεταλλαγμένης, ανθεκτικής στη ραπαμυκίνη S6K, δεν αναστέλλεται από τη χορήγηση AICAR. Η έκφραση μιας ενεργοποιημένης μορφής AMPK μειώνει τη φωσφορυλίωση της S6K και αντιστρόφως μια ανενεργός μορφή της AMPK την αυξάνει¹¹⁴.

Η AMPK είναι μια ετεροτριμερής κινάση αποτελούμενη από μια καταλυτική (α) υπομονάδα και δυο ρυθμιστικές (β και γ) υπομονάδες. Η AMPK ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες ενεργειακού stress, όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP μειώνονται και παράλληλα αυξάνονται τα επίπεδα του AMP, όπως συμβαίνει κατά τη στέρηση γλυκόζης και άλλων θρεπτικών συστατικών καθώς και σε συνθήκες υποξίας. Σε συνθήκες ενεργειακής κρίσης, το AMP συνδέεται άμεσα με την γ-υπομονάδα της AMPK και προλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση μια κρίσιμης περιοχής στην καταλυτική α-υπομονάδα της AMPK.

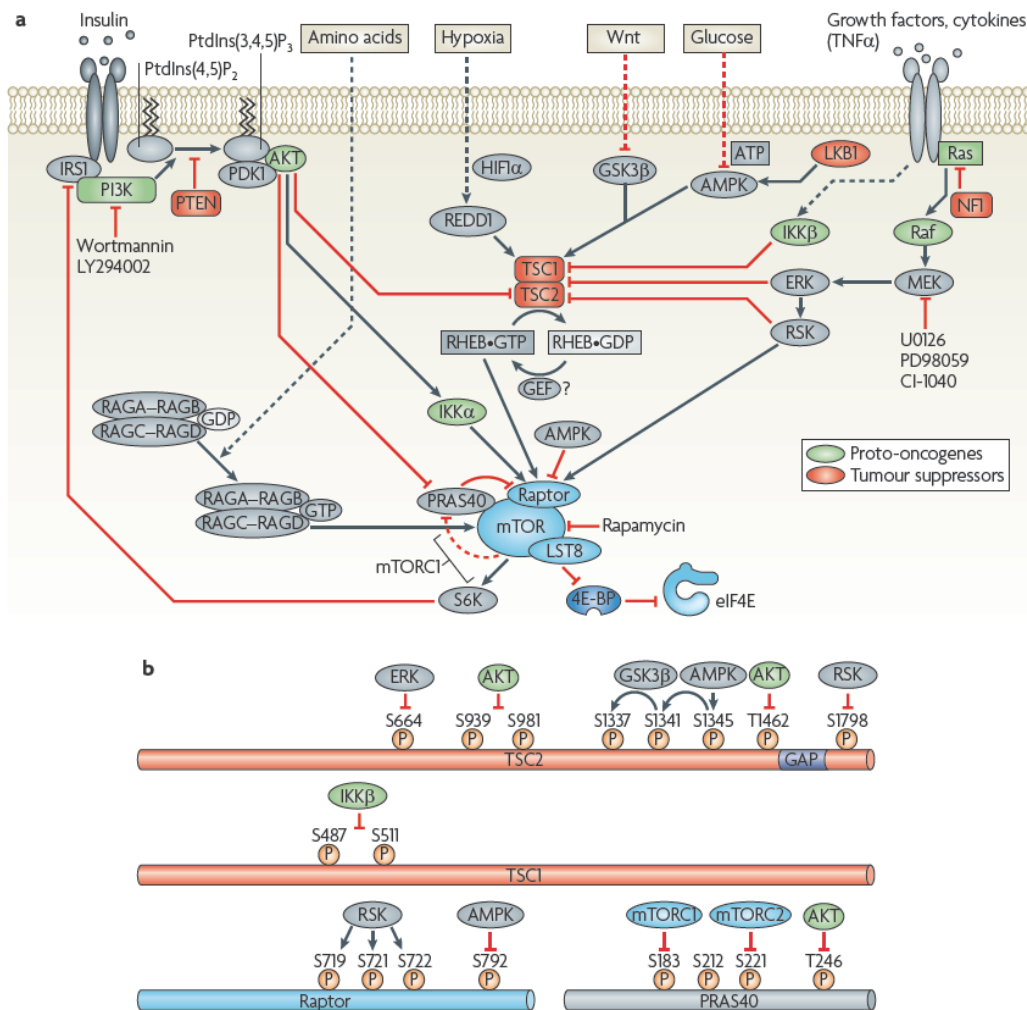
Η φωσφορυλίωση της α-υπομονάδας είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της AMPK και επιτελείται από την σερίνη/θρεονίνη κινάση LKB1. Η LKB1 ανακαλύφθηκε αρχικά ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο η μετάλλαξη του οποίου προκαλεί το σύνδρομο της οικογενούς πολυποδίασης στον άνθρωπο (Peutz-Jeghers syndrome), μια κληρονομούμενη (αυτοσωμική επικρατούσα) μορφή καρκίνου. Επιπρόσθετα μεταλλάξεις του LKB1 έχουν βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό (30–40%) ασθενών με σποραδικό μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS) παρουσιάζει σημαντικές φαινοτυπικές ομοιότητες με τη νόσο του Cowden, η οποία οφείλεται σε αδρανοποίηση του PTEN λόγω μεταλλάξεων. Σε αντίθεση όμως με τη νόσο του Cowden, στο PJS δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της PI3K ούτε της AKT, αλλά μόνο έντονη ενεργοποίηση του mTORC1. Το ίδιο παρατηρείται και σε κύτταρα ή ιστούς με ανεπάρκεια LKB1 η σε αμαρτώματα σε LKB1-ετερόζυγα ποντίκια και τέλος, σε καρκίνους του πνεύμονα στον άνθρωπο λόγω μετάλλαξης του LKB1¹¹⁵.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η ενεργειακή επάρκεια του κυττάρου καταγράφεται συνεχώς από την AMPK η οποία στη συνέχεια καθορίζει τη ροή ενέργειας είτε προς την κατεύθυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης (αναστολή της TSC2 και ενεργοποίηση της

mTOR) είτε προς την κατεύθυνση της παραγωγής ενέργειας (ATP) κάτι που συνεπάγεται την αναστολή της mTOR και της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η στέρηση γλυκόζης και η μακροχρόνια έλλειψη οξυγόνου προκαλεί ενεργοποίηση της AMPK με τρόπο εξαρτώμενο από την LKB1 και το AMP. Η στέρηση οξυγόνου ενεργοποιεί επίσης την GSK3β μέσω αναστολής του μονοπατιού των γλυκοπρωτεϊνών Wnt¹¹⁶ (Εικόνα 14). Η ενεργοποιημένη AMPK φωσφορυλιώνει άμεσα την TSC2 στη θέση Ser1345 και επιτρέπει έτσι τη περαιτέρω φωσφορυλίωση της TSC2 σε διατηρημένες θέσεις σερίνης από την GSK3β, (διαφορετικές απ' αυτές που φωσφορυλιώνονται από άλλες κινάσες)¹¹⁷. Οι φωσφορυλίώσεις αυτές ενεργοποιούν το TSC1/TSC2 και καταστέλλουν το mTORC1. Όμως ο μηχανισμός ελέγχου του mTORC1 από τη γλυκόζη και το οξυγόνο διατηρείται σε όλα τα είδη, ακόμα και αυτά που στερούνται της ύπαρξης των TSC1/TSC2. Ακόμα και σε κύτταρα με ανεπάρκεια της TSC2 παρατηρείται μερική ευαισθησία της mTOR στη στέρηση ενέργειας. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται ίσως από το γεγονός ότι η AMPK δύναται να φωσφορυλιώνει άμεσα (χωρίς παρεμβολή της TSC2) την mTOR στη θέση Thr2446 στο NRD τμήμα, περιορίζοντας έτσι την δυνατότητα της Akt να φωσφορυλιώνει την mTOR στη θέση Ser2448. Φαίνεται ότι ισχύει και το αντίστροφο δηλαδή η φωσφορυλίωση στη θέση Ser2448 από την Akt καταργεί τη δυνατότητα της AMPK να αναστείλει την mTOR με φωσφορυλίωση στη θέση Thr2446. Επομένως οι δύο φωσφορυλίώσεις είναι «ανταγωνιστικές» με την έννοια ότι αποκλείει η μία την άλλη¹¹⁸. Τέλος η AMPK μπορεί να αναστείλει άμεσα την Raptor με φωσφορυλίωση στη θέση Ser792 που προάγει τη σύνδεση της Raptor με πρωτεΐνες 14-3-3 και την αποδόμησή της με τελικό αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του mTORC1¹¹⁵.



Εικόνα 14: Συγκεντρωτική απεικόνιση της ρύθμισης του mTORC1 από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια

A. Η mTORC1 διεγείρεται από την ενεργοποιημένη GTP-μορφή της RHEB.

Ανώτερος ρυθμιστής της RHEB είναι το ογκοκατασταλτικό σύμπλεγμα της οξώδους σκλήρυνσης TSC1/TSC2. Η TSC2 εμπεριέχει ένα τμήμα με δραστηριότητα GAP (GTPase-activating protein) που μετατρέπει την RHEB στην ανενεργό της μορφή GDP-RHEB. Πολλαπλά υπερκείμενα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3K-AKT, το Ras-ERK-RSK, το TNF α -IKK β , το AMPK-GSK3 β , το LKB1-AMPK και το Wnt-GSK3 β ρυθμίζουν είτε θετικά είτε αρνητικά τη δραστηριότητα της mTORC1. Ονοματολογία: AMPK: AMP-activated protein kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β , IKK β : inhibitor of nuclear factor- κ B kinase, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, RSK: ribosomal S6 kinase και TNF α : tumour necrosis factor- α . Η TSC2 φωσφορυλιώνεται από διάφορες κινάσες όπως η AKT, ERK και RSK, με αποτέλεσμα τη μείωση της GAP δραστηριότητάς της επί

της RHEB. Αντιστρόφως η φωσφορυλιώσεις που προέρχονται από την AMPK και την GSK3 αυξάνουν την GAP δραστηριότητα της TSC2 επί της RHEB. Επιπρόσθετα ορισμένες από τις κινάσες αυτές ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της mTORC1 κατά τρόπο ανεξάρτητο από την TSC2. Για παράδειγμα η AKT μπορεί άμεσα να φωσφορυλιώσει τον ανασταλτικό παράγοντα της mTORC1 την πρωτεΐνη PRAS40 (40 kDa Pro-rich AKT substrate) και η RSK τη raptor με αποτέλεσμα και στις 2 περιπτώσεις την ενεργοποίηση του mTORC1. Αντίθετα η φωσφορυλίωση της raptor από την AMPK οδηγεί σε αναστολή του mTORC1. Επιπρόσθετα οι πρωτεΐνες Rag αντιλαμβάνονται τις μεταβολές της συγκέντρωσης των αμινοξέων και αντίστοιχα ελέγχουν την υποκυτταρική κατανομή της mTOR από περιοχές που δεν δύναται να ενεργοποιηθεί σε περιοχές που δύναται και αντίστροφα, συμβάλλοντας έτσι στη λειτουργία του mTORC1 ως βασικού αισθητήρα επάρκειας θρεπτικών συστατικών.

Η mTORC1 κινάση είναι ο κύριος ρυθμιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς αποτελεί κομβικό σημείο συνάθροισης σημάτων από αυξητικούς παράγοντες και άλλες ενδοκυττάρειες ή εξωκυττάρειες διεργασίες. Εκτός από τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 4E-BPs προκαλεί επίσης ενεργοποίηση των S6Ks, οι οποίες φωσφορυλιώνουν πολλούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης όπως ο eIF4B. Η mTORC1 πιστεύεται επίσης ότι ρυθμίζει τη διάρκεια της φωσφορυλίωσης-ενεργοποίησης των υποκείμενων στόχων της αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A). Οι ουσίες U0126, PD98059 and CI-1040 αναστέλλουν τις κινάσες MAPK/ERK (MEK) και οι ουσίες βορτμαννίνη και LY294002 είναι αναστολείς της PI3K.

B. Η φωσφορυλίωση των TSC2, TSC1, PRAS40 και raptor γίνεται από διάφορες υπερκείμενες κινάσες. Η φωσφορυλίωση της TSC2 στη θέση Ser1345 από την AMPK αποτελεί προϋπόθεση για την επακόλουθη φωσφορυλίωση της TSC2 από την GSK3β. Ονοματολογία: GEF: guanine nucleotide-exchange factor, HIF1α: hypoxia-inducible factor 1α, IRS1: insulin receptor substrate 1, NF1: neurofibromin 1, PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1, PtdIns: phosphatidylinositol, PTEN: phosphatase and tensin homologue, REDD1, protein regulated in development and DNA damage response 1 (γνωστή και ως DDIT4).

HIF1α και υποξικό stress

Εκτός από τη μακροχρόνια υποξία, ακόμα και η σύντομη στέρηση οξυγόνου μπορεί να αναστείλει τη δράση του mTORC1 περιορίζοντας έτσι την κατανάλωση ενέργειας

από ενεργοβόρες διαδικασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση. Στο μηχανισμό της ταχείας αναστολής του mTORC1 από την οξεία υποξία εμπλέκεται ο επαγόμενος από την υποξία παράγων 1α [hypoxia inducible factor 1α (HIF1α)]. Ο μεταγραφικός αυτό παράγοντας σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και επάγει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων όπως το *REDD1* (γνωστό και ως *DDIT4*). Η πρωτεΐνη REDD1 ανταγωνίζεται το TSC2 για τη σύνδεσή του με την ανασταλτική πρωτεΐνη 14-3-3. Έτσι σε συνθήκες υποξίας η αύξηση της REDD1 απελευθερώνει την TSC2 από την 14-3-3 και επιτρέπει την ανεμπόδιστη αναστολή του mTORC1 από το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 ¹¹⁹.

Συμπερασματικά με βάση τις προηγούμενες παρατηρήσεις φαίνεται ότι το σύμπλεγμα TSC1/2 αποτελεί το σημείο σύγκλισης για τα διάφορα ερεθίσματα που ρυθμίζουν την mTOR, όπως οι αυξητικοί παράγοντες (PI3K/Akt/TSC2), το οξυγόνο (HIF1α/REDD1), η επάρκεια γλυκόζης και ενέργειας (AMPK/LKB1) και η επάρκεια αμινοξέων (Rag). Η επάρκεια ενέργειας και αμινοξέων (ενότητα 3.4.2) φαίνεται παίζει τον πιο καθοριστικό ρόλο για την τελική ενεργοποίηση του mTORC1 και την προαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

3.4.4 Ρύθμιση της mTOR από το μονοπάτι των MAP κινασών

Τα τελευταία 5 χρόνια συγκεντρώθηκαν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι η δραστηριότητα του mTORC1 ελέγχεται και από το μονοπάτι Ras-ERK-RSK. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινά με τη σύνδεση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και άλλων μιτογόνων, σε υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Η ενεργοποίηση των GPCRs προκαλεί κινητοποίηση του μονοπατιού Ras-ERK-RSK. Η ενεργοποίηση της ERK (extracellular signal regulated kinase) και της RSK (p90 ribosomal S6 kinase) προκαλεί ανασταλτική φωσφορυλίωση της TSC2 στις θέσεις Ser664 και Ser1798 αντίστοιχα ¹²⁰ (Εικόνα 14). Οι φωσφορυλιώσεις αυτές λειτουργούν αθροιστικά με τις ανασταλτικές φωσφορυλιώσεις που προέρχονται από την Akt.

Η RSK εκτός από αναστολή του TSC2, μπορεί και άμεσα να ενεργοποιήσει το mTORC1 με φωσφορυλίωση του raptor σε θέσεις Ser 719-721-722 (Εικόνα 14). Καθώς οι εστέρες φορβόλης (καρκινογόνα) και αρκετοί αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν το mTORC1 ανεξάρτητα από (ή παρακάμπτοντας) την Akt, η φωσφορυλίωση του raptor από την RSK προσφέρει ενδεχομένως ένα νέο μηχανισμό

ενεργοποίησης του mTORC1 καθώς η φωσφορυλίωση αυτή είναι σε θέση να υπερκεράσει την ανασταλτική δράση της PRAS40. Η εξαρτώμενη από την ERK φωσφορυλίωση του TSC2 προάγει την αποσύνδεση των πρωτεϊνών TSC1–TSC2 και ενεργοποίηση του mTORC1. Επομένως το ενεργοποιούμενο από μιτογόνα μονοπάτι Ras–ERK–RSK λειτουργεί παράλληλα με το κλασσικό πλέον μονοπάτι PI3K–Akt και κατευθύνει διάφορα ενδοκυττάρια μηνύματα προς το mTORC1.

3.4.5 Ρύθμιση της mTOR από το μονοπάτι του TNF α .

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων [tumour necrosis factor- α (TNF α)], μπορούν να επάγουν τη δραστηριότητα του mTORC1. Ο TNF α είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών παθήσεων περιλαμβανομένου και του καρκίνου. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η κινάση IKK β [inhibitor of nuclear factor κ B (NF κ B) kinase- β ; γνωστή και ως IKKB], που αποτελεί σημαντικό συστατικό στοιχείο του σηματοδοτικού μονοπατιού του TNF α δύναται να φωσφορυλιώνει το TSC1 στη θέση Ser487 και Ser511, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του TSC1/TSC2 και την ενεργοποίηση του mTORC1 (Εικόνα 14).

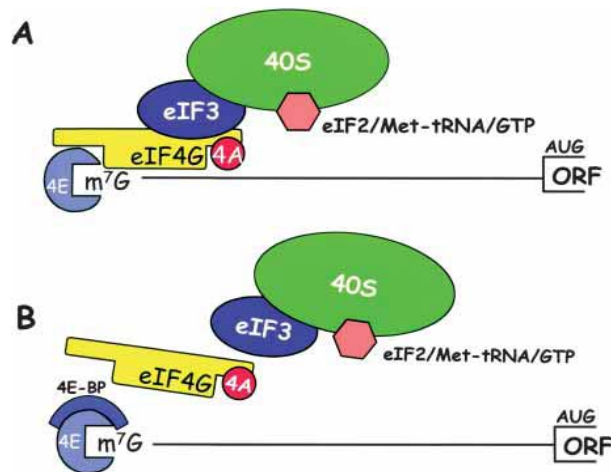
Σε πολλές νεοπλασίες στον άνθρωπο ο TNF α προάγει την παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα [vascular endothelial growth factor (VEGF)] και την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης του mTORC1 με το μηχανισμό που προαναφέρθηκε. Επιπρόσθετα ο TNF α μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας την Akt η οποία ως απάντηση επάγει την κινάση IKK α και η οποία με τη σειρά της επάγει το mTORC1. Ένα σημαντικό εύρημα είναι ότι σε ορισμένες καρκινικές σειρές η IKK α απαιτείται για την ενεργοποίηση του mTORC1 από την Akt αποτελώντας έτσι ενδιάμεσο σταθμό μεταξύ Akt και mTORC1^{121, 122}. Παραμένει ωστόσο άγνωστος ο μηχανισμός με τον οποίο η IKK α προκαλεί την ενεργοποίηση του mTORC1.

3.5 Υποκείμενοι στόχοι της mTOR

3.5.1 Ρύθμιση της μετάφρασης

Η έναρξη της μετάφρασης προϋποθέτει τη σύνδεση του ριβοσώματος στο 5' άκρο του mRNA με τη βοήθεια παραγόντων έναρξης, όπως οι eIF4A, eIF4B, eIF4G, και

eIF4E. Το 5' άκρο του mRNA όλων πυρηνικών μεταφραζόμενων mRNA διαθέτει μια δομή μεθυλιωμένης στη θέση 7 τριφωσφορικής γουανοσίνης (m⁷GpppN όπου m υποδηλώνει μεθυλ-ομάδα και N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο), που ονομάζεται 5-cap και προστατεύει το mRNA από την αποδόμηση από ενδονουκλεάσες, επιτρέπει την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα και αναγνωρίζεται από το ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης 4E (eIF4E) για την έναρξη της μετάφρασης. Μοναδική εξαίρεση στην 5-cap μετάφραση αποτελούν τα mRNAs που διαθέτουν μια εσωτερική περιοχή σύνδεσης που αναγνωρίζεται από το ριβόσωμα [internal ribosome-binding site (IRES)] χωρίς να απαιτείται η ύπαρξη του 5-cap άκρου ή των παραγόντων έναρξης. Η έναρξη της μετάφρασης ξεκινά με τη σύνδεση του eIF4E στο 5-cap άκρο του mRNA και το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης με τον eIF4A και τον eIF4G (όλο το σύμπλοκο ονομάζεται eIF4F). Ο eIF4F συνδέεται με τη 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και την φέρνει σε επαφή με το mRNA. Ο eIF4B είναι απαραίτητος για την μεταφορά και σύνδεση του ριβοσώματος στο mRNA καθώς και για την ενεργοποίηση του eIF4A μιας RNA ελικάσης η οποία απαιτείται για το «ξετύλιγμα» του RNA για την έναρξη της μετάφρασης (Εικόνα 15A).



Εικόνα 15: Μηχανισμός έναρξης της 5-cap μετάφρασης (από αναφορά ⁶⁴)

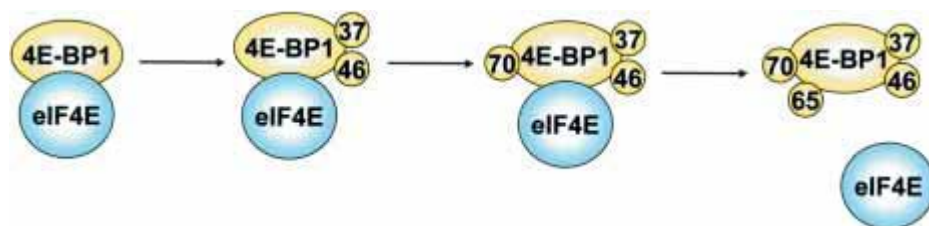
Οι ανασταλτικές πρωτεΐνες 4E-BP συνδέονται με τον eIF4E και αποτρέπουν την αλληλεπίδρασή του με τον eIF4G, αναστέλλοντας έτσι τη σύνδεση του ριβοσώματος (Εικόνα 15B). Τέλος ο eIF3, η μικρή ριβοσωματική υπομονάδα και το τριπλό σύμπλοκο (αποτελείται από τα eIF2, Met-tRNA και GTP) κινητοποιούνται προς το 5-cap άκρο και σχηματίζουν το 48S σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης (translation

preinitiation complex). Ο eIF4G λειτουργεί επομένως σαν σκελετός για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης.

Πολλαπλά συστατικά στοιχεία του μηχανισμού έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και των ριβοσωμάτων αποτελούν άμεσα ή έμμεσα στόχους της mTOR. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τους παράγοντες eIF4B, eIF4G και eIF4E, ο τελευταίος εκ των οποίων ενεργοποιείται με τη φωσφορυλίωση των αναστολέων του (δηλαδή τις 4EBP πρωτεΐνες) από την mTOR. Ο eIF4G υφίσταται φωσφορυλίωση σε διάφορες θέσεις ως απάντηση σε ερεθίσματα αρχόμενα από αυξητικούς παράγοντες. Ορισμένες από αυτές τις θέσεις φωσφορυλίωσης εξαρτώνται άμεσα από το mTORC1, αλλά συγκεκριμένα δεδομένα για τη σημασία τους δεν είναι προς το παρόν γνωστά. Επιπρόσθετα η S6K και η κατωφερέστεροι στόχοι της όπως π.χ η ριβοσωμιακή πρωτεΐνη S6 και ο παράγοντας επιμήκυνσης 2 [elongation factor 2 (eEF2)], αποτελούν επίσης στόχους του μονοπατιού όπως αναλύεται παρακάτω.

3.5.2 4E-BPs

Στα θηλαστικά η οικογένεια των 4E-BPs αποτελείται από 3 μέλη την 4E-BP1, 4E-BP2 και 4E-BP3 που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια, ενώ η Δροσόφιλα εκφράζει μόνο μια 4E-BP. Οι 4E-BPs ανταγωνίζονται τον eIF4G για μια κοινή θέση σύνδεσης στον eIF4E. Οι υποφωσφορυλιωμένες 4E-BPs συνδέονται ισχυρά στον eIF4E και αποτρέπουν την έναρξη της μετάφρασης. Αντίθετα οι υπερφωσφορυλιωμένες 4E-BPs δεν μπορούν να συνδεθούν στον eIF4E και επιτρέπουν έτσι την ελεύθερη σύνδεση του με τον eIF4G και την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η περισσότερο καλά μελετημένη από τις 4E-BPs μέχρι σήμερα είναι η 4E-BP1. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης της 4E-BP1 που έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο είναι κατά σειρά οι Thr37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83, Ser101 και Ser112. Στα τρωκτικά οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι οι ίδιες αλλά κατά μία μονάδα λιγότερο.



Εικόνα 16. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης της 4E-BP1 που έχουν περιγραφεί στον άνθρωπο

Οι σπουδαιότερες θέσεις φωσφορυλίωσης για τις οποίες υπάρχει γενική συμφωνία ότι ευθύνονται για την απελευθέρωση του eIF4E είναι οι τέσσερις πρώτες: Thr37, Thr46, Ser65 και Thr70 (Εικόνα 16). Οι φωσφορυλίώσεις αυτές συμβαίνουν κατά ιεραρχικό τρόπο και συμβάλουν αθροιστικά στην απελευθέρωση του eIF4E. Η mTOR είναι υπεύθυνη για τις 2 πρώτες φωσφορυλίώσεις (Thr37, Thr46) οι οποίες είναι προαπαιτούμενες για τις υπόλοιπες φωσφορυλίώσεις⁶⁴.

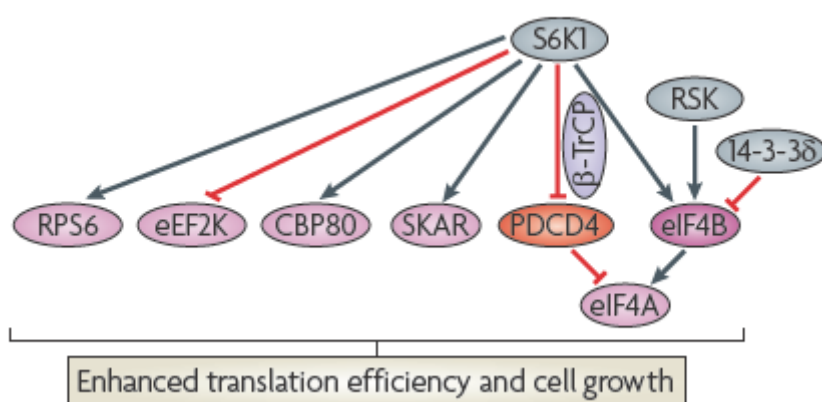
3.5.3 S6K

Τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν 2 παρόμοιες S6Ks την S6K1 και την S6K2 που κωδικοποιούνται από 2 διαφορετικά γονίδια. Οι S6Ks ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και αποτελούν άμεσους στόχους της mTOR. Καλύτερα μελετημένη είναι η S6K1 αλλά παρόλα αυτά, μεταξύ των δύο η S6K2 έχει την ισχυρότερη δραστηριότητα κινάσης. Το γενικότερα αποδεκτό μοντέλο για τη δράση της S6K είναι ότι προάγει την μετάφραση των 5' TOP (terminal oligopyrimidine tract) mRNAs τα οποία περιέχουν μια μικρή ολιγονουκλεοτιδική (4-14 νουκλεοτίδια) αλληλουχία από πυριμιδίνη δίπλα στο 5-cap άκρο. Τα 5' TOP mRNAs κωδικοποιούν αποκλειστικά για πρωτεΐνες που αποτελούν συστατικά στοιχεία του μηχανισμού πρωτεϊνοσύνθεσης όπως για παράδειγμα ριβοσωμιακές πρωτεΐνες, παράγοντες επιμήκυνσης και PABP [poly(A) binding protein].

Η πιο γνωστή πρωτεΐνη στην κατωφέρεια της S6K είναι η ριβοσωμιακή πρωτεΐνη S6, η φωσφορυλίωση της οποίας αποτελεί δείκτη δραστηριότητας της S6K. Πρόσφατα δεδομένα όμως δείχνουν ότι η S6 δεν αποτελεί τη μοναδική ή την κυριότερη πρωτεΐνη μέσω της οποίας η S6K ασκεί τη δράση της στην κυτταρική αύξηση και στην κινητοποίηση των 5' TOP mRNAs. Έτσι για παράδειγμα η 5' TOP μετάφραση ενεργοποιείται σε απάντηση στα αμινοξέα και τους αυξητικούς παράγοντες σε S6K1^{-/-} εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Επίσης η φωσφορυλίωση της S6 δεν μειώνεται σε S6K1^{-/-} ποντίκια γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της S6K δεν μεσολαβείται υποχρεωτικά από τη ριβοσωμιακή πρωτεΐνη S6 αλλά και ότι η φωσφορυλίωση της S6 δεν υπόκειται υποχρεωτικά στη δράση της S6K. Επίσης σε εμβρυικά κύτταρα με απαλοιφή τόσο της S6K1 όσο και της S6K2, η χορήγηση θρεπτικών συστατικών προκαλεί κινητοποίηση των 5' TOP mRNAs και του eEF1A σε πολυσώματα, στο ίδιο

βαθμό με τα πατρικά μη μεταλλαγμένα κύτταρα. Μάλιστα η 5' TOP μετάφραση στα κύτταρα αυτά αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη παρά την απουσία των S6Ks.

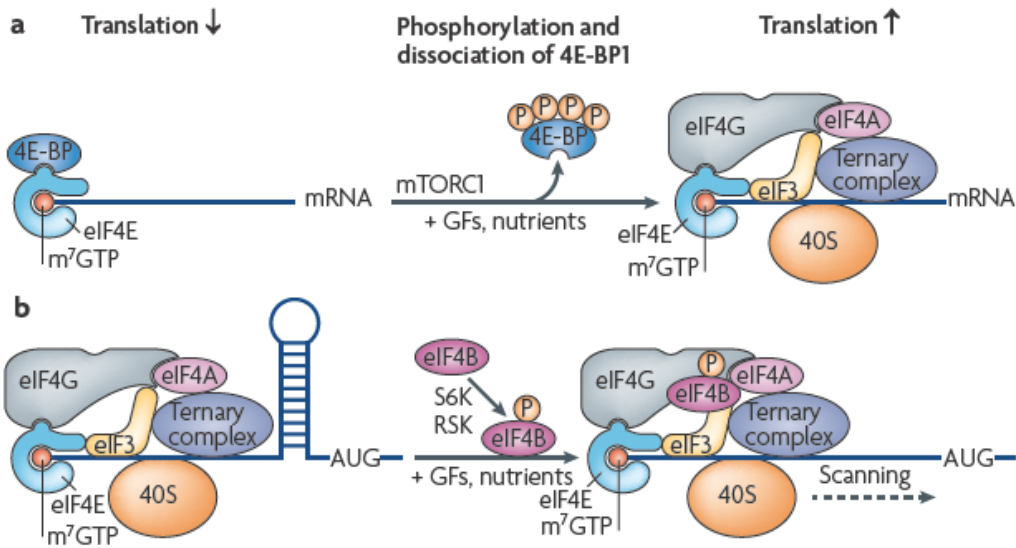
Άλλοι στόχοι της S6K (πέρα από την S6) που εξηγούν τη δράση της στην μετάφραση είναι ο παράγων έναρξης eIF4B, η S6K1/aly/REF-like target (SKAR), η programmed cell death 4 (PDCD4), η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης 2 [eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K)] και η ριβοσωμιακή πρωτεΐνη S6 (RPS6) οι οποίες σχετίζονται όλες με το μηχανισμό της 5-Cap και 5-TOP πρωτεϊνοσύνθεσης, της βιογένεσης των ριβοσωμάτων και της πρωτεϊνικής επιμήκυνσης, όπως αναλύεται παρακάτω (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Η κινάση 1 της 40S ριβοσωμιακής πρωτεΐνης S6 (S6K1) προκαλεί φωσφορυλίωση πολλών μεταφραστικών παραγόντων όπως η ριβοσωμιακή πρωτεΐνη S6 (RPS6), η κινάση του ευκαρυωτικού μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης 2 [eukaryotic translation elongation factor 2 kinase (eEF2K)], η cap-binding protein 80 (CBP80), η SKAR και ο ευκαρυωτικός παράγων έναρξης της μετάφρασης 4B [eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B)]. Η S6K1 φωσφορυλιώνει επίσης την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PDCD4 (programmed cell death 4), η οποία συνδέεται και αναστέλλει την ελικάση eIF4A. Η φωσφορυλίωση της PDCD4 από την S6K1 επάγει την ουβικουιτίνωση της PDCD4 και την αποδόμησή της από τη λιγκάση βTrCP. Ο παράγων eIF4B εκτός από την S6K1 ρυθμίζεται επίσης από τις πρωτεΐνες 14-3-3δ και τη ριβοσωμιακή S6 κινάση (RSK)

3.5.4 S6K και το σύμπλοκο της ελικάσης του RNA

Οι μισές σχεδόν βάσεις του mRNA είναι σε θέση να ζευγαρώσουν με τρόπο ώστε να σχηματίζονται βραχείες φουρκέτες mRNA. Οι μεγαλύτερες από τις φουρκέτες αυτές αποτελούν αρκετά σταθερές δομές (δομημένο mRNA) και για άγνωστο λόγο βρίσκονται συνήθως στην περιοχή 5' UTR (un-translated region) ορισμένων μορφών mRNA (Εικόνα 18). Στην ίδια περιοχή συνδέεται και το σύμπλεγμα έναρξης της μετάφρασης το οποίο εμποδίζεται να ξεκινήσει τη μετάφραση παρουσία αυτών των σταθερών δομών. Ο παράγων έναρξης eIF4A ενέχει ιδιότητες ελικάσης RNA και μπορεί να «ξεδιπλώσει» το δομημένο RNA στις περιοχές αυτές. Η δράση του eIF4A ως ελικάσης mRNA είναι γενικά ασθενής αλλά ενισχύεται από ένα συμπαραγόνο τον eIF4B. Ο eIF4B είναι φωσφοπρωτεΐνη η φωσφορυλίωση της οποίας διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες ή καρκινογόνα όπως οι εστέρες φορβόλης. Η ευοδωτική δράση του eIF4B στη μετάφραση των mRNAs με δομημένα 5' UTRs είναι ανάλογη του βαθμού φωσφορυλίωσής του. Η ενεργοποιημένη (από το mTORC1) S6K φωσφορυλιώνει τον eIF4B στη θέση Ser422 ως απάντηση στη χορήγηση θρεπτικών ουσιών ή ινσουλίνης (Εικόνα 17 και 18). Η φωσφορυλίωση αυτή αναστέλλεται από τη χορήγηση βορταμανίνης ή LY92900 ή ραπαμυκίνης ή τέλος σε κύτταρα με έλλειψη των κινασών S6K1/2. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι **απαραίτητη** για την υποβοήθηση της δράσης της ελικάσης eIF4A. Εκτός από την S6K η RSK (ριβωσωματική S6 κινάση) είναι επίσης σε θέση να φωσφορυλιώσει τον eIF4B στη θέση Ser422. Τα ευρήματα αυτά παραπέμπουν σε «πλεονάζοντες» ή «συγκλίνοντες» μηχανισμούς ρύθμισης όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της TSC2 η οποία εξαρτάται από διάφορα μονοπάτια (πχ Akt, ERK ή RSK) για τη ρύθμιση του mTORC1. Αντίστοιχη «σύγκλιση» μονοπατιών απαντάται και στον eIF4B για τον έλεγχο της δράσης του στη διαδικασία της μετάφρασης. Η παρατήρηση αυτή μας προσφέρει μια ακόμα εξήγηση για την 'αντίσταση' ή τη διαφυγή του μηχανισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης από την ανασταλτική δράση της ραπαμυκίνης, καθώς η ενεργοποίηση του μονοπατιού της RSK δεν αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη.



Εικόνα 18. Μηχανισμός πρωτεϊνοσύνθεσης σε δομημένο 5'UTR mRNA. Ο παράγων έναρξης *eIF4A* ενέχει ιδιότητες ελικάσης RNA και μπορεί να «ξεδιπλώσει» το δομημένο RNA. Η δράση του *eIF4A* ως ελικάσης mRNA είναι ασθενής αλλά ενισχύεται από ένα συμπαράγοντα τον *eIF4B*. Η ευοδωτική δράση του *eIF4B* στη μετάφραση των mRNAs με δομημένα 5'UTRs είναι ανάλογη του βαθμού φωσφορυλίωσής του. Η ενεργοποιημένη (από το *mTORC1*) *S6K* φωσφορυλιώνει τον *eIF4B* στη θέση Ser422 ως απάντηση στη χορήγηση θρεπτικών ουσιών ή ινσουλίνης

3.5.5 S6K, PDCD4 και eEF2K

Η *S6K1* φωσφορυλιώνει επίσης την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη *PDCD4* (programmed cell death 4), η οποία συνδέεται και αναστέλλει την ελικάση *eIF4A*. Η φωσφορυλίωση της *PDCD4* από την *S6K1* επάγει την ουβικουιτίνωση της *PDCD4* και ακολούθως την αποδόμησή της από τη λιγκάση β TrCP με τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωση του *eIF4A*. Η υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της *PDCD4* που δεν μπορεί να αποδομηθεί με το μηχανισμό που προαναφέρθηκε οδηγεί σε αναστολή της Cap-εξαρτώμενης μετάφρασης και σε μείωση της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη σημασία της φωσφορυλίωσης της *PDCD4* από την *S6K1* για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Παρά ταύτα η *PDCD4* εμπεριέχει πολλές θέσεις Ser που φωσφορυλιώνονται εις απάντηση σε ερεθίσματα προερχόμενα από αυξητικούς παράγοντες, γεγονός που υποδηλώνει για μια ακόμη φορά ότι η πρωτεϊνοσύνθεση είναι πολύπλευρη

διαδικασία, δύσκολο να ανασταλεί με την απενεργοποίηση ενός μόνο αυξητικού σηματοδοτικού μονοπατιού.

Μια άλλη δράση της S6K είναι η φωσφορυλίωση και αναστολή της eEF2K με αποτέλεσμα την υποφωσφορυλίωση του eEF2 στη θέση Thr56 και την ενεργοποίησή του. Μέσω του μηχανισμού αυτού οι αυξητικοί παράγοντες επιτυγχάνουν την επιμήκυνση της πρωτεΐνης κατά τη μετάφραση και η διαδικασία αυτή αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για mRNAs που μεταφράζονται χάρη στην ύπαρξη εσωτερικής περιοχής σύνδεσης στο ριβόσωμα (IRES) η επιμήκυνση των οποίων δεν επηρεάζεται από τη ραπαμυκίνη.

3.5.6 Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)

Η αναστολή του mTORC1 από τη ραπαμυκίνη προκαλεί ταχεία αποφωσφορυλίωση των κατωφερέστερων πρωτεϊνών όπως η S6K1, ακόμα και σε θέσεις που φυσιολογικά δεν φωσφορυλιώνονται άμεσα από το mTORC1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το mTORC1 ρυθμίζει ενδεχομένως και κάποιες φωσφατάσες που φυσιολογικά αποφωσφορυλιώνουν την S6K σε θέσεις μη εξαρτώμενες από το mTORC1. Πράγματι έχει βρεθεί ότι το mTORC1 προκαλεί φωσφορυλίωση και αναστολή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A) *in vitro*, γεγονός που αναδεικνύει ένα νέο μοντέλο δράσης όπου το mTORC1 επάγει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στόχων της (πχ S6K) και μέσω αναστολής φωσφατασών (πχ PP2A). Η PP2A βρέθηκε επίσης να συμμετέχει στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της Akt στις θέσεις Ser473 και Thr308 κατά τρόπο ανεξάρτητο από την PI3K¹²³. Από τα παραπάνω είναι σαφές πως ο μηχανισμός μεταφοράς του σήματος προς και από το mTORC1 στην κατωφέρεια δεν είναι ακόμα απολύτως γνωστός ή ξεκάθαρος και σίγουρα είναι πολύπλευρος.

Μια πρόσφατη μελέτη που αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα έδειξε ότι η 4EBP1 είναι σε θέση να ανακτήσει σε σημαντικό βαθμό την mTORC1-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της, μετά από παρατεταμένη θεραπεία με ραπαμυκίνη σε αντίθεση με την S6K⁶⁸. Αυτό εξηγεί εν μέρει το λόγο για τον οποίο η cap-εξαρτώμενη μετάφραση «διασώζεται» σε κάποια κύτταρα παρά τη θεραπεία με ραπαμυκίνη. Τα πρόσφατα αυτά δεδομένα εγείρουν σημαντικά ερωτηματικά για το δόκιμο της χρήσης της phospho-S6K, της phospho-RPS6 και της 4EBP1 ως δείκτες ενεργοποίησης του mTORC1 ή αναστολής του από την ραπαμυκίνη σε διάφορα πειραματικά μοντέλα.

3.6 Στόχοι της mTOR που σχετίζονται με τη μεταγραφή

Σε πλήρη συμφωνία με την πρωτεϊνοσυνθετική της δράση, η mTOR διεγείρει έντονα τη μεταγραφή όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιογένεση των ριβοσωμάτων, όπως μεταγραφή rRNA γονιδίων (πολυμεράση I), γονιδίων ριβοσωμιακών πρωτεϊνών (πολυμεράση II) και tRNA γονιδίων (πολυμεράση III). Επίσης η δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων της πολυμεράσης I, [όπως ο TIF-1A (παράγων έναρξης της μεταγραφής IA), ο UBF και ο UBF], αυξάνεται από την mTOR και αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη. Τέλος στη διαδικασία ενεργοποίησης της μεταγραφής ριβοσωμιακού DNA εμπλέκεται και η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αναστέλλεται από το mTORC1.

4. Φαρμακολογία της ραπαμυκίνης (rapamycin ή sirolimus) και καθιερωμένες κλινικές εφαρμογές

4.1 Γενικός μηχανισμός δράσης

Μετά την είσοδο στο κυτταρόπλασμα η ραπαμυκίνη συνδέεται και σχηματίζει σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη δέσμευσης του FK (FK binding protein, FKBP). Το σύμπλεγμα ραπαμυκίνης-FKBP είναι υπεύθυνο για την αναστολή της mTOR. Η αναστολή της mTOR διακόπτει τη μετάδοση του σήματος της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) με αποτέλεσμα την επίσχεση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1-S^{124, 125}. Η ραπαμυκίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση των T και B-λεμφοκυττάρων από κυτταροκίνες με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και πολλαπλασιασμού. Αντίθετα τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα τακρολίμη (tacrolimus) και κυκλοσπορίνη αναστέλλουν την ίδια την παραγωγή των κυτοκινών¹²⁶.

Η ραπαμυκίνη αναστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων¹²⁷ καθώς και των ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο των αγγείων όσο και των λεμφαγγείων. Τέλος αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε πολλές καρκινικές σειρές (προστάτης, μαστός, νεφρά) καθώς και την ανάπτυξη των αγγειομυολιπομάτων της οζώδους σκλήρυνσης¹²⁸.

4.2 Φαρμακοκινητική

Ο χρόνος εμφάνισης της μέγιστης συγκέντρωσης στο αίμα είναι 1-2 ώρες. Η βιοδιαθεσιμότητα του στοματικού διαλύματος είναι 14% ενώ το δισκίων είναι κατά

27% μεγαλύτερη. Η απορρόφηση της ραπαμυκίνης επηρεάζεται από την ταυτόχρονη λήψη λιπαρών τροφών. Για παράδειγμα η χορήγηση ραπαμυκίνης μαζί με πρωινό πλούσιο σε λιπαρά σε 22 υγιείς εθελοντές είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μέγιστης συγκέντρωσης στον ορό (C_{max}) κατά 34%, την αύξηση του χρόνου για την επίτευξη του C_{max} κατά 3,5 φορές και την αύξηση της συνολικής έκθεσης στη ραπαμυκίνη (area under the concentration-time curve) κατά 35% σε σχέση με τη νηστεία¹²⁵. Για να περιοριστεί η εξαρτώμενη από την τροφή διακύμανση της απορρόφησης, συνηθίζεται η χορήγηση του φαρμάκου να γίνεται 1-2 ώρες μετά το πρωινό.

Ο μέσος όγκος κατανομής της ραπαμυκίνης είναι 12 L/kg, με το 97% του φαρμάκου να είναι συνδεδεμένο σε αλβουμίνη. Η υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου απαντάται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (95%) και ακολουθεί το πλάσμα (3%) τα λεμφοκύτταρα (1%) και τα κοκκιοκύτταρα (1%). Η συνήθης αναλογία συγκέντρωσης μεταξύ ολικού αίματος και πλάσματος είναι 30/1, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις ανευρίσκονται στην καρδιά, έντερο, νεφρούς, ήπαρ, σπλήνα, μύες, πνεύμονες και όρχεις. Στους ιστούς αυτούς η συνήθης συγκέντρωση ραπαμυκίνης είναι 20 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με το αίμα¹²⁶.

4.3 Μεταβολισμός

Η ραπαμυκίνη μεταβολίζεται ευρέως στο ήπαρ από το κυτόχρωμα P450 3A4 και την P-γλυκοπρωτεΐνη¹²⁴. Ο βαθμός μεταβολισμού της ραπαμυκίνης στο έντερο είναι άγνωστος αλλά είναι γνωστό ότι υφίσταται αποβολή προς τον εντερικό αυλό από την P-γλυκοπρωτεΐνη. Το αποτέλεσμα είναι μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και σημαντική φαρμακοκινητική διακύμανση.

Οι μεταβολίτες συνεισφέρουν σε ποσοστό 10% στην ανοσοκατασταλτική της δράση και περιλαμβάνουν την υδρόξυ-ραπαμυκίνη, μεθυλ-ραπαμυκίνη και υδρόξυ-μεθυλ-ραπαμυκίνη. Ένα νεότερο παράγωγο της ραπαμυκίνης που ονομάζεται everolimus (RAD) είναι η 40-O-(2-υδρόξυλ-έθυλ-ραπαμυκίνη)

Η κάθαρση της ραπαμυκίνης ποικίλει από 127 έως 240 mL/hr/kg^{126, 129, 130}. Η κάθαρση της ραπαμυκίνης είναι αυξημένη κατά 45% στους μαύρους έναντι των άλλων φυλών. Η αποβολή της γίνεται κατά 91% στα κόπρανα και μόνο κατά 2% στα ούρα. Ο χρόνος ημιζωής είναι 57 έως 63 ώρες¹³¹⁻¹³³, γεγονός που επιτρέπει την άπαξ ημερήσια χορήγηση.

4.4 Μεταμόσχευση νεφρού σε ενήλικες: Η ραπαμυκίνη χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε κλινικές μελέτες στη μεταμόσχευση νεφρού μαζί με κυκλοσπορίνη και στεροειδή σε ημερήσια δόση εφόδου (induction) των 6mg ή 15mg (3 φορές μεγαλύτερες από η δόση συντήρησης)^{134, 135}. Στην κλινική πράξη η δόση μεταβάλλεται βάσει διαφόρων παραγόντων, όπως η ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέων ή επαγωγέων του κυτοχρώματος P450, η ύπαρξη ηπατικής ανεπάρκειας, η εμφάνιση τοξικότητας ή λοιμώξεων¹²⁴. Δεδομένα για τη χρήση της σε παιδιατρικούς και υπέργηρους ασθενείς είναι περιορισμένα. Η παρουσία νεφρικής ανεπάρκειας δεν απαιτεί τροποποίηση της δόσης. Αντιθέτως επί ηπατικής ανεπάρκειας η δόση συντήρησης μειώνεται στο 1/3 της κανονικής. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται στενή παρακολούθηση των επιπέδων στο αίμα. Η εγκατάσταση σταθερών επιπέδων στο αίμα συμβαίνει σε 5-7 μέρες μετά την έναρξη της θεραπείας ή μετά από κάθε τροποποίηση της δοσολογίας.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων κλινικών δοκιμών τα μέσα κατώτερα (trough) επίπεδα ραπαμυκίνης σε ολικό αίμα ήταν 9ng/mL και 17ng/mL σε 2 ομάδες με ημερήσια δόση συντήρησης στα 2 και 5 mg αντίστοιχα. Η συσχέτιση μεταξύ ελαχίστων (trough) επιπέδων στο ολικό αίμα και της επιφάνειας κάτωθεν της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου (AUC) είναι εξαιρετική¹²⁹ αλλά τα βέλτιστα επίπεδα για κάθε ασθενή δεν είναι συγκεκριμένα και εξαρτώνται κυρίως από το βάθος της ανοσοκαταστολής που θέλουμε να επιτύχουμε, από το συνδυασμό ανοσοκατασταλτικών που χορηγούμε και από τις τυχόν παρενέργειες.

Τα επίπεδα στο αίμα μετρώνται με χρωματογραφικές ή ραδιοανοσολογικές μεθόδους σε ολικό αίμα που συλλέγεται σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (EDTA) και προστασία από το ηλιακό φως, μία ώρα πριν από τη χορήγηση της επόμενης δόσης. Τα επίπεδα παραμένουν σταθερά για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 εβδομάδα στους 2-8 βαθμούς κελσίου και έως 3 μήνες στους -20 βαθμούς κελσίου. Όταν η ραπαμυκίνη συγχορηγείται με κυκλοσπορίνη και πρεδνιζολόνη η διατήρηση κατώτερων επιπέδων στο αίμα από 5 έως 15 ng/mL σχετίζεται με υψηλά ποσοστά πρόληψης της οξείας απόρριψης και με λιγότερες παρενέργειες. Σε επίπεδα πάνω από 15 ng/mL αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό εμφάνισης παρενεργειών όπως υπερτριγλυκεριδαιμία, θρομβοπενία και λευκοπενία ενώ σε επίπεδα κάτω από 5 ng/mL αυξάνεται το ποσοστό οξείας απόρριψης¹³⁶. Όταν η ραπαμυκίνη συνδυάζεται

με αζαθειοπρίνη και πρεδνιζολόνη θα πρέπει να στοχεύουμε σε ποιο υψηλά κατώτερα επίπεδα στο αίμα.

Σε μια από τις πρώτες κλινικές μελέτες σε λήπτες νεφρικού μοσχεύματος η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε σε δόσεις συντήρησης τέτοιες ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα στα 30 ng/mL για τους 2 πρώτους μήνες μετά τη μεταμόσχευση και στα 15 ng/mL για τους επόμενους μήνες. Οξεία απόρριψη παρατηρήθηκε στο 28% των ασθενών τους 2 πρώτους μήνες και στο 41% μετά τους 2 μήνες^{137, 138}. Ως εναλλακτικός τρόπος καθορισμού της βέλτιστης δόσης της ραπαμυκίνης έχει προταθεί η μέτρηση της φωσφορυλίωσης της S6 κινάσης σε μονοκύτταρα του αίματος¹³⁹ αλλά η τακτική αυτή δεν έχει υιοθετηθεί στην πράξη από τα μεταμοσχευτικά κέντρα.

4.5 Ανεπιθύμητες ενέργειες:

Αιματολογικές επιδράσεις: Αναιμία έχει αναφερθεί σε ποσοστό 27-57% ανάλογα με το χρόνο μετά τη μεταμόσχευση και τη συγχορήγηση ή όχι μυκοφαινολικού οξέως (MMF, Cell Cept) που αυξάνει το ποσοστό εμφάνισης αναιμίας^{140, 141}.

Θρομβοπενία εμφανίζεται στο 13-30% των ασθενών, παρατηρείται συνήθως την 9η με 10η μέρα μετά τη χορήγηση, είναι δοσοεξαρτώμενη^{142, 143} και υποχωρεί στις 2 εβδομάδες μετά τη διακοπή του φαρμάκου.

Λευκοπενία παρατηρείται 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της ραπαμυκίνης, δεν είναι δοσοεξαρτώμενη και αποκαθίσταται μετά τη διακοπή¹⁴³.

Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο – θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (HUS/TM) έχει αναφερθεί σε συγχορήγηση ραπαμυκίνης με κυκλοσπορίνη σε ποσοστό έως και 20%, όταν τα επίπεδα και των δύο φαρμάκων υπερβούν τα συνήθη και είναι αναστρέψιμο μετά τη διακοπή^{144, 145}.

Αυξημένα ποσοστά θρόμβωσης ηπατικής αρτηρίας, απώλειας μοσχεύματος και θανάτου έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και σε δύο τυχαιοποιημένες πολυκεντρικές μελέτες¹²⁵.

Μεταβολικές επιδράσεις: Υπερτριγλυκεριδαιμία παρατηρείται σε ποσοστό 38-57% και υπερχοληστερολαιμία σε ποσοστό 38-46%. Η δυσλιπιδαιμία της ραπαμυκίνης είναι δοσοεξαρτώμενη και οφείλεται στην αναστολή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Η παρατεταμένη χορήγηση ραπαμυκίνης συνοδεύεται επίσης συχνά από την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη μετά τη μεταμόσχευση

Γαστρεντερικό σύστημα: συχνά παρατηρείται δυσκοιλιότητα (28-36%), διάρροια (25-42%), δυσπεψία (17-25%), ναυτία (25-36%) και έμετοι (19-25%)¹²⁵. Σπανιότερα εμφανίζονται έλκη στο στόμα (μη σχετιζόμενα με ερπητική λοίμωξη) και στο βλεννογόνο του εντέρου^{149, 150}.

Αναπνευστικό σύστημα: Προϊούσα διάμεση πνευμονίτιδα με κύρια συμπτώματα τη δύσπνοια, ξηρό βήχα, πυρετό και καταβολή έχει αναφερθεί σε ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία που τίθενται σε ραπαμυκίνη αρκετό καιρό μετά τη μεταμόσχευση¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Σε μία αναφορά με 24 ασθενείς¹⁵¹ τα ακτινογραφικά ευρήματα και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν συμβατά με αποφρακτική βρογχιολίτιδα προκαλούσα πνευμονία (BOOP) και λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Πλήρης ανάρρωση παρατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς σε διάστημα έως και 6 μήνες μετά τη διακοπή της ραπαμυκίνης¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

Νεφρική λειτουργία: Σε πειραματόζωα η ραπαμυκίνη δεν έχει δείξει νεφροτοξικότητα όταν χορηγείται από μόνη της. Σε ανθρώπους τα δεδομένα δεν είναι τόσο σαφή όσον αφορά στη μεταμόσχευση καθώς συγχωρηγείται με άλλα φάρμακα που είναι νεφροτοξικά και υπάρχει συχνά παθολογία που επηρεάζει τη λειτουργία του μοσχεύματος (συστηματικά νοσήματα, μετεγχειρητικές επιπλοκές, επεισόδια απόρριψης). Η συγχωρήγηση ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης έχει προκαλέσει συνεργικά νεφροτοξικότητα τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους λόγω αύξησης των επιπέδων της κυκλοσπορίνης στο αίμα αλλά και σε ιστικό επίπεδο (νεφρά)¹⁵⁵ και λόγω αύξησης των επιπέδων της κυτταροκίνης TGF-β από το συνδυασμό των 2 φαρμάκων^{156, 157}.

Σε κλινικές μελέτες φάσης III, η συγχωρήγηση ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης συνοδεύτηκε από υψηλότερες τιμές κρεατινίνης και χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με συνδυασμό κυκλοσπορίνης-αζαθειοπρίνης ή κυκλοσπορίνης-εικονικού φαρμάκου. Επιπρόσθετα ο συνδυασμός ραπαμυκίνης-τακρολίμης σε σύγκριση με το συνδυασμό τακρολίμης-μυκοφαινολικού σχετίζεται με αυξημένη τιμή κρεατινίνης σε μεγάλο αριθμό προοπτικών μελετών¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Για το λόγο αυτό συνιστάται στενή παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς που λαμβάνουν συνδυασμό ραπαμυκίνης με αναστολέα καλσινευρίνης.

Υπάρχουν επίσης μελέτες που δείχνουν καθυστέρηση στην έναρξη λειτουργίας του νεφρικού μοσχεύματος άμεσα μετά τη μεταμόσχευση (delayed graft function, DGF)¹⁶²⁻¹⁶⁴. Σε μια μελέτη με 144 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πρώτη

μεταμόσχευση νεφρού από ζώντα ή πτωματικό δότη, το ποσοστό εμφάνισης DGF στους ασθενείς που έλαβαν ραπαμυκίνη ήταν σημαντικά υψηλότερο έναντι αυτών που έλαβαν άλλες αντι-απορριπτικές θεραπείες που δεν περιελάμβαναν ραπαμυκίνη (25 έναντι 9%)¹⁶⁴. Οι μελέτες αυτές όμως ήταν αναδρομικές και μη τυχαιοποιημένες οπότε τα αποτελέσματά τους είναι αμφιλεγόμενα καθώς η ραπαμυκίνη μπορεί να χορηγήθηκε σε ασθενείς αυξημένου κινδύνου για DGF βάση της υποτιθέμενης έλλειψης νεφροτοξικότητας έναντι των αναστολέων καλσινευρίνης (CNI).

Πρωτεϊνουρία: Η ραπαμυκίνη έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας και σπειραματοπάθειας (εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης, ΕΤΣΣ) σε μεγάλο αριθμό μελετών¹⁶⁵⁻¹⁷⁸. Σε μια αναδρομική μελέτη με 68 ασθενείς με νεφρική μεταμόσχευση μελετήθηκε η εξέλιξη της πρωτεϊνουρίας κατά τη μετάβαση από αναστολέα καλσινευρίνης σε ραπαμυκίνη¹⁶⁹. Από μια μέση τιμή πρωτεϊνουρίας 0,36 g/ημέρα πριν τη μετάβαση σε ραπαμυκίνη, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της πρωτεϊνουρίας με μέσες τιμές 1,35, 1,67, 1,27, and 1,14 g/ημέρα στους 3, 6, 12, και 24 μήνες μετά τη μετάβαση σε ραπαμυκίνη, αντίστοιχα. Η πρωτεϊνουρία ήταν πλήρως αναστρέψιμη (από 1,95 στα 0,9 g/ημέρα) σε 19 ασθενείς στους οποίους τελικά διακόπηκε η ραπαμυκίνη.

Σε άλλη μελέτη διακοπής των αναστολέων καλσινευρίνης με σκοπό την πρόληψη της εξ'αυτών προκαλούμενης νεφροτοξικότητας από το νοσοκομείο Necker της Γαλλίας, η μετάβαση σε ραπαμυκίνη οδήγησε στην ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας στο 64% των ασθενών με ιστολογική τεκμηρίωση ΕΤΣΣ στο 30% αυτών¹⁷¹. Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε 48% επίπτωση πρωτεϊνουρίας 5 μήνες μετά από διακοπή του CNI και την έναρξη ραπαμυκίνης σε 31 ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος ή με τοξικότητα από CNI¹⁷⁹. Εν τούτοις οι περισσότεροι ασθενείς αντιμετωπίστηκαν συντηρητικά με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου ή προσαρμογή της δόσης της ραπαμυκίνης ή απλή αναμονή, με αποτέλεσμα τη σταδιακή σταθεροποίηση ή και βελτίωση της πρωτεϊνουρίας κατά μέσο όρο 15 μήνες μετά την έναρξη του φαρμάκου. Τελικά μόνο 4 ασθενείς χρειάστηκε να επιστρέψουν στην προηγούμενη θεραπεία με CNI ενώ 4 άλλοι ασθενείς χωρίς παθολογική πρωτεϊνουρία παρουσίασαν μείωση της 24ωρης αποβολής λευκώματος μετά τη μετατροπή σε ραπαμυκίνη¹⁷⁹.

Σε μια περίπτωση μεταμοσχευμένου ασθενούς με σάρκωμα Kaposi η μετατροπή σε ραπαμυκίνη οδήγησε σε συρρικνωτική μορφή ΕΤΣΣ (collapsing form)¹⁶⁷.

Πιθανοί μηχανισμοί για την προκαλούμενη από τη ραπαμυκίνη πρωτεϊνουρία θεωρούνται η μείωση της σωληναριακής επαναρρόφησης πρωτεϊνών¹⁸⁰, η δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων^{175, 181}, η άρση της αιμοδυναμικής επίδρασης των CNIs και η υπερπαραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) που αυξάνει τη διαπερατότητα του αγγειακού τοιχώματος και οδηγεί σε συρρικνωτική ΕΤΣΣ¹⁶⁷. Ο τελευταίος μηχανισμός δεν έχει επιβεβαιωθεί από καμία άλλη μελέτη στη βιβλιογραφία καθώς, όπως αναλύεται σε άλλα κεφάλαια, η ραπαμυκίνη είναι ισχυρός αναστολέας του VEGF.

Άλλες διαταραχές: Μια μοναδική μορφή νεφροπάθειας από κυλίνδρους (cast nephropathy) έχει περιγραφεί σε λίγους ασθενείς με DGF και εξεσημασμένη σωληναριακή βλάβη μετά από χορήγηση συνδυασμού τακρολίμης-ραπαμυκίνης¹⁶⁴. Οι κύλινδροι είναι ακριβώς οι ίδιοι με αυτούς που παρατηρούνται στη νεφροπάθεια του μυελώματος. Επίσης μια παρόμοια μορφή οξείας νεφρικής βλάβης που έχει παρατηρηθεί μετά τη χορήγηση ραπαμυκίνης αφορά στην εμφάνιση μυοσφαιρινουρίας και μυοσφαιρινικών κυλίνδρων στα ούρα¹⁸².

Κακοήθεια: Η λεμφοϋπερπλαστική νόσος μετά τη μεταμόσχευση (Posttransplant lymphoproliferative disease - PTLD) δεν παρατηρείται τόσο συχνά στους ασθενείς που λαμβάνουν το συνδυασμό ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης. Υπάρχουν αντιθέτως στοιχεία που δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη έχει αντι-νεοπλασματική δράση

Τερατογένεση- επίδραση στην εγκυμοσύνη και στη γονιμότητα. Η ραπαμυκίνη αντενδείκνυται στην εγκυμοσύνη και η χρήση της θα πρέπει να διακόπτεται τουλάχιστον 12 εβδομάδες πριν από την προσπάθεια για σύλληψη. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη μειώνει τη σπερματογένεση στο 1/10 του φυσιολογικού¹⁸³.

Άλλα: σε 2 περιπτώσεις η ραπαμυκίνη συσχετίστηκε με την ανάπτυξη λευκοκυτταροκλαστικής αγγειίτιδας^{184, 185}. Σχετίζεται επίσης συχνά με καθυστερημένη επούλωση του χειρουργικού τραύματος. Σε 5 ασθενείς αναφέρθηκε οίδημα γλώσσας σε συγχορήγηση μεγάλων δόσεων ραπαμυκίνης με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης¹⁸⁶.

Στην πλειοψηφία των ασθενών παρατηρούνται ανεπιθύμητες ενέργειες από το δέρμα^{187, 188} όπως ακμή (46%), θυλακίτιδα στο τριχωτό της κεφαλής (26%), πυώδης ιδραδενίτιδα (12%), οίδημα ή λεμφοίδημα (55%), αφθώδης στοματίτιδα (66%) και

επίσταξη (60%). Τέλος έχει αναφερθεί ανάπτυξη περικαρδιακής συλλογής σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση καρδιάς αλλά και νεφρών¹⁸⁹.

4.6 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις

Το sirolimus μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 3A4, οπότε η συγχορήγησή του με επαγωγείς του κυτοχρώματος (όπως μερικά αντιεπιληπτικά, ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, χόρτο του Αγίου Ιωάννη) ή αναστολείς του κυτοχρώματος (όπως αζόλες, αναστολείς ασβεστίου, μακρολίδες και γκρέιπφρουτ) μπορεί να προκαλέσει σοβαρές μεταβολές των επιπέδων στο αίμα. Ταυτόχρονη χορήγηση της ραπαμυκίνης με κυκλοσπορίνη αυξάνει δραστικά τα peak, trough και μέσα επίπεδα καθώς και την AUC της ραπαμυκίνης σε σύγκριση με χορήγηση σε χρονική απόσταση 4 ωρών ή τη χορήγηση ραπαμυκίνης χωρίς κυκλοσπορίνη¹⁹⁰.

Για τους παραπάνω λόγους και επειδή η συγχορήγηση των δυο φαρμάκων προκαλεί αθροιστικά ορισμένες παρενέργειες (π.χ υπερλιπιδαιμία) θα πρέπει η χρονική απόσταση λήψης των δύο φαρμάκων να είναι σταθερή ώστε να είναι δυνατή η ρύθμιση των επιπέδων. Η ραπαμυκίνη και η τακρολίμη μοιράζονται την ίδια δεσμευτική πρωτεΐνη στο εσωτερικό των κυττάρων (FKBP-12) γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανταγωνιστική δράση των 2 φαρμάκων. Ωστόσο σε in vivo μελέτες με φαρμακολογικές δόσεις ραπαμυκίνης δεν υπήρξαν ενδείξεις συναγωνιστικής αναστολής με την τακρολίμη¹⁹¹. Η χρονική απόσταση της χορήγησης τακρολίμης και ραπαμυκίνης δεν επιδρά στα επίπεδα των 2 φαρμάκων¹⁹². Τέλος η συγχορήγηση ραπαμυκίνης και μυκοφαινολικού οξέως (MMF) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα MMF σε σύγκριση με το συνδυασμό κυκλοσπορίνης και MMF. Επομένως θα πρέπει να μειώνουμε τη συνήθη δόση του MMF όταν αυτό χορηγείται με ραπαμυκίνη.

4.6 Η χρήση της ραπαμυκίνης στη νεφρική μεταμόσχευση

Η ραπαμυκίνη έχει χρησιμοποιηθεί κατά διάφορους τρόπους στη νεφρική μεταμόσχευση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες δόσεις και συνδυασμούς ως θεραπεία συντήρησης με στόχο τη μείωση-αντικατάσταση των αναστολέων καλσινευρίνης, ή των αντιμεταβολιτών ή της κορτιζόλης. Ωστόσο η χορήγηση ραπαμυκίνης ως θεραπείας συντήρησης από την αρχή της μεταμόσχευσης οδήγησε στην εμφάνιση ορισμένων προβλημάτων όπως καθυστερημένη έναρξη της

λειτουργίας του μοσχεύματος, αργή επούλωση του χειρουργικού τραύματος, μεγάλο ποσοστό λεμφοκηλών και δυσμενή πρόωμη έκβαση του μοσχεύματος. Για το λόγο αυτό σε πολλά κέντρα αποφεύγεται πλέον η χορήγησή του τους πρώτους μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Έτσι μπορεί να χορηγηθεί μετά τους πρώτους 1-3 μήνες από τη μεταμόσχευση σε περιπτώσεις που θέλουμε να διακόψουμε τα στεροειδή (π.χ διαβήτης, βαρεία οστεοπόρωση κλπ.) ή τους αναστολείς καλσινευρίνης (οξεία ή χρόνια τοξικότητα). Επίσης έχει δοκιμαστεί σε περιπτώσεις ανθεκτικής απόρριψης μοσχεύματος με σχετικά καλά αποτελέσματα¹⁹³. Τέλος έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση της ραπαμυκίνης ως μονοθεραπείας στη νεφρική μεταμόσχευση καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να επάγει την ανοσολογική ανοχή και την αύξηση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων¹⁹⁴.

5. Θεραπευτικές εφαρμογές της ραπαμυκίνης σε νεφρικές παθήσεις πέραν της μεταμόσχευσης νεφρού

Η mTOR εκτός από τη δράση της στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού ελέγχει και άλλες κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με νεφρολογικές παθήσεις όπως η αγγειογένεση και η φλεγμονή. Η πρωτεΐνη rapTOR αλληλεπιδρά άμεσα με και ρυθμίζει τη δραστηριότητα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α) ο οποίος ελέγχει τη μεταγραφή του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Η ραπαμυκίνη έχει επίσης αντιφλεγμονώδη δράση που είναι ανεξάρτητη από τις επιδράσεις της στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος¹⁹⁸. Για παράδειγμα θεραπευτικές συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης (10 ng/ml) προκάλεσαν μείωση της παραγωγής TNFα κατά 37% σε εγγύς σωληναριακά κύτταρα μετά από διέγερσή τους με IL-1¹⁹⁹.

5.1 Κύτταρα που παρουσιάζουν ευαισθησία στις επιδράσεις της ραπαμυκίνης

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα παρεγχυματικά κύτταρα των συμπαγών οργάνων και κύτταρα του αίματος παρουσιάζουν όλα σημαντική ευαισθησία στην ανασταλτική δράση της ραπαμυκίνης επί του mTORC1. Από την άλλη μεριά τα μαστοκύτταρα του μυελού των οστών εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δράση της

καθώς διατηρούν σημαντική υπολειμματική δραστηριότητα της S6K (69%) ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης (100 nM).

Στα νεφρά, τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (ΕΕΣ), τα μεσαγγειακά και τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα²⁰⁰ είναι περισσότερο ευαίσθητα στις αντιμιτωτικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης σε σχέση με τα ποδοκύτταρα²⁰¹. Είναι αρκετά ενδιαφέρον όμως ότι τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα αναπτύσσουν μια επίκτητη αντοχή στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της ραπαμυκίνης όταν εκτεθούν στο φάρμακο για περισσότερο από 72 ώρες²⁰².

Οι μηχανισμοί της επιλεκτικής ευαισθησίας των κυττάρων και της εμφάνισης αντοχής δεν είναι ξεκάθαροι αλλά θεωρείται ότι περιλαμβάνουν: (i) την ικανότητα των συγκεκριμένων κυττάρων να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα ένα σημαντικό ποσοστό των κυττάρων του ΕΕΣ (40%) βρίσκονται διαρκώς στη φάση G1, έτοιμα να εισέλθουν σε κυτταρική διαίρεση^{203, 204} ενώ αντιθέτως τα ποδοκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα²⁰⁵ (ii) Τη σχετική επάρκεια της δεσμευτικής πρωτεΐνης FKBP-12 (και/ή του rapTOR), καθώς απαλοιφή αυτών σε μύκητες οδηγεί στη δημιουργία κυττάρων ανθεκτικών στη ραπαμυκίνη^{206, 207} και τέλος (iii) αντιροπιστική αύξηση της ενεργότητας της Akt μετά από έκθεση στη ραπαμυκίνη λόγω κατάργησης της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης από την p70S6k στο IRS/PI3K¹⁹⁵.

Οι παράγοντες που καθορίζουν το εάν η αναστολή του mTORC1 θα οδηγήσει ή όχι σε κυτταρική καταστροφή (απόπτωση ή/και νέκρωση) επίσης δεν είναι ξεκάθαροι. Για την πρόκληση κυτταροτοξικότητας φαίνεται πως δεν αρκεί η αναστολή μόνο του mTORC1 από τη ραπαμυκίνη²⁰⁸ αλλά απαιτούνται και επιπρόσθετοι μηχανισμοί όπως: (i) Η σχετική επάρκεια ή ανεπάρκεια παραγόντων κυτταρικής επιβίωσης (αυξητικών παραγόντων) στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων²⁰⁹, (ii) αλληλεπιδράσεις με άλλα συγχορηγούμενα φάρμακα όπως π.χ με κυκλοσπορίνη²¹⁰, (iii) Η ταυτόχρονη παρουσία παραγόντων που επάγουν το κυτταρικό stress (π.χ προκαλούν καταστροφή στο DNA), δεδομένου ότι το mTORC1 επάγει την κυτταρική επιβίωση και επούλωση μετά από καταστροφικά για το DNA συμβάματα²¹¹, και τέλος (iv) σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η δόση της ραπαμυκίνης¹⁷⁵.

Τα κατώτερα (trough) επίπεδα ραπαμυκίνης που απαιτούνται στη θεραπεία νεφρικών παθήσεων πέραν της μεταμόσχευσης δεν έχουν καθοριστεί με ακρίβεια αλλά φαίνεται από μελέτες σε ζώα να είναι χαμηλότερα, σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιούμε στη

μεταμόσχευση²¹². Επίσης το ποσοστό εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών φαίνεται να είναι μικρότερο σε μη μεταμοσχευμένους ασθενείς²¹³.

5.2 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε ενδογενή νεφρικά κύτταρα

Ανοσοκύτταρα

Η ανοσοκατασταλτική δράση της ραπαμυκίνης αποδίδεται στην αναστολή του mTORC1 σε T και B λεμφοκύτταρα, που οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης τους^{214, 215}. Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μπορεί να περιγραφεί με το μοντέλο των 3 σημμάτων²¹⁶. Το 1ο σήμα (T αντιγονικός υποδοχέας/αντιγόνο) και το 2ο σήμα (CD28/B7) ενεργοποιούν τα μονοπάτια ασβεστίου/καλσινευρίνης, RAS/MAP κινάσης και τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF-κB). Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην παραγωγή IL-2, και άλλων αυξητικών παραγόντων για τα T-λφ, οι οποίοι μέσω αυτοκρινών και παρακρινών επιδράσεων θέτουν το T κύτταρο σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (3ο σήμα). Η κυκλοσπορίνη και η τακρολίμη αναστέλλουν το 1ο και 2ο σήμα (πριν την παραγωγή IL-2) ενώ η ραπαμυκίνη το 3ο σήμα (μετά την παραγωγή IL-2). Η ραπαμυκίνη αναστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, μειώνει την παραγωγή αντισωμάτων (IgA, IgM, IgG) εις απάντηση σε παθογόνα ή την παραγωγή ειδικών κυτταροτοξικών αντισωμάτων έναντι του αλλομοσχεύματος²¹⁷. Η ραπαμυκίνη περιορίζει τη δραστηριότητα των δενδριτικών κυττάρων²¹⁸ και την πρόσληψη των αντιγόνων²¹⁹, επιταχύνει την απόπτωση των CD4+CD8+ T κυττάρων στο θύμο με αποτέλεσμα την αύξηση των άνοσο-ρυθμιστικών CD4+CD25+ T-λφ στην περιφέρεια^{220, 221}. Οι μεταβολές αυτές προάγουν την ανοσολογική ανοχή και προλαμβάνουν την εμφάνιση αυτοανοσίας.

Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (ΣΕΚ)

Η ραπαμυκίνη έχει αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε ΣΕΚ διεγερόμενα από μεγάλη ποικιλία μιτογόνων. Για παράδειγμα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ΣΕΚ in vitro μετά την εφαρμογή νεφρωσικού επιπέδου συγκεντρώσεων αλβουμίνης²²². Η αναστολή αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη. Δεν παρατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις

ραπαμυκίνης (0.1 ng/ml) και εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1-100 ng/ml)²²³. Επίσης είναι χρόνο-εξαρτώμενη καθώς τα ΣΕΚ αποκτούν αντοχή στη ραπαμυκίνη μετά από παρατεταμένη εφαρμογή της²⁰². Η ραπαμυκίνη αναστέλλει επίσης την τροφική δράση της αγγειοτασίνης II σε κυτταροκαλλιέργειες χοίρειων ΣΕΚ (LLC-PK1)²²⁴. Σε ανθρώπινα ΣΕΚ μειώνει τη μεταγραφή και τη σταθερότητα της κυκλίνης D3, ενώ άλλες κυκλίνες της G1 φάσης (cyclin D1, D2 or E) και αναστολείς Cdk (p21, p27 or p16) δεν επηρεάζονται²²⁵. Η ραπαμυκίνη διεγείρει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών μέσω ενός νέου πρωτεοσωμικού μηχανισμού σε ΣΕΚ αρουραίου (NRK-52E) μετά από εφαρμογή επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF)²²⁶.

Σε ανθρώπινα ΣΕΚ (HK-2) και σε δόση 1 έως 10 ng/ml προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ανεξάρτητα από την επίδρασή της στην παραγωγή VEGF²⁰¹. Επί απουσίας αυξητικών παραγόντων ασκεί προ-αποπτωτική δράση. Έκθεση ΣΕΚ σε ραπαμυκίνη για 10 μέρες και σε συγκεντρώσεις των 10 ng/ml προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας έως και 70% λόγω κυρίως αύξησης της απόπτωσης και μείωσης της δραστηριότητας της p70S6K1. Η παρουσία EGF μείωσε το ποσοστό απόπτωσης κατά 50%²²³.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη μπορεί να έχει από αντι-υπερπλαστική έως και προ-αποπτωτική δράση ανάλογα με την επαρκή παρουσία ή όχι αυξητικών παραγόντων.

Η αποδιαφοροποίηση των ΣΕΚ (απώλεια της E-cadherin και έκφραση δεικτών που χαρακτηρίζουν μυοινοβλάστες) η νεφρική παραγωγή TGFβ1 και ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών αποτελούν φαινόμενα που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη σωληναριοδιάμεσης ίνωσης. Η τελευταία, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα απώλειας της νεφρικής λειτουργίας σε όλες της χρόνιες παθήσεις του νεφρού, ανεξαρτήτως από την πρωτοπαθή αιτία²²⁷. Υπάρχουν In vitro δεδομένα που δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη συντηρεί τη διαφοροποίηση των ΣΕΚ. Ο προ-ινωτικός αυξητικός παράγοντας TGFβ1, αποτελεί ισχυρό επαγωγέα τόσο της αποδιαφοροποίησης των ΣΕΚ in vitro²²⁸, όσο και του μονοπατιού του mTORC1²²⁹. Η χορήγηση ραπαμυκίνης σε δόση 5 ng/ml αναστέλλει την προκαλούμενη από τον TGFβ1 αύξηση της αSMA και την απώλεια της E-cadherin σε ΣΕΚ ανθρώπου και αρουραίου^{230, 231}. Αναστέλλει επίσης την απώλεια της πολικότητας και συνδεσμικής ακεραιότητας των ΣΕΚ των άπω σωληναρίων²³². Υπάρχουν όμως και in vitro μελέτες που δείχνουν αύξηση της

μεταγραφής του TGFβ1 σε ΣΕΚ αρουραίων μετά την εφαρμογή ραπαμυκίνης σε συγκεντρώσεις 1-10ng/ml²³³. Παρομοίως αν και σε ανθρώπινους ινοβλάστες το sirolimus μειώνει άμεσα την παραγωγή κολλαγόνου²³⁴, το everolimus προάγει τη διαφοροποίηση τους σε μυο-ινοβλάστες (έκφραση αSMA)²³⁵. Επομένως οι αναστολείς της mTOR έχουν εξειδικευμένη δράση σε διάφορα κύτταρα και η συμπεριφορά τους αναφορικά με την αναστολή της ίνωσης δεν είναι προβλέψιμη.

Τα ΣΕΚ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση των πρωτεϊνών του πλάσματος που διαφεύγουν στο πρώιμο διήθημα²³⁶. Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που προτάθηκαν για την πρωτεϊνουρική δράση της ραπαμυκίνης ήταν η αναστολή της σωληναριακής επαναρρόφησης αλβουμίνης μέσω υποδοχέων της αυλικής επιφάνειας. Πρόσφατες μελέτες όμως δείχνουν ότι η θεωρία αυτή δεν είναι σωστή και αποδίδουν την πρωτεϊνουρία σε αμιγώς σπειραματικές επιδράσεις²³⁷.

Μεσαγγειακά κύτταρα

Η ραπαμυκίνη μειώνει in vitro τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων από μιτογόνα τόσο σε θεραπευτικές (1 έως 10 ng/ml) όσο και σε υποθεραπευτικές (0.1 ng/ml) δόσεις^{238, 239 240}. Επίσης μειώνει την μεσαγγειακή υπερτροφία που προκαλείται από την υπεργλυκαιμία²⁴¹ καταστέλλει την επαγόμενη από κυτταροκίνες μεσαγγειακή παραγωγή του VEGF²⁴² και την πρωτεϊνοσύνθεση του κολλαγόνου τύπου IV στα μεσαγγειακά κύτταρα (όχι όμως και του mRNA) με μηχανισμό ανεξάρτητο από την αναστολή της p70S6K1²³⁹.

Η ραπαμυκίνη μειώνει την ενδοκυττάρια άθροιση λιπιδίων στα μεσαγγειακά κύτταρα λόγω μείωσης της γονιδιακής έκφρασης των LDL και VLDL υποδοχέων (μείωση πρόσληψης λιπιδίων). Επίσης αυξάνει την αποβολή λιπιδίων από τα μεσαγγειακά κύτταρα μέσω αύξησης της γονιδιακής έκφρασης των PPARα, PPARγ, του ηπατικού X-υποδοχέα-α (liver X-receptor-α) και της ATP binding cassette-A1²⁴³. Τέλος οι αναστολείς του TORC1 μειώνουν την ικανότητα των μεσαγγειακών κυττάρων για μετανάστευση²⁴⁴.

Ποδοκύτταρα

De novo πρωτεϊνουρία και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (ΕΤΣΣ) εμφανίζεται στο 5% περίπου των ασθενών που λαμβάνουν ραπαμυκίνη²⁴⁵. Ως εκ τούτου η έρευνα κατευθύνεται στην επίδραση της ραπαμυκίνης στην αποκόλληση και

απόπτωση των ποδοκυττάρων (διαδικασίες που συντελούν στην πρόκληση ΕΤΣΣ). Η απόπτωση των ποδοκυττάρων προκύπτει ίσως από την αυξημένη παρουσία προαποπτωτικών παραγόντων όπως ο TGF1-β1 και η υποξία^{246, 247}, από την απώλεια παραγόντων που προάγουν την επιβίωση (όπως ο VEGF που αυξάνει τη φωσφορυλίωση της νεφρίνης και μειώνει τη φωσφορυλίωση της Akt στα ποδοκύτταρα εφόσον αυτά εκφράζουν φυσιολογικά νεφρίνη)²⁴⁸ ή την καταστολή ιδιοσυστασιακών σηματοδοτικών μονοπατιών που επίσης συμβάλλουν στην επιβίωση των ποδοκυττάρων²⁴⁹. Είναι αρκετά ενδιαφέρον όμως ότι σε ποδοκύτταρα με ανεπάρκεια νεφρίνης η χορήγηση VEGF αντί να μειώνει, αυξάνει τη φωσφορυλίωση της Akt²⁴⁸. Η έκθεση των ποδοκυττάρων in vitro σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης (10 ng/ml) δεν επηρεάζει την επιβίωσή τους όπως αποδεικνύεται με τη μέθοδο της γαλακτικής δεϋδρογενάσης ή με χρώση κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue)^{201 181 250}. Παρόλα αυτά, στις συγκεντρώσεις αυτές η ραπαμυκίνη μειώνει την παραγωγή VEGF στα ποδοκύτταρα καθώς και την έκφραση της S6K και τη φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση 2448 και 2481. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι σε δόσεις που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη η ραπαμυκίνη δεν μειώνει την επιβίωση των ποδοκυττάρων αλλά τροποποιεί τη λειτουργία της Akt, του mTORC1 και την παραγωγή του VEGF.

Παρά τη απουσία κυτταροτοξικότητας, μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες έχουν δείξει ότι η ραπαμυκίνη θα μπορούσε να επιδρά σε 3 φυσιολογικές λειτουργίες των ποδοκυττάρων.

Πρώτον η ραπαμυκίνη μειώνει την παραγωγή του VEGF, ο οποίος αποτελεί ένα σημαντικό πεπτίδιο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του πειραματικού ηθμού²⁵¹. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκλεκτική απαλοιφή του VEGF-A σε ποδοκύτταρα ποντικών οδηγεί σε πρωτεϊνουρία και πειραματική ενδοθηλίωση ενώ η υπερέκφραση της ισομορφής VEGF164 οδηγεί σε συρρικνωτική ΕΤΣΣ²⁵². Κατά παρόμοιο τρόπο η χρήση ανταγωνιστών του VEGF στους ανθρώπους συνοδεύεται σε σημαντικό ποσοστό από την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας και πειραματικών βλαβών. Παρόμοιες βλάβες αναφέρονται και με τη χρήση ραπαμυκίνης^{167, 253}. Επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ραπαμυκίνη διαταράσσει τη φυσιολογική επικοινωνία μεταξύ των ποδοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία επιτελείται μέσω μεταβολών των τοπικών συγκεντρώσεων των αυξητικών παραγόντων HIF-1_a και VEGF²⁵⁴. Όμως η χορήγηση ραπαμυκίνης in vitro σε ποδοκύτταρα δεν προκαλεί

τοξικότητα ενώ επίσης δεν προκαλεί πρωτεϊνουρία σε όλους τους ασθενείς που τη λαμβάνουν. Ενδεχομένως η πρόκληση ΕΤΣΣ να οφείλεται και σε άλλα συμβάντα, πέραν της αναστολής του VEGF, που επάγουν την αποκόλληση και απόπτωση των ποδοκυττάρων.

Δεύτερον η ραπαμυκίνη ίσως επιδρά αρνητικά σε μονοπάτια που επάγουν την επιβίωση. Η νεφρίνη και η CD2AP έχουν επιστατικό ρόλο επί της PI3K και της Akt²², οι οποίες με τη σειρά τους ελέγχουν τη λειτουργία του mTORC1 (και ελέγχονται επίσης από το mTORC2). Σε δυο πρόσφατες μελέτες^{18, 181} βρέθηκε ότι η ραπαμυκίνη προκάλεσε μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο η Akt ρυθμίζει μια πληθώρα υποκειμένων πρωτεϊνών-ρυθμιστών της απόπτωσης και του κυτταροσκελετού (όπως η κασπάση-9, XIAP, MM2, IκB/NF-κB, Bad)²⁵⁵ και η μείωση της δραστηριότητάς της επάγει σαφώς την απόπτωση. Το ερώτημα που προκύπτει και αναμένει απάντηση είναι αν η μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt από τη ραπαμυκίνη οφείλεται σε τοξική δράση επί της νεφρίνης (ή του συμπλέγματος νεφρίνης-ποδοσίνης-CD2AP), ή οφείλεται σε αναστολή του mTORC2.

Τρίτον η ραπαμυκίνη προκαλεί μεταβολές του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων *in vitro*. Η δράση αυτή ενδεχομένως οφείλεται και πάλι στην ανασταλτική δράση της ραπαμυκίνης επί της Akt και επί του mTORC2 αλλά επιπλέον και στην αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα των ποδοκυττάρων, Wt1^{18, 181}. *In vitro*, η έκθεση των ποδοκυττάρων σε συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης 20 ng/ml για 48 ώρες οδήγησε σε αλλαγή της μορφολογίας των ποδοκυττάρων, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ανακατανομή των ινιδίων ακτίνης και των πρωτεϊνών των εστιακών προσφύσεων (vinculin) στην περιφέρεια του κυττάρου. Οι αλλαγές αυτές ενδεχομένως προκαλούν μείωση της προσκόλλησης των κυττάρων^{18, 181} κάτι που όπως είναι γνωστό προκαλεί μείωση της επιβίωσης και αύξηση της απόπτωσης.

Συμπερασματικά η ραπαμυκίνη μέσω μείωσης του VEGF, ή μεταβολών στον κυτταροσκελετό ή επαγωγής της απόπτωσης ή συνδυασμού των επιδράσεων αυτών δύναται να προκαλέσει βλάβη στα ποδοκύτταρα και να οδηγήσει σε πρωτεϊνουρία. Οι μεταβολές αυτές φαίνεται να σχετίζονται με μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt αλλά η συνολική εικόνα παραμένει ασαφής και μερικές φορές αντιφατική.

5.3 Επίδραση της ραπαμυκίνης στο φυσιολογικό νεφρό

5.3.1 Σε ζώα

Πολυάριθμες μελέτες σε φυσιολογικά ζώα έδειξαν ότι η ραπαμυκίνη δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις στα νεφρά (λειτουργία, αιμοδυναμική, ιστοπαθολογία). Επιπρόσθετα η δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές ήταν σχετικά μεγάλες σε σχέση με αυτές που χορηγούνται στους ανθρώπους ή σε σχέση με αυτές που απαιτούνται για την πρόκληση ανοσοκαταστολής στα ζώα (πχ 2 mg/kg/d ή τριπλάσια της ανοσοκατασταλτικής δόσης)^{256, 257}. Ακολούθως φάνηκε ότι στις δόσεις αυτές η ραπαμυκίνη ασκεί κάποια τοξικότητα σε ορισμένα είδη τρωκτικών ενώ σε άλλα όχι. Για παράδειγμα σε αρουραίους Sprague–Dawley και σε αυτογενώς υπερτασικούς αρουραίους, προκαλεί 25% μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, ενώ δεν έχει καμία επίδραση σε αρουραίους του είδους Lewis. Η μείωση της νεφρικής λειτουργίας στους αρουραίους Sprague–Dawley δεν συνοδεύτηκε από ιστολογικές βλάβες ενώ στους αυτογενώς υπερτασικούς αρουραίους εμφανίστηκαν νεκρωτικές βλάβες στα σπειράματα και σωληναριακή ατροφία²⁵⁸. Αντίθετα σε χοίρους, των οποίων τα νεφρά μοιάζουν πολύ με τα ανθρώπινα, η ενδοφλέβια χορήγηση ραπαμυκίνης σε δόση 0.4 mg/kg (ανώτατη θεραπευτική) προκάλεσε μικρή (10%) αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και της νεφρικής ροής πλάσματος²⁵⁹. Παρόμοια επίδραση είχε και σε αρουραίους Sprague–Dawley (σε δόση 0.4 mg/kg) αλλά μόνο κατά την οξεία χορήγηση όπου προκάλεσε αύξηση του ΡΣΔ, ενώ σε ποιο μακροχρόνια χορήγηση οδήγησε σε μείωση του ΡΣΔ, της κατανάλωσης τροφής και του σωματικού βάρους²⁶⁰. Σε άλλη μελέτη σε αρουραίους Wistar–Munich η χορήγηση μεγάλων δόσεων ραπαμυκίνης (5 mg/kg) προκάλεσε μείωση (κατά 26%) του ρυθμού σπειραματικής διήθησης του απομονωμένου νεφρώνα, συνεπεία αύξησης της αντίστασης τόσο στο προσαγωγό όσο και στο απαγωγό αρτηρίδιο, η οποία αίρετω μερικώς με χορήγηση L-αργινίνης²⁶¹. Σε κουνέλια η χορήγηση ραπαμυκίνης για διάστημα έως και 60 ημερών δεν μετέβαλλε την αρτηριακή πίεση, τη νεφρική αιματική ροή και την τιμή της κρεατινίνης αλλά οδήγησε σε ήπια σωληναριακή ατροφία και διάμεση ίνωση²⁶².

Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη έχει επίδραση και στον αναπτυσσόμενο νεφρό. Το μονοπάτι PI3K-Akt θεωρείται πιθανό να συμμετέχει στη γένεση των σωληναρίων και τη λειτουργία των πολυκυστινών²⁶³⁻²⁶⁵ όπως επίσης και το TORC1 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του νεφρού σε θηλαστικά²⁶⁶, η δε χορήγηση ραπαμυκίνης με μείωση του σχηματισμού σωληναρίων²⁶⁷. Αξίζει να

σημειωθεί ότι στις παραπάνω μελέτες δεν έγινε ιστολογική εξέταση σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, οπότε πιθανή επίδραση στη μορφολογία των ποδοκυττάρων δεν μπορεί να αποκλειστεί.

5.3.2 Σε ανθρώπους

Υπάρχουν πολύ λίγες δημοσιεύσεις σχετικά με την νεφροτοξικότητα της ραπαμυκίνης σε ανθρώπους. Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης 2 σε ασθενείς με ψωρίαση η χορήγηση ραπαμυκίνης σε δόση 3mg/m² για 8 εβδομάδες δεν επηρέασε τη νεφρική λειτουργία ούτε συνοδεύτηκε από ηλεκτρολυτικές διαταραχές²¹³. Επίσης υπάρχουν αναφορές για πρόκληση υποκαλιαιμίας και σωληναριακής ενζυμομυρίας²⁶⁸, ενώ όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο η ραπαμυκίνη επιτείνει τη νεφροτοξικότητα και αυξάνει τα επίπεδα της κυκλοσπορίνης σε μεταμοσχευμένους ασθενείς²⁶⁹. Η πρόωμη διακοπή της κυκλοσπορίνης και παραμονή μόνο ραπαμυκίνης και στεροειδών σε μεταμοσχευμένους ασθενείς συνοδεύεται από βελτίωση τόσο της νεφρικής λειτουργίας όσο και της ιστολογικής εικόνας²⁷⁰. Ουσιαστικά, με τις χορηγούμενες δόσεις της ραπαμυκίνης στους μεταμοσχευμένους ασθενείς (που είναι σαφώς μικρότερες απ' αυτές που χρησιμοποιούνται σε πειραματικά μοντέλα) δεν παρατηρείται νεφροτοξικότητα (με εξαίρεση την πρωτεϊνουρία), χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι και η έκβαση της νεφρικής λειτουργίας είναι υποχρεωτικά καλύτερη με τη ραπαμυκίνη μετά τη μεταμόσχευση νεφρού.

5.4 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στους πολυκυστικούς νεφρούς

Η αυτοσωμική επικρατητική πολυκυστική νόσος των νεφρών (ADPKD) είναι η συχνότερη κληρονομική νόσος των νεφρών, υπεύθυνη για το 5% των περιπτώσεων τελικού σταδίου ΧΝΝ και εισαγωγής στην αιμοκάθαρση, στο δυτικό κόσμο. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη χιλιάδων κύστεων στο νεφρικό παρέγχυμα. Οι κύστεις σχηματίζονται από έντονα πολλαπλασιαζόμενα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα του άπω νεφρώνα. Παρουσιάζει γενετική ετερογένεια καθώς στην παθογένειά της εμπλέκονται μεταλλάξεις σε 2 τουλάχιστον γονίδια: το *PKD1* (85% των περιπτώσεων) και το *PKD2* (15%). Έχει βρεθεί ότι η πολυκυστίνη-1 (το προϊόν του *PKD1*) αλληλεπιδρά με την tuberin, το προϊόν του γονιδίου της οζώδους σκλήρυνσης (*Tsc2*)²⁷¹. Η κυριότερη λειτουργία της tuberin έγκειται στην αναστολή

της ενεργοποίησης του mTORC1 και ενδεχομένως στην ενεργοποίηση του mTORC2 όπως αναφέρεται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Σε πειραματικά ζωικά μοντέλα ADPKD, τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τις νεφρικές κύστες εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα της mTORC1^{272, 271, 273, 274} γεγονός που υποδηλώνει ότι η πολυκυστίνη-1 φυσιολογικά αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt/mTORC1 και η μετάλλαξή του προκαλεί ανώμαλη ενεργοποίησή του²⁷⁵. Επιπρόσθετα η ραπαμυκίνη φαίνεται να προσφέρει κλινικό όφελος αναφορικά με την εξέλιξη των κύστεων και τη νεφρική επιβίωση σε πειραματικά μοντέλα ADPKD^{273, 271, 276}. Δυστυχώς όμως πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα 2 τυχαιοποιημένων πολυκεντρικών μελετών σε ανθρώπους όπου η χορήγηση σιρολίμης ή εβερολίμης δεν οδήγησε σε ιδιαίτερη βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας στην πρώτη ή του μεγέθους των κύστεων στη δεύτερη^{277, 278}.

5.5 Επίδραση της ραπαμυκίνης στον καρκίνο του νεφρού

5.5.1. Διαυγοκυτταρικός νεφρικός καρκίνος

Η έκφραση των HIF1α και VEGF (υποκειμένων στόχων του TORC1) είναι αυξημένη σε νεφρικούς καρκίνους. Το διαυγο-κυτταρικό καρκίνωμα που αποτελεί τη συχνότερη μορφή νεφρικού καρκίνου χαρακτηρίζεται από σποραδική απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου von Hippel–Lindau (VHL) στο 80% των περιπτώσεων. Το γονίδιο *VHL* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη pVHL, η οποία είναι σημαντική για τη ρύθμιση της ιστικής απάντησης στην υποξία. Σε φυσιολογικά κύτταρα η υποξία επάγει την έκφραση-ενεργοποίηση του HIF1α. Ο τελευταίος μεταναστεύει στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή πληθώρας γονιδίων των οποίων οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων και την παροχή οξυγόνου στους ιστούς, όπως ο VEGF, η ερυθροποιητίνη, ο PDGF και ο TGFα. Σε φυσιολογικά κύτταρα ο HIF1α, αλληλεπιδρά άμεσα και σχηματίζει σύμπλοκο με την pVHL. Η δημιουργία του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουιτίνωση και πρωτεασωμική αποδόμηση του HIF1α. Τα διαυγο-κυτταρικά νεφρικά καρκινώματα δεν είναι σε θέση να αποδομήσουν τον HIF1α τόσο σε υποξικές όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή VEGF και άλλων αγγειοποιητικών παραγόντων. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των αναστολέων της mTOR στο νεφρικό καρκίνο δεν είναι απολύτως γνωστός και, εκτός από την

αναστολή της αγγειογένεσης, μπορεί να περιλαμβάνει άμεση αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ²⁷⁹. Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η ραπαμυκίνη προσφέρει σημαντικό όφελος στο νεφρικό καρκίνο. Το sirolimus προκάλεσε μείωση του μεγέθους νεφρικών νεοπλασματικών όγκων κατά 10 φορές στο δέρμα ποντικών BALB/c ²⁸⁰ αλλά και τις πνευμονικές μεταστάσεις σε μοντέλο ποντικού με ανθρώπινο νεφροκυτταρικό καρκίνο ²⁸¹. Στο νεφροκυτταρικό καρκίνο σε ανθρώπους έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο ένας υδατοδιαλυτός εστέρας της ραπαμυκίνης το τεμισιρόλιμους ο οποίος ασκεί την αντινεοπλασματική του δράση αφού μεταβολιστεί στο αίμα σε ραπαμυκίνη.

Σε μία από τις μεγαλύτερες κλινικές μελέτες μέχρι σήμερα σε 626 ασθενείς με νεφρικό καρκίνο χωρίς προηγούμενη θεραπεία χορηγήθηκε είτε ιντερφερόνη-α είτε τεμισιρόλιμους είτε συνδυασμός των δύο ²⁸². Το τεμισιρόλιμους βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση σε 10,9 μήνες, έναντι 7,3 μήνες στη θεραπεία με ιντερφερόνη και 8,4 μήνες στη θεραπεία με συνδυασμό, ενώ είχε σημαντικά χαμηλότερη τοξικότητα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής οδήγησαν στην έγκριση της χρήσης του τεμισιρόλιμους στη θεραπεία του νεφρικού καρκίνου.

5.5.2 Νεφρικοί όγκοι σχετιζόμενοι με οζώδη σκλήρυνση

Η οζώδης σκλήρυνση είναι ένα σύνδρομο με αυτοσωμική επικρατητική κληρονομικότητα που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη καλοήθων (ενίοτε και κακοήθων) όγκων σε διάφορα όργανα, όπως το ΚΝΣ, το δέρμα και τα νεφρά. Οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων της οζώδους σκλήρυνσης Tsc1 ή Tsc2 ^{128, 283, 284}. Η αδρανοποίηση των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1 ^{283, 284}. Σε μοντέλο οζώδους σκλήρυνσης σε αρουραίους Ecker που φέρουν τη μετάλλαξη για το Tsc2 γονίδιο η ραπαμυκίνη επιβράδυνε την εξέλιξη των νεφρικών όγκων ^{285, 286} με παράλληλη μείωση της S6k, και χωρίς επίδραση στην αυξημένη κυκλίνη D1 ή στην p27kip1.

Στους ανθρώπους τα αγγειομυολιπόματα που σχετίζονται με οζώδη σκλήρυνση παρουσιάζουν αυξημένη φωσφορυλίωση της S6k και της S6 ριβοσωμιακής πρωτεΐνης ¹²⁸. Τέλος υπάρχουν προκαταρκτικά δεδομένα από μεμονωμένες αναφορές ότι η ραπαμυκίνη μειώνει το μέγεθος των νεφρικών αγγειομυολιπωμάτων της οζώδους σκλήρυνσης των ανθρώπων ^{287, 288}.

5.6. Επίδραση της ραπαμυκίνης στην οξεία νεφρική βλάβη (ONB)

5.6.1. Ζωικά πρότυπα

Σε συμφωνία με την αντι-πολλαπλασιαστική της δράση στα ΣΕΚ, πλήθος πειραματικών μελετών έχουν δείξει ότι η ραπαμυκίνη εμποδίζει την αναγέννηση των ΣΕΚ σε μοντέλο ONB από ισχαιμία επαναιμάτωση, καθιστώντας την έτσι επικίνδυνο φάρμακο στην κατάσταση αυτή. Όμως η επίδρασή της στη νεφρική ισχαιμία φαίνεται να ποικίλει ανάλογα με το χρονικό σημείο στο οποίο μελετάται, αλλά και από την οδό χορήγησης και τη δόση. Σε πρόιμη χορήγηση (ημέρα 0-7) η ραπαμυκίνη καθυστέρησε την αποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας μέσω μείωσης του πολλαπλασιασμού, της αναγέννησης και της επιβίωσης των ΣΕΚ^{223, 289}. Παρά την αρχική επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, τελικά υπήρξε πλήρη αποκατάσταση παρά τη συνεχιζόμενη χορήγηση ραπαμυκίνης.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες ο Inman δεν βρήκε καμία επίδραση στη νεφρική λειτουργία σε μοντέλο ισχαιμίας μετά από χορήγηση ραπαμυκίνης από το στόμα σε δόση 0.2 mg/kg²⁹⁰. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου, καθώς η βιοδιαθεσιμότητα της από του στόματος χορηγούμενης ραπαμυκίνης είναι μόνο 10% οπότε η δόση που έλαβαν τελικά τα ζώα ήταν πολύ μικρή. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι όταν παρέλθει η οξεία φάση της ONB, η συνέχιση της χορήγησης ραπαμυκίνης έχει ευεργετική επίδραση στην ιστολογική εικόνα του νεφρού. Για παράδειγμα η συνέχιση της χορήγησής της για 16 εβδομάδες μετά από το επεισόδιο ισχαιμίας σε αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της πρωτεϊνουρίας, της παραγωγής TGFβ1 στο νεφρικό φλοιό, τη μείωση των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1, 2 και 3 και της κασπάσης-3^{291, 292}. Το προστατευτικό αυτό αποτέλεσμα δεν παρατηρείται όμως σε υπερτασικά ποντίκια²⁹³.

5.6.2. Μελέτες σε ανθρώπους

Η επίδραση της ραπαμυκίνης στην ONB έχει μόνο εμμέσως μελετηθεί σε ανθρώπους. Η καθυστέρηση της λειτουργίας του αλλομοσχεύματος (DGF), που παρατηρείται αμέσως μετά τη μεταμόσχευση νεφρού, αποτελεί τυπικό παράδειγμα ONB από οξεία σωληναριακή νέκρωση. Σε μεταμοσχευμένους ασθενείς η ραπαμυκίνη επιμηκύνει το

χρόνο ανάνηψης των σωληναρίων και αυξάνει τα ποσοστά των ασθενών με DGF σε πολλές μελέτες^{162-164, 294}, αλλά όχι σε όλες²⁹⁵.

Οι ασθενείς με DGF υπό θεραπεία με ραπαμυκίνη παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη έκφραση φωσφορυλιωμένης p70S6k γεγονός που εξηγεί την καθυστέρηση της αποκατάστασης των σωληναρίων. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε μείωση αλλά αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt και της επαγωγικής του NF-κB κινάσης (NIK), γεγονός που κατά τους συγγραφείς υποδηλώνει διαφυγή από τη δράση της ραπαμυκίνης με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της φυσιολογικής αναγέννησης του σωληναρίου παρά το γεγονός ότι σε επίπεδο φλεγμονής η ενεργοποίηση των παραγόντων αυτών λειτουργεί επιβαρυντικά²⁹⁶. Οι Smith και συνεργάτες¹⁶⁴ περιέγραψαν επίσης ότι οι ασθενείς με DGF αναπτύσσουν μια μορφή νεφροπάθειας από κυλίνδρους ανάλογη με τη νεφροπάθεια του μυελώματος λόγω απόπτωσης ΣΕΚ και απόφραξης του σωληναριακού αυλού. Τέλος άλλοι συγγραφείς¹⁸⁰ προτείνουν ότι η πρωτεϊνουρία που παρατηρείται σε ασθενείς με DGF υπό ραπαμυκίνη οφείλεται σε μείωση της σωληναριακής επαναρόφησης πρωτεϊνών ενώ παράλληλα δεν παρατήρησαν βλάβες στα ποδοκύτταρα τη στιγμή της βιοψίας.

6. Η επίδραση της ραπαμυκίνης σε πειραματικές παθήσεις.

Πολλές πειραματικές παθήσεις προκαλούνται από αυτοάνοσους μηχανισμούς που βλάπτουν τα ενδογενή πειραματικά κύτταρα²⁹⁷. Οι αιτιολογικοί παράγοντες που επάγουν την αυτοανοσία δεν είναι γνωστοί, αλλά απαραίτητη προϋπόθεση στις καταστάσεις αυτές είναι ο πολλαπλασιασμός ανοσοκυττάρων στην περιφέρεια. Επιπρόσθετα ο τοπικός πολλαπλασιασμός ενδογενών πειραματικών κυττάρων (μεσαγγειακών στην περίπτωση της IgA νεφροπάθειας, ποδοκυττάρων και τοιχωματικών επιθηλιακών κυττάρων στη μηνοειδή ΣΝΦ) επιδεινώνουν τη νεφρική βλάβη²⁹⁸. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου μειώνουν την εξέλιξη της πειραματικής αυτοάνοσης νεφροπάθειας^{299, 300}. Οι μελέτες αυτές εγείρουν την πιθανότητα η ραπαμυκίνη να αποτελεί επίσης ωφέλιμη θεραπεία στις διάφορες αυτοάνοσες πειραματοπάθειες.

6.1. Ζωικά πρότυπα

6.1.1. Σπειραματικές παθήσεις που συνοδεύονται από νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία χωρίς υπερπλασία σπειραματικών κυττάρων

Η επίδραση της ραπαμυκίνης έχει μελετηθεί σε μοντέλα μεμβρανώδους ΣΝΦ όπως παθητικής και ενεργητικής νεφρίτιδας του Heymann. Σε ένα μοντέλο παθητικής νεφρίτιδας του Heymann με νεφρεκτομή, η ραπαμυκίνη μείωσε την έκφραση προ-φλεγμονωδών και προ-ινωτικών γονιδίων, τη διάμεση φλεγμονή και ίνωση, και την αντιρροπιστική νεφρική υπερτροφία³⁰¹. Στο ενεργητικό μοντέλο της νεφρίτιδας του Heymann η ραπαμυκίνη εμφάνισε προστατευτική δράση τόσο στην αρχική φάση επαγωγής της νόσου όσο και στη φάση της χρονιότητας³⁰².

Παρομοίως η ραπαμυκίνη έδειξε νεφροπροστατευτική δράση όταν χορηγήθηκε στα αρχικά στάδια ΕΤΣΣ από πουρομυκίνη³⁰³ και αδριαμυκίνη³⁰⁴ σε αρουραίους. Αντιθέτως σε αρουραίους με νεφροπάθεια από υπερφόρτωση πρωτεΐνης, η χορήγηση ραπαμυκίνης κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ΣΕΚ (χωρίς να αυξήσει το ρυθμό απόπτωσής των) και προκάλεσε σοβαρή ΟΝΒ λόγω εξεσημασμένου σχηματισμού σωληναριακών κυλίνδρων³⁰⁵. Στο φωτονικό μικροσκόπιο υπήρξε αυξημένη παρουσία ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών κυστιδίων στα σωληναριακά κύτταρα, αλλά η έκφραση του κυτταροσκελετικού δείκτη τουμπουλίνη και η επαναρρόφηση σημασμένης αλβουμίνης δεν μειώθηκαν από τη ραπαμυκίνη²³⁷ γεγονός που υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός των κυλίνδρων δεν οφείλεται σε μείωση της ενδοκυττάρωσης της αλβουμίνης μέσω του υποδοχέα της στα ΣΕΚ. Οι αιτίες για τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα της επίδρασης της ραπαμυκίνης στα διάφορα πειραματικά πρότυπα νεφρωσικού συνδρόμου δεν είναι ξεκάθαρη αλλά μπορεί να σχετίζεται με το χρόνο στον οποίο ξεκινά η χορήγηση της ραπαμυκίνης, τη βαρύτητα της σωληναριακής βλάβης που προκαλείται από την πρωτεϊνουρία και το ρυθμό πολλαπλασιασμού των ΣΕΚ που αυτή επάγει. Σε ανθρώπους υπάρχουν μόνο μεμονωμένες αναφορές και μικρές πιλοτικές μελέτες για τη χρήση ραπαμυκίνης σε ΕΤΣΣ με μάλλον αντιφατικά αποτελέσματα³⁰⁶⁻³⁰⁹ που ενδεχομένως έχουν και πάλι να κάνουν με τη δοσολογία της ραπαμυκίνης.

6.1.2. Μεσαγγειουπερπλαστική ΣΝΦ (μοντέλο Anti-thy1 νεφρίτιδας)

Το μοντέλο της anti-thy1 νεφρίτιδας σε αρουραίους χρησιμοποιείται για τη μελέτη της παθογένεσης της μεσαγγειουπερπλαστικής ΣΝΦ (ΜΥΣΝΦ) όπως είναι η IgA

νεφροπάθεια, που αποτελεί τη συχνότερη ΣΝΦ στον κόσμο ²⁹⁷. Οι αναστολείς του mTORC1 εμφανίζουν αντιφατική συμπεριφορά και αποτελέσματα στη θεραπεία της ΜΥΣΝΦ. Τόσο η σιρολίμη όσο και η εβερολίμη είχαν αρνητική επίδραση στην εξέλιξη της anti-thy1 νεφρίτιδας, όταν χορηγήθηκαν κατά τα αρχικά στάδια της νόσου και σε μεγάλες δόσεις ^{303, 310} αλλά περιέργως είχαν θεραπευτική επίδραση όταν χορηγήθηκαν αργότερα στην πορεία της νόσου και σε μικρότερες δόσεις ^{311 212}.

Σε πρόιμη χορήγηση και σε υψηλές δόσεις (1–3 mg/kg/ημέρα) η εβερολίμη προκάλεσε μείωση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της έκφρασης του VEGF, εμπόδισε την επούλωση των τριχοειδών και οδήγησε στο σχηματισμό μικροανευρυσμάτων στα πειραματικά τριχοειδή, μηνοειδών σχηματισμών στο χώρο του Bowman, πειραματοσκλήρυνσης και επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο ^{303, 310}. Αντιθέτως όταν χορηγήθηκαν χαμηλότερες δόσεις εβερολίμης (0.3 mg/kg/ημέρα) σε αψότερο στάδιο της νόσου, παρατηρήθηκε μείωση της μεσαγγειακής υπερπλασίας χωρίς να επηρεάζεται η ενδοθηλιακή ανάπλαση (πολλαπλασιασμός) ³¹⁰. Σε άλλη μελέτη σε μοντέλο anti-thy1 νεφρίτιδας η χορήγηση χαμηλής δόσης ραπαμυκίνης από το στόμα (στο φαγητό 2.5 mg/kg) από την ημέρα 10 έως και την 20^η εβδομάδα μείωσε την πρωτεϊνουρία, την αρτηριακή πίεση, τη σωληναριοδιάμεση ίνωση-φλεγμονή και βελτίωσε τη νεφρική λειτουργία ²¹².

6.1.3. Πειραματική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια

Οι Keller και συνεργάτες ερεύνησαν περαιτέρω, το κατά πόσο η αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι βλαπτική στην ανάπλαση των πειραματικών τριχοειδών. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο πειραματικής θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας με χορήγηση από τη νεφρική αρτηρία αντισωμάτων εναντίων των πειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων, έδειξαν ότι η εβερολίμη ενώ μείωσε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν επιβάρυνε τελικά την ανάπλαση των πειραματικών τριχοειδών ³¹².

6.1.4. Πειραματικά πρότυπα νεφρίτιδας του λύκου (ΝΛ) σε επίμυες

Η ραπαμυκίνη έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες σε NZBW/F1 ποντίκια να βελτιώνει την κλινική πορεία και την ιστολογική εικόνα της ΝΛ καθώς και τη συνολική επιβίωση ³¹³⁻³¹⁷. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν ΝΛ στην ηλικία των 4 μηνών και

πεθαίνουν από νεφρική ανεπάρκεια σε ηλικία 8-12 μηνών. Έχει επίσης βρεθεί ότι παρατείνει την επιβίωση, μειώνει την πρωτεϊνουρία και τη φλεγμονή σε διάφορα όργανα περιλαμβανομένων των νεφρών στο MRL/lpr μοντέλο ΣΕΛ³¹⁸. Επιπλέον μείωσε τη δραστηριότητα της νόσου σε 9 ασθενείς με ανθεκτικό σε άλλες θεραπείες ΣΕΛ³¹⁹. Ο μηχανισμός με τον οποίο η ραπαμυκίνη ωφελεί στην πειραματική ΝΛ είναι ουσιαστικά άγνωστος και αποτελεί στόχο διερεύνησης της παρούσας διατριβής. Συνοπτικά όπως αναφέρεται στο ειδικό μέρος φαίνεται ότι στη ΝΛ το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3/Akt/mTOR είναι ενεργοποιημένο στα πάσχοντα σπειράματα, αναστέλλεται πλήρως από τη ραπαμυκίνη και η αναστολή του συνοδεύεται από πρόληψη ή και αναστροφή των ιστολογικών βλαβών και της πρωτεϊνουρίας³²⁰.

6.1.5. Μηνοειδής ΣΝΦ

Το mTORC1 πιθανά παίζει ρόλο στην παθογένεια της νόσου και τον πολλαπλασιασμό των σπειραματικών κυττάρων που παρατηρείται στη μηνοειδή ΣΝΦ.

Για παράδειγμα σε ποντίκια με υπερέκφραση του HIF-1α (ενός γονιδίου που ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα του mTORC1) αποκλειστικά στα ποδοκύτταρα (με τη χρήση Cre-lox απαλοιφής του γονιδίου VHL) οδήγησε στην αυτόματη πρόκληση είτε μηνοειδούς ΣΝΦ³²¹ είτε ΕΤΣΣ²⁴⁶.

Σε μοντέλο anti-GBM νεφρίτιδας με αυτόλογη παραγωγή αντισωμάτων έναντι της ετερόλογης anti-GBM σφαιρίνης, η προφυλακτική χορήγηση ραπαμυκίνης ταυτόχρονα με την ετερόλογη σφαιρίνη μείωσε τον πολλαπλασιασμό των φλεγμονωδών κυττάρων τις σπειραματικές ανοσο-εναποθέσεις και την αυτόλογη παραγωγή αντισωμάτων χωρίς να μεταβάλλει την έκφραση των ρυθμιστικών CD4+CD25-FoxP3 κυττάρων στους λεμφαδένες³²². Στην ίδια μελέτη όταν η χορήγηση ραπαμυκίνης έγινε την 14^η μέρα μετά την πρόκληση της ΣΝΦ υπήρξε τοξική επίδραση με αύξηση της πρωτεϊνουρίας και της φλεγμονής, παρατηρούμε δηλαδή ένα φαινόμενο εντελώς αντίθετο από αυτό που παρατηρείται στην ΜΥΣΝΦ.

Τέλος σε αρουραίους με πρόκληση ΣΝΦ με νεφροτοξικό ορό, η πρόιμη θεραπεία με ραπαμυκίνη ήταν ευεργετική. Φαίνεται επομένως ότι η θεραπευτική δράση της ραπαμυκίνης εξαρτάται από το στάδιο της νόσου κατά το οποίο ξεκινά η θεραπεία.

6.2. Μελέτες σε ανθρώπους

Γενικά ο ρόλος της ραπαμυκίνης στη θεραπεία των ΣΝΦ παραμένει ασαφής καθώς αρκετές μελέτες έχουν δείξει οξεία νεφροτοξικότητα. Στην πρώτη μελέτη που δημοσιεύτηκε ο Fervenza και συνεργάτες εξέτασε την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ραπαμυκίνης σε 11 ασθενείς με διάφορες πρωτεϊνουρικές χρόνιες σπειραματοπάθειες και ενδείξεις σταδιακής επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας³²³. Έξι από τους 11 ασθενείς ανέπτυξαν οξεία νεφρική ανεπάρκεια από τους οποίους οι 4 βελτιώθηκαν μετά τη διακοπή του φαρμάκου, ένας εμφάνισε ξανά οξεία επιδείνωση μετά από επαναχορήγηση και ένας οδηγήθηκε σε χρόνια αιμοκάθαρση.

Παρομοίως αντιφατικός παραμένει ο ρόλος της ραπαμυκίνης σε ασθενείς με ΕΤΣΣ^{306, 308, 309, 323-325}. Σε μια ανοιχτή προοπτική μελέτη σε 21 ασθενείς με ανθεκτική ΕΤΣΣ, η χορήγηση ραπαμυκίνης οδήγησε σε πλήρη ύφεση της πρωτεϊνουρίας (<300 mg/24ωρο στους 6 μήνες) σε 4 ασθενείς και σε μερική ύφεση (50% μείωση της αρχικής πρωτεϊνουρίας) σε άλλους 8. Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν παρουσίασαν επίσης σταθεροποίηση της νεφρικής λειτουργίας και αύξηση του συντελεστή σπειραματικής υπερδιήθησης³⁰⁸. Αντιθέτως στις άλλες πιλοτικές μελέτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως υπογραμμίζεται η πιθανή νεφροτοξική δράση της ραπαμυκίνης. Κοινή είναι η παρατήρηση στις μελέτες αυτές και σε αναλογία με τις μελέτες σε ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος, ότι όσο μεγαλύτερη η διάρκεια της νόσου τόσο πιθανότερη η εμφάνιση νεφροτοξικότητας και αποτυχίας της θεραπείας. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί 2 περιπτώσεις ασθενών με χρόνια υποτροπιάζων νεφρωσικό σύνδρομο στα πλαίσια νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων που ανταποκρίθηκαν θεαματικά σε συνδυασμό ραπαμυκίνης με τακρολίμη³²⁶ ή κυκλοσπορίνη³²⁷ τουλάχιστον 15 χρόνια μετά την εμφάνιση της νόσου.

Στην περίπτωση της μεμβρανώδους ΣΝΦ δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα σε ανθρώπους αλλά διεξάγεται ήδη μια κλινική μελέτη χρηματοδοτούμενη από το ΝΙΗ τα αποτελέσματα της οποίας αναμένονται εντός του 2010.

Τέλος υπάρχει μία αναφορά για μείωση των επιπέδων των ANCA αντισωμάτων³²⁸ από τη ραπαμυκίνη σε παιδιατρικό ασθενή με ανοσοπενική μηνοειδή ΣΝΦ.

7. Επίδραση της ραπαμυκίνης στη διαβητική νεφροπάθεια

7.1. Ζωικά πρότυπα

Σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια που εμφανίζουν ινσουλινο-εξαρτώμενο διαβήτη στα πλαίσια αυτοανοσίας, η πρόιμη χορήγηση ραπαμκίνης για περίπου 100 μέρες φάνηκε να προλαμβάνει την ανάπτυξη της νόσου πιθανά στα πλαίσια της ανοσοτροποποιητικής της δράσης. Επιπρόσθετα η απουσία του διαβήτη επιβεβαιώθηκε για άλλες 41 εβδομάδες μετά τη διακοπή της ραπαμκίνης³²⁹. Χορήγησή της μετά από την εμφάνιση του διαβήτη δεν είχε κανένα θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Σε διαβητικά ζώα έχει βρεθεί ότι η έκφραση στα νεφρά του mTORC1 αυξάνεται μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την AMPK³³⁰. Σε πολλές άλλες μελέτες έχει επίσης βρεθεί ότι η ραπαμκίνη μειώνει τη νεφρική υπερτροφία, τη φλεγμονή και την ίνωση σε διάφορα μοντέλα διαβήτη^{241 330 331 332 333}.

Για παράδειγμα σε αρουραίους με διαβήτη από στρεπτοζοτοκίνη η χορήγηση ραπαμκίνης από την 16^η έως την 20^η εβδομάδα μείωσε την αλβουμινουρία τη φωσφορυλίωση της Akt και την έκφραση του mTORC1, του TGF-β1 και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF). Επιπλέον μείωσε την μεσαγγειακή υπερπλασία και την έκφραση αSMA³³¹. Οι επιδράσεις της ραπαμκίνης ήταν αντίστοιχες με αυτές της χορήγησης ινσουλίνης στα διαβητικά ζώα³³¹. Παρόμοια ευρήματα υπήρξαν και σε άλλο μοντέλο διαβήτη σε ποντίκια db/db³³². Τέλος σε παχύσαρκους διαβητικούς αρουραίους Zucker η νεφρική έκφραση των κινασών ολική Akt, ολική mTOR, Ser473pAkt και Ser2448pTOR ήταν αυξημένη, υποδηλώνοντας έτσι ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt/mTORC1, και αποκαταστάθηκε μετά από χορήγηση ραπαμκίνης³³⁴.

7.2. Μελέτες σε ανθρώπους

Η μόνη μελέτη που υπάρχει στους ανθρώπους αφορά σε μια αναδρομική σειρά 62 ασθενών με μεταμόσχευση νησιδιακών κυττάρων του παγκρέατος. Τρεις από τους 62 ασθενείς ανέπτυξαν πρωτεϊνουρία και πέντε ολιγο-λευκωματινουρία κατά τη μετάβαση από αναστολέα καλσινευρίνης σε ραπαμκίνη χωρίς CNI. Από τους 3 ασθενείς οι 2 είχαν βεβαιωμένη διαβητική νεφροπάθεια και επομένως δεν ωφελήθηκαν από τη μετατροπή¹⁶⁸. Η πρωτεϊνουρία βελτιώθηκε μετά από αύξηση της δόσης του CNI και αντικατάσταση της ραπαμκίνης με MMF, γεγονός που υποδηλώνει όπως και στους ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος ότι η πρωτεϊνουρία οφείλεται εν μέρει στην απόσυρση του CNI.

8. Επίδραση της ραπαμυκίνης σε μη διαβητική χρόνια νεφρική νόσο (XNN)

8.1. Ζωικά πρότυπα

8.1.1. Μονόπλευρη νεφρεκτομή

Παρομοίως με την επίδρασή της σε μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας η ραπαμυκίνη αναστέλλει την αντιροπιστική νεφρική υπερτροφία μετά από νεφρεκτομή παράλληλα με μείωση της φωσφορυλίωσης της S6 ριβοσωμιακής πρωτεΐνης και της 4E-BP1 σε ποντίκια³³⁵.

8.1.2. Πειραματικό πρότυπο εναπομείναντος νεφρού

Στο μοντέλο αυτό αφαιρούμε τα πέντε έκτα της νεφρικής μάζας είτε χειρουργικά είτε με περίδεση των αντίστοιχων νεφρικών αγγείων. Το μοντέλο αυτό αναπαράγει ορισμένα από τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την εξέλιξη της XNN στους ανθρώπους. Στο μοντέλο αυτό οι επιδράσεις των TOR αναστολέων θυμίζουν αυτές που είδαμε και στο κεφάλαιο των πειραματικών παθήσεων. Για παράδειγμα ο Vogelbacher βρήκε ότι η πρόιμη χορήγηση εβερολίμης, 3 μέρες μετά τη μείωση της νεφρικής μάζας, κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και μεσαγγειακών κυττάρων και επιδείνωσε την πρωτεϊνουρία και τις ιστολογικές βλάβες³³⁶. Αντιθέτως όταν χορηγήθηκε σιρολίμη την 6^η εβδομάδα μετά την επαγωγή του μοντέλου, βελτιώθηκε τόσο η πρωτεϊνουρία όσο και η ίνωση-φλεγμονή³³⁷. Η σιρολίμη μείωσε τη νεφρική παραγωγή VEGF και παραδόξως αύξησε τα επίπεδα του VEGF στον ορό. Σε άλλη νεότερη μελέτη τόσο η πρόιμη όσο και η όψιμη χορήγηση ραπαμυκίνης είχε ευεργετικά αποτελέσματα στο μοντέλο αυτό³³⁸.

8.1.3. Μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα

Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται επίσης για την έρευνα της παθογένειας και εξέλιξης της XNN. Και στο μοντέλο αυτό η ραπαμυκίνη έδειξε να βελτιώνει την ιστολογική εικόνα τόσο σε αρουραίους όσο και σε ποντίκια^{231, 339 340}.

8.1.4. Άλλα πρότυπα

Η ραπαμυκίνη αύξησε την έκφραση κυτταροπροστατευτικού γονιδίου A20 αλλά όχι άλλων όπως το Bcl-2, HO-1 και Bcl-xl σε ένα μοντέλο χρόνιας νεφροπάθειας μοσχεύματος σε αρουραίους³⁴¹. Όμως σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι η ραπαμυκίνη μπορεί να έχει και προ-ινωτική δράση στο διάμεσο ιστό in vivo, που είναι όμως ηπιότερη σε σχέση με τους CNIs¹⁵⁶. Σε ένα in vivo μοντέλο

ισογενούς νεφρικής μεταμόσχευσης³⁴² η χορήγηση ραπαμυκίνης για 14 μέρες προκάλεσε αύξηση της έκφρασης TGFβ1 στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα και της διήθησης του φλοιού από αSMA θετικά κύτταρα κυρίως όμως σε υψηλές δόσεις των 6.5 mg/kg/ημέρα, po (το ίδιο συνέβη και με την τακρολίμη). Επίσης η ραπαμυκίνη προκάλεσε επαγωγή του TGFβ1 σε φυσιολογικούς αρουραίους που τρέφονται με δίαιτα χαμηλή σε αλάτι, η οποία μπορούσε να κατασταλεί με ταυτόχρονη χορήγηση μυκοφαινολικού οξέος³⁴³. Η χορήγηση ραπαμυκίνης σε δόση 0.3 mg/kg/ημέρα υποδορίως για 28 μέρες στο ίδιο μοντέλο προκάλεσε αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών TUNEL-θετικών κυττάρων και προήγαγε ένα προαποπτωτικό περιβάλλον (αύξηση p53, μείωση Bcl-xl). Τέλος σε διαγονιδιακούς αρουραίους που υπερεκφράζουν ρενίνη και αγγειοτενσινογόνο η εβερολίμη προκάλεσε αύξηση του CTGF και του TGFβ1 καθώς και της εναπόθεσης κολλαγόνου στα νεφρά³⁴⁴. Η αύξηση του CTGF έχει επίσης παρατηρηθεί και με τη ραπαμυκίνη σε φυσιολογικούς αρουραίους³⁴⁵. Η σημασία αυτών των προ-ινωτικών δράσεων στη εξέλιξη της XNN στους ανθρώπους δεν είναι γνωστή.

8.2. Δυνητική χρησιμότητα της ραπαμυκίνης στην XNN του ανθρώπου

8.2.1. Επίδραση στην απώλεια της νεφρικής λειτουργίας σε XNN

Η επίδραση της ραπαμυκίνης στην απώλεια της νεφρικής λειτουργίας σε XNN έχει μελετηθεί μόνο στη χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος. Σε 3 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες σε μεταμοσχευμένους ασθενείς βρέθηκε ότι η νεφρική λειτουργία διατηρείται καλύτερα και σε υψηλότερα επίπεδα με ανοσοκατασταλτικά σχήματα που περιέχουν ραπαμυκίνη έναντι αυτών που περιλαμβάνουν κάποιον CNI^{270, 346}. Τα θετικά αυτά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και κατά την επέκταση της μελέτης στα 5 χρόνια παρακολούθησης³⁴⁷. Σε άλλη μελέτη η ραπαμυκίνη αποδείχθηκε το ίδιο αποτελεσματική με την τακρολίμη και την κυκλοσπορίνη στην επιβίωση ασθενών και μοσχευμάτων στην πενταετία ενώ αρχικά είχε φανεί να πλεονεκτεί κατά τη διάρκεια του 1ου χρόνου παρακολούθησης³⁴⁸. Οι δείκτες όμως της χρόνιας νεφροπάθειας μοσχεύματος (διάμεση ίνωση, σωληναριακή ατροφία, υπέρταση), παρέμειναν καλύτεροι στην ομάδα της ραπαμυκίνης τόσο στον 1ο χρόνο όσο και στα 5 χρόνια³⁴⁸. Επίσης η ραπαμυκίνη μείωσε τα επίπεδα του TGFβ1 στα ούρα ασθενών με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος μετά τη μετατροπή από CNI σε

ραπαμυκίνη³⁴⁹. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη είναι λιγότερο νεφροτοξική από τους CNIs αλλά σίγουρα απαιτούνται περισσότερα και πιο μακροχρόνια δεδομένα, πέραν των 5 ετών. Απ'την άλλη μεριά πολλές μελέτες έδειξαν ότι η νεφρική λειτουργία επιδεινώνεται σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος που μεταφέρονται σε ραπαμυκίνη, εάν προϋπάρχει σημαντική λευκωματουρία (>800 mg/ημέρα) και σημαντικά επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (GFR <30-40 ml/min/1.73 m²) κατά τη μετατροπή³⁵⁰. Οι μηχανισμοί που καθορίζουν τις επιδράσεις αυτές είναι άγνωστοι αλλά ενδέχεται να αφορούν σε τοξικές επιδράσεις πάνω σε αντισταθμιστικούς μηχανισμούς στη χρόνια βλάβη των ποδοκυττάρων, των ΣΕΚ και της αγγειογένεσης του διαμέσου ιστού¹⁹⁶.

8.2.2. Επίδραση στην πρωτεϊνουρία σε XNN

Η πρωτεϊνουρία νεφρωσικού επιπέδου αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με XNN. Από την άποψη αυτή είναι σημαντικό ότι η ραπαμυκίνη αποδεδειγμένα επάγει την πρωτεϊνουρία σε σημαντικό ποσοστό ασθενών³⁵¹. Το μεγαλύτερο μέρος της σχετικής βιβλιογραφίας προέρχεται από μεταμοσχευμένους ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος, στους οποίους αποσύρεται ο αναστολέας καλσινευρίνης ως ένας από τους κυρίαρχους υπαίτιους και αντικαθίσταται με ραπαμυκίνη.

Οι περισσότερες μελέτες ήταν είτε μεμονωμένα περιστατικά είτε σειρές ασθενών στις οποίες μετρήθηκε η πρωτεϊνουρία πριν και μετά τη μετατροπή χωρίς την ύπαρξη ομάδας ελέγχου³⁵²⁻³⁵⁴. Η επίπτωση της πρωτεϊνουρίας μετά τη μετατροπή ανέρχεται στις μελέτες αυτές σε ποσοστά από 30 έως και 90% η δε επίπτωση νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρίας έως και 10%³⁵²⁻³⁵⁴.

Η έναρξη της πρωτεϊνουρίας παρατηρείται μέσα σε λίγες εβδομάδες ή μήνες μετά τη μετατροπή και είναι σπειραματικής αρχής (κυρίως πρόκειται για αλβουμινουρία με λόγο IgG/αλβουμίνης < 0.15). Η μετατροπή συνοδεύτηκε επίσης με αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης και της νεφρικής ροής πλάσματος και μείωση της πίεσης στα απαγωγά αρτηρίδια³⁵⁴. Σε ορισμένες μελέτες η εμφάνιση πρωτεϊνουρίας αφορούσε κυρίως σε ασθενείς με προϋπάρχουσα πρωτεϊνουρία της τάξης των 2 g/ημέρα και πάνω³⁵⁵.

Η επίδραση της ραπαμυκίνης στην πρωτεϊνουρία μετά τη μετατροπή εξετάστηκε επίσης σε μια υπομελέτη της μελέτης CONVERT^{178 356}. Οι ασθενείς είχαν υποβληθεί

σε νεφρική μεταμόσχευση 6 έως και 120 μήνες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη και θεραπεύονταν με κλασικό σχήμα αποτελούμενο από ένα CNI, κορτικοειδή και αζαθειοπρίνη ή μυκοφαινολικό. Η μελέτη συμπεριέλαβε 830 ασθενείς από τους οποίους οι 275 συνέχισαν τον CNI και 555 μεταφέρθηκαν σε ραπαμυκίνη. Η πρωτεϊνουρία εκτιμήθηκε σε τυχαίο δείγμα ούρων στους 6, 12 και 24 μήνες με βάση το λευκωματινικό δείκτη (πρωτεΐνη/κρεατινίνη ούρων). Στον 1 χρόνο 87 ασθενείς από την ομάδα του χαμηλού GFR (20–40 ml/min) αποσύρθηκαν από τη μελέτη λόγω επιπλοκών (οξεία απόρριψη, απώλεια μοσχεύματος και θάνατος). Η πρωτεϊνουρία αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα της ραπαμυκίνης μετά τη μετατροπή. Πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας στον 1 χρόνο ήταν η μετατροπή σε ραπαμυκίνη, ο λευκωματινικός δείκτης πάνω από 0,5 mg/mmol κατά τη μετατροπή, η διάμεση ίνωση και ο προϋπάρχων σακχαρώδης διαβήτης.

Σε μία άλλη μελέτη 4 από 76 ασθενείς (4%) ανέπτυξαν νεφρωσικού επιπέδου λευκωματουρία εντός λίγων μηνών από τη μεταμόσχευση ενώ ήταν σε θεραπεία με ραπαμυκίνη, μυκοφαινολικό και στεροειδή¹⁷⁵. Οι ασθενείς αυτοί έλαβαν εξαρχής ραπαμυκίνη, δεν είχαν ιστορικό ΕΤΣΣ ούτε χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος. Η πρωτεϊνουρία υποχώρησε μετά την αντικατάσταση της ραπαμυκίνης με τακρολίμη. Η βιοψία νεφρού ανέδειξε βλάβες συμβατές με ΕΤΣΣ κλασικού τύπου με φαινοτυπικές αλλαγές στα ποδοκύτταρα και μείωση του VEGF στα σπειράματα¹⁷⁵. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η εμφάνιση των βλαβών αυτών συσχετίστηκε με εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα ραπαμυκίνης (από 16-26ng/ml). Και πάλι όμως δεν μπορούμε να προβούμε σε ασφαλή συμπεράσματα καθώς ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός, δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου, και το ποσοστό εμφάνισης νεφρωσικού συνδρόμου μετά τη μεταμόσχευση εμφανίζει ούτως ή άλλως παρόμοια συχνότητα (3 έως 14%) συνεπεία de novo ή υποτροπιαζουσών σπειραματοπαθειών και χρόνιας νεφροπάθειας μοσχεύματος^{357, 358}. Η τελευταία μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και εντός ολίγων μηνών από τη μεταμόσχευση και να χαρακτηρίζεται από σοβαρή πρωτεϊνουρία. Από την άλλη μεριά στη μελέτη ELITE-symphony το ποσοστό εμφάνισης πρωτεϊνουρίας (5.3%) στο σκέλος της ραπαμυκίνης δεν διέφερε από τις άλλες ομάδες που έλαβαν αναστολείς καλσινευρίνης³⁵⁹. Παρόμοια αποτελέσματα (δηλαδή βελτίωση νεφρικής λειτουργίας αλλά αύξηση πρωτεϊνουρίας) παρουσιάζονται και σε μελέτες όπου διεκόπησαν οι CNIs και αντικαταστάθηκαν με

αζαθειοπρίνη ή μυκοφαινολικό^{360, 361}. Επιπλέον σε όλες αυτές τις μελέτες δεν παρουσιάστηκε πρωτεϊνουρία όταν η διακοπή των CNI έγινε πρώιμα (στους 3 πρώτους μήνες) ανεξάρτητα από το αν η αντικατάσταση έγινε με αζαθειοπρίνη ή ραπαμυκίνη^{360, 362} και παρατηρήθηκε μόνο εάν υπήρχε υποκείμενη χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος³⁶¹. Επομένως η εμφάνιση πρωτεϊνουρίας δεν αποτελεί φαινόμενο που αφορά ειδικά στη μετατροπή σε ραπαμυκίνη (εφόσον διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα) καθώς παρατηρείται και με άλλα φάρμακα. Άρα θα μπορούσε να αποδοθεί καθαυτό στην απόσυρση των CNI, καθώς μετά την απόσυρση τους αναπτύσσεται πειραματική υπερδιήθηση η οποία μπορεί να αναστραφεί (όπως και η πρωτεϊνουρία) με χορήγηση αΜΕΑ^{354, 363}. Πέραν της απόσυρσης των CNI, θα πρέπει να δεχθούμε με βάση τα πειραματικά δεδομένα ότι η ραπαμυκίνη σε μεγάλες δόσεις προκαλεί άμεσα πρωτεϊνουρία κυρίως λόγω έντονης καταστολής του VEGF¹⁷⁵. Δεδομένης όμως της έλλειψης ομάδας ελέγχου στις υπάρχουσες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, η υπόθεση αυτή απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Από τα δεδομένα της βιβλιογραφίας της νεφρικής μεταμόσχευσης φαίνεται ότι η ραπαμυκίνη έχει μικτές επιδράσεις στην εξέλιξη της ΧΝΝ και της πρωτεϊνουρίας στον άνθρωπο, οπότε η χρήση της για το σκοπό αυτό δεν δικαιολογείται προτού έχουμε νεότερα δεδομένα. Σε κάθε περίπτωση αν ο θεράπων γιατρός αποφασίσει να τη χρησιμοποιήσει απαιτείται στενή παρακολούθηση του ασθενούς για πιθανή εμφάνιση τοξικότητας.

9. Συστηματικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης με πιθανή επίδραση στη νεφρική λειτουργία.

9.1. Υπέρταση

Η υπέρταση είναι γνωστό ότι επιδεινώνει κάθε μορφή ΧΝΝ. Σε μεταμοσχευμένους ασθενείς η θεραπεία με ραπαμυκίνη συνοδεύεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης³⁶⁴. Αυτό οφείλεται ίσως σε μείωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειακής χάλασης και της παραγωγής νιτρικού οξειδίου κάτι που έχει επίσης παρατηρηθεί σε αρουραίους²⁶⁰. Εν τούτοις η πιθανή επίδραση της παρενέργειας αυτής στην εξέλιξη της ΧΝΝ είναι άγνωστη.

9.2. Υπερλιπιδαιμία

Η υπερλιπιδαιμία σχετίζεται με επιδείνωση της ΧΝΝ³⁶⁵ και είναι γνωστό ότι η ραπαμυκίνη σχετίζεται ισχυρά με την πρόκληση υπερλιπιδαιμίας. Οι πιθανές συνέπειες της αύξησης των λιπιδίων, στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι άγνωστες. Η κατάσταση περιπλέκεται από το γεγονός ότι η ραπαμυκίνη, παρά την αύξηση των λιπιδίων, έχει αντι-αθηρωσκληρυντική δράση σε knockout για την απολιποπρωτεΐνη Ε ποντίκια, εξαιτίας της αντιπολλαπλασιαστικής της δράσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα^{366, 367}. Το καθαρό αποτέλεσμα των επιδράσεων αυτών στον άνθρωπο και στη ΧΝΝ παραμένει άγνωστο.

9.3. Υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη

Όλο και περισσότερα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η ραπαμυκίνη προκαλεί επιδείνωση της υπεργλυκαιμίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη. Η φυσιολογική μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης εξαρτάται από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mTORC1 μέσω του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS). Χρόνια έκθεση σε ραπαμυκίνη σχετίζεται με μειωμένη ενεργοποίηση των IRS-1, IRS-2 και Akt σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος μεταμοσχευμένων μετά από φόρτιση με ινσουλίνη³⁶⁸. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειώσουμε ότι η προηγούμενη μελέτη έρχεται σε πλήρη αντίθεση με μελέτες σε καρκινικές σειρές στις οποίες η ραπαμυκίνη βρέθηκε να επάγει την ενεργοποίηση του IRS και της Akt μέσω αναστολής της δράσης της S6K με αποτέλεσμα την εξασθένιση της όποιας αντικαρκινικής της δράσης. Όμως υπάρχουν και άλλες μελέτες στις οποίες παρατηρείται μια κατάσταση αντοχής στην ινσουλίνη και δυσανεξίας στη γλυκόζη³⁶⁹. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και από την αναδρομική ανάλυση των δεδομένων του αρχείου των ΗΠΑ (Unites States Renal Data System) σε 20.124 ασθενείς, όπου φάνηκε μια μικρή αύξηση του κινδύνου για πρωτο-εμφανιζόμενο διαβήτη στους ασθενείς υπό ραπαμυκίνη και ειδικά σε συνδυασμό με έναν αναστολέα καλσινευρίνης^{370, 371}. Ο μηχανισμός πρόκλησης της δυσανεξίας ίσως είναι πολυπαραγοντικός και να οφείλεται εκτός από τη μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σε διάφορα κύτταρα, σε άμεσες επιδράσεις στα β-κύτταρα και σε μείωση της κυτταρικής έκφρασης μεταφορέων γλυκόζης GLUT1-4.

10. Περίληψη και συμπεράσματα

Η ραπαμυκίνη είναι ένας ισχυρός αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ανοσοποιητικών κυττάρων και των παρεγχυματικών νεφρικών κυττάρων, γεγονός που λογικά οδήγησε την έρευνα στη μελέτη των επιδράσεών της σε ποικιλία νεφρικών παθήσεων πέραν της μεταμόσχευσης. Η αντιπολλαπλασιαστική της δράση οφείλεται στην αναστολή της μεταφοράς σήματος από υπερκείμενους ρυθμιστές [όπως οι αυξητικοί παράγοντες (υποδοχείς τυροσινικής κινάσης), κυτοκίνες (GPCRs, TNFR), οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες], σε υποκείμενες κινάσες που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση (πρωτεϊνοσύνθεση), πολλαπλασιασμό, μεταβολισμό λιπιδίων και γλυκόζης, αυτοφαγία και απόπτωση. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η ραπαμυκίνη δεν αναστέλλει αποκλειστικά το mTORC1 αλλά και διάφορα συστατικά του μονοπατιού Akt/mTOR τόσο σε επίπεδο έκφρασης όσο και σε επίπεδο ενεργοποίησης. Οι διάφοροι ιστοί ή κύτταρα παρουσιάζουν διαφόρου βαθμού ενεργοποίηση του μονοπατιού σε φυσιολογικές ή/και παθολογικές καταστάσεις, διαθέτουν δε διαφορετική ευαισθησία στη ραπαμυκίνη καθώς και μηχανισμούς διαφυγής από τη δράση της. Τέλος, το αποτέλεσμα της ραπαμυκίνης διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης καθώς φαίνεται να είναι τόσο δόσοεξαρτώμενο όσο και χρονοεξαρτώμενο.

Κατά συνέπεια, οι θεραπευτικές της επιδράσεις είναι δύσκολο να προβλεφθούν και συχνά είναι αντιφατικές τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στους ανθρώπους, γεγονός που έχει περιορίσει τον αρχικό ενθουσιασμό για τη χρήση της. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αντιθέσεις που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία οφείλονται σε διαφορές στη μεθοδολογία, σε επιλεκτική αναφορά των δεδομένων και σε σημαντικούς περιορισμούς στο σχεδιασμό των κλινικών μελετών.

Λαμβάνοντας υπόψη τις αδυναμίες αυτές, τα σημερινά δεδομένα δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περιπτώσεις όπου ο πολλαπλασιασμός των ενδογενών νεφρικών κυττάρων παίζει παθογενετικό ρόλο όπως π.χ στον καρκίνο των νεφρών, πολυκυστικά νεφρά και ενδεχομένως στο ΣΕΛ και στη μηνοειδή ΣΝΦ. Αντιθέτως η ραπαμυκίνη εμφανίζεται επιβλαβής στις περιπτώσεις που ο πολλαπλασιασμός των νεφρικών κυττάρων παίζει ρόλο στην επούλωση και ανακατασκευή του ιστού όπως π.χ στην οξεία νεφρική βλάβη αλλά και στην προχωρημένη ΧΝΝ. Στις καταστάσεις αυτές εμποδίζει την παραγωγή VEGF από τα

ποδοκύτταρα επηρεάζοντας την ομοιόσταση των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των σωληναριακών κυττάρων. Η χρήση της ραπαμυκίνης στις νεφρικές παθήσεις πέραν της μεταμόσχευσης φαίνεται προς το παρόν να εξασθενεί αλλά πολλά θα εξαρτηθούν από τα αποτελέσματα ορισμένων κλινικών μελετών που βρίσκονται σε εξέλιξη (όπως π.χ για τα πολυκυστικά νεφρά και για τη μεμβρανώδη ΣΝΦ) και από την εξέλιξη της βασικής έρευνας σχετικά με την καλύτερη κατανόηση των επιδράσεων της στη βιολογία και παθοβιολογία των κυττάρων. Είναι πιθανό οι διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάζει η ραπαμυκίνη στις διάφορες μελέτες να οφείλεται σε αυξημένη δοσολογία και λάθος στόχευση επιπέδων στο αίμα.

Ενδεχομένως τα προβλήματα αυτά να ξεπεραστούν με χαμηλότερες δόσεις²¹² ή με πιο στοχευμένες θεραπείες όπως για παράδειγμα νεότερους ειδικούς αναστολείς του mTORC1 ή mTORC2, ή με τη χρήση της νανοτεχνολογίας για τη στοχευμένη απελευθέρωση του φαρμάκου σε όργανα στόχους³⁷². Ίσως το σημαντικότερο μέχρι σήμερα επίτευγμα της ραπαμυκίνης να είναι η αποκάλυψη της βιολογικής σημασίας του μονοπατιού της mTOR και χωρίς αμφιβολία βρισκόμαστε ακόμα στο ξεκίνημα μιας νέας κατεύθυνσης για τη θεραπεία των νεφρικών παθήσεων, στην οποία κατεύθυνση έχουμε ακόμα πολλά να μάθουμε

Α. Ειδικό Μέρος

1. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε φυσιολογικά ποντίκια

1.1 Εισαγωγή. Πολυάριθμες μελέτες σε φυσιολογικά ζώα έδειξαν ότι η ραπαμυκίνη δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις στους νεφρούς (λειτουργία, αιμοδυναμική, ιστοπαθολογία)^{256-258, 373-375}. Αν και οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές ήταν μεγάλες (π.χ 25-100 mg/kg, ip) σε σχέση με αυτές που χορηγούνται στους ανθρώπους ή σε σχέση με αυτές που απαιτούνται για την πρόκληση ανοσοκαταστολής στα ζώα, ωστόσο δεν φάνηκε να προκαλεί ιδιαίτερη νεφροτοξικότητα^{256, 257}. Η τοξικότητα αυτή αφορούσε κυρίως στα νεφρικά σωληνάκια με πρόκληση ήπιας ατροφίας-ίνωσης, ενώ τα σπειράματα δεν φάνηκε γενικά να επηρεάζονται²⁶². Ακολούθως φάνηκε ότι στις δόσεις αυτές η ραπαμυκίνη ασκεί τοξικότητα σε ορισμένα είδη ζώων ενώ σε άλλα όχι. Για παράδειγμα μια ημερήσια peros δόση 2 mg/kg για 2 εβδομάδες σχετίστηκε με μείωση της κάθαρσης κρεατινίνης κατά 25% σε αρουραίους Sprague–Dawley και αυτογενώς υπερτασικούς αρουραίους, αλλά όχι σε αρουραίους Lewis²⁵⁷. Επιπρόσθετα σε αυτογενώς υπερτασικούς αρουραίους η ραπαμυκίνη δεν επιδείνωσε τη νεφρική λειτουργία όταν χορηγήθηκε σε θεραπευτικές δόσεις για 2 εβδομάδες, αλλά σε μεγαλύτερες δόσεις επιτάχυνε τις νεφρικές βλάβες που παρατηρούνται στο πειραματικό αυτό πρότυπο, όπως η νεκρωτική αγγειοπάθεια και η σωληναριακή ατροφία³⁷⁶. Σε μελέτη μικροπαρακέντησης σε αρουραίους Wistar–Munich, μια απλή έγχυση ραπαμυκίνης σε δόση 5 mg/kg, μείωσε το ρυθμό σπειραματικής διήθησης του απομονωμένου νεφρώνα (snGFR) κατά 26% λόγω αύξησης της αντίστασης τόσο στο προσαγωγό όσο και στο απαγωγό αρτηρίδιο, η οποία αποκαθίσταται εν μέρει με χορήγηση L-αργινίνης²⁶¹. Αντίθετα σε γουρούνια, μια ενδοφλέβια έγχυση ραπαμυκίνης σε δόση 0.4 mg/kg προκάλεσε ήπια αύξηση (περίπου 10%) του GFR και της νεφρικής ροής πλάσματος²⁵⁹. Επίσης σε κουνέλια η χορήγηση ραπαμυκίνης για 60 μέρες δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αιμοδυναμική του σπειράματος ή στην αρτηριακή πίεση αλλά προκάλεσε ήπια σωληναριακή ατροφία και ίνωση²⁶². Ακολούθως φάνηκε ότι μπορεί να προκαλέσει ποικίλες μεταβολές στη νεφρική λειτουργία σε αρουραίους

Sprague–Dawley ανάλογα με την οδό και τη διάρκεια χορήγησης χωρίς να προκαλεί όμως ιδιαίτερες μορφολογικές βλάβες²⁶⁰.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία από τις προαναφερόμενες μελέτες δεν έγινε εξέταση της δομής και της μορφολογίας των κυττάρων του σπειραματικού ηθμού σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Έκτοτε, άρχισαν να συσσωρεύονται δεδομένα από μελέτες σε ανθρώπους που έδειχναν ότι η ραπαμυκίνη μπορεί πράγματι να προκαλέσει νεφροτοξικότητα κυρίως υπό τη μορφή της πρωτεϊνουρίας^{175, 178, 352-354, 356, 359, 363} ή/και επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας όταν προϋπάρχει σημαντική πρωτεϊνουρία ή μειωμένος GFR (κάτω από 40 ml/min/1.73 m²)^{178, 350}. De novo πρωτεϊνουρία και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση εμφανίζεται στο 5%-30% περίπου των μεταμοσχευμένων ασθενών που λαμβάνουν ραπαμυκίνη^{170, 245}. Επίσης διάφορες μελέτες σε πειραματικά πρότυπα σε πάσχοντες νεφρούς έχουν δείξει άλλοτε ευνοϊκά^{212, 231, 311, 314, 315, 317, 331-333, 335, 337, 338, 377} και άλλοτε δυσμενή αποτελέσματα^{303, 310, 336} μετά από θεραπεία με ραπαμυκίνη. Τα αρνητικά αποτελέσματα συχνά σχετίστηκαν είτε με τη δόση είτε με την περίοδο-διάρκεια στην οποία χορηγήθηκε η ραπαμυκίνη^{212, 303, 310, 311, 322}.

Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης πρωτεϊνουρίας σε ανθρώπους μετά από τη χορήγηση ραπαμυκίνης και τα αντιφατικά αποτελέσματα των πειραματικών μελετών, μας αναγκάζει να επιστρέψουμε πίσω σε ζωικά μοντέλα και να δούμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τις επιδράσεις της, ειδικά στα ποδοκύτταρα, σε βιοχημικό-μοριακό και υπερμικροσκοπικό επίπεδο.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινίσει 1) αν η ραπαμυκίνη ασκεί νεφροτοξική δράση είτε με την έννοια της νεφρικής λειτουργίας είτε με την έννοια της πρωτεϊνουρίας σε φυσιολογικά ποντίκια Balb/c, 2) αν η νεφροτοξικότητα αφορά στα σωληνάρια ή στα σπειράματα, 3) αν είναι δοσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη, 4) ποιά είναι η επίδρασή της σε σημαντικές πρωτεΐνες των ποδοκυττάρων όπως η νεφρίνη και ποδοσίνη, που είναι απαραίτητες για την ακεραιότητα του σπειραματικού ηθμού, τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνικής όσο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

1.2 Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήσαμε 26 φυσιολογικά ποντίκια Balb/c ηλικίας 2 μηνών, στα οποία χορηγήσαμε ενδοπεριτοναϊκά ραπαμυκίνη σε 3 διαφορετικές δόσεις για 1 εβδομάδα (μοντέλο δόσης, ΜΔ) ή μια ενδιάμεση δόση ραπαμυκίνης για 3 διαφορετικά χρονικά διαστήματα (μοντέλο χρόνου, ΜΧ). Σε 6 ποντίκια χορηγήθηκε μόνο το έκδοχο (DMSO) στο οποίο ήταν διαλυμένη η ραπαμυκίνη και τα ποντίκια αυτά απετέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Η ραπαμυκίνη αγοράστηκε από τα LC Laboratories, MA, USA. Τα ποντίκια αγοράστηκαν από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας της Ελλάδος και τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με τη κείμενη ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Στο ΜΔ η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε σε δόσεις α) χαμηλή δόση (ΧΔ): 1 mg/kg/24ώρες, β) ενδιάμεση δόση (ΕΔ): 3 mg/kg/48ώρες (ισοδύναμη με 1,5 mg/kg/24ώρες) και γ) υψηλή δόση (ΥΔ): 3 mg/kg/24ώρες. Σε κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκαν 4 ποντίκια.

Στο ΜΧ η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε σε μία ενδιάμεση δόση 3 mg/kg/48ώρες (ισοδύναμη με 1,5 mg/kg/24ώρες) για διάστημα 1, 4 ή 8 εβδομάδων (ομάδες σύντομης (ΣυΧ), ενδιάμεσης (ΕνΧ) και μακροχρόνιας χορήγησης (ΜαΧ) αντίστοιχα, 4 ποντίκια σε κάθε ομάδα).

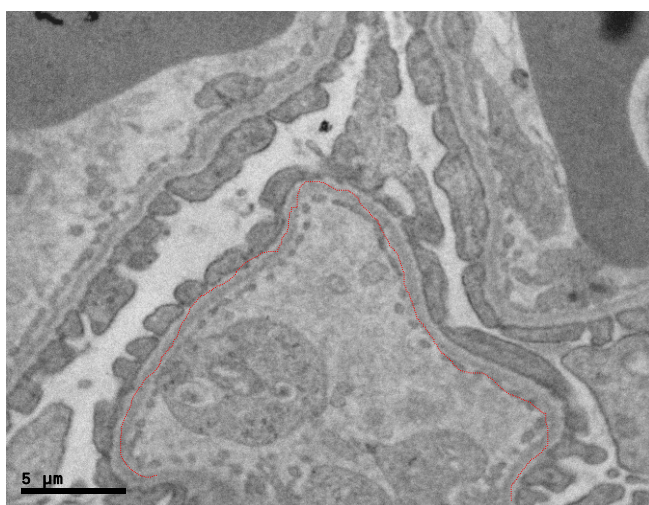
Στα ποντίκια μετρήθηκε το σωματικό βάρος και η πρωτεϊνουρία στην αρχή του πειράματος και ανά εβδομάδα μέχρι να θυσιαστούν. Η μέτρηση της πρωτεϊνουρίας έγινε σε φασματοφωτόμετρο με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) σε δείγμα ούρων 1μL από συλλογή ούρων 24ώρου. Η μετρούμενη οπτική πυκνότητα (OD) σε μήκος κύματος 590 μετατρέπεται σε συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ σε μg/ml) μετά από αναγωγή σε πρότυπη καμπύλη, βασισμένη σε γνωστές συγκεντρώσεις βόειου αλβουμίνης (BSA) με βάση την εξίσωση $ΟΠ = (OD - 0,0232) / 0,0558$. Πολλαπλασιάζοντας επί το συνολικό όγκο των ούρων 24ώρου (σε μL), η μετρούμενη συγκέντρωση λευκωμάτων, παρείχε τη συνολική λευκωματουρία σε μg/ημέρα. Η συλλογή ούρων 24ώρου γινόταν σε μεταβολικά κλουβιά στα οποία τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ζώα ευρίσκοντο σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με επαρκή αερισμό (35m³/ώρα), σταθερή θερμοκρασία (25 βαθμούς κελσίου) και αυτόματες συνθήκες φωτισμού (κύκλος 12 ωρών σε σκοτάδι και σε φως).

Η θυσία γινόταν μετά από ύπνωση του ζώου σε ειδικό γυάλινο δοχείο με τη χρήση ισοφλουρανίου και ακολούθως με τη διενέργεια απεγκεφαλισμού. Κατά τη θυσία γινόταν λήψη αίματος με παρακέντηση της καρδιάς για μέτρηση κρεατινίνης και επιπέδων ραπαμυκίνης. Τα επίπεδα ραπαμυκίνης μετρήθηκαν με ELISA σε ολικό αίμα σε αναλυτή Imx Analyzer, Abbott, USA και η κρεατινίνη με μέτρηση ρουτίνας σε αυτόματο αναλυτή Olympus, Tokyo, Japan.

Ακολουθούσε η αφαίρεση και το ζύγισμα των οργάνων (ήπαρ, σπλήνας, νεφρά, καρδιά). Τα όργανα τοποθετούνταν άμεσα σε 2 τριβλία Petri με 5 ml PBS 1x σε πάγο για ζύγισμα και περαιτέρω χειρισμούς. Μετά την αφαίρεση της κάψας τα νεφρά διατέμονταν κατά τον επιμήκη (μετωπιαίο) άξονα και στη συνέχεια αφαιρούνταν η πύελος και από τους δύο νεφρούς ενώ από το δεξιό αφαιρούνταν επιπρόσθετα και η μυελώδης μοίρα.

Ο αριστερός νεφρός τεμαχίζονταν περαιτέρω σε 6 συνολικά τμήματα: 3 τμήματα χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες ανοσοφθορισμού, 1 τμήμα για φωτονικό μικροσκόπιο, 1 για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και 1 για μελέτες ανοσοχρυσού. Τα κομμάτια για ανοσοφθορισμό εμβαπτίζονταν σε σταγόνες OCT (Sakura Finetek USA) πάνω σε ταινίες προσροφητικού χαρτιού Watmann και καταψύχονταν ταχέως σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε σωληνάρια Koning και αποθηκεύονταν στους -80 °C μέχρι τη διενέργεια του ανοσοφθορισμού. Το τεμάχιο που προοριζόταν για *οπτικό μικροσκόπιο* τοποθετούνταν σε ουδέτερη φορμόλη 10% και αποστέλλονταν σε νεφροπαθολογοανατόμο για έγκλειση σε παραφίνη και χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και περιοδικού οξέως (PAS). Το τεμάχιο που προοριζόταν για *ηλεκτρονικό μικροσκόπιο* τοποθετούνταν σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης 5% v/v σε 0.1M phosphate buffer και αποστέλλονταν στο εργαστήριο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για έγκληση. Η διαδικασία της έγκλησης περιλαμβάνει την περαιτέρω μονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου για 1 ώρα, αφυδάτωση του ιστού σε διαδοχικές αραιώσεις αιθανόλης και έγκληση σε ρητίνη Epon 812. Στη συνέχεια με τη χρήση μικροτόμου κόβονταν πολύ λεπτές τομές (40-50nm) οι οποίες τοποθετούνταν σε δίσκους πλέγματος χρυσού και βάφονταν με οξεικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο. Η εξέταση των τομών γινόταν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JEM 100 CX-II; JEOL, Tokyo Japan. Τουλάχιστον 10 σπειράματα εξετάστηκαν ανά ζώο. Οι μικροφωτογραφίες ελήφθησαν με ψηφιακή

κάμερα ES1000W Erlangshen και αναλύθηκαν με το λογισμικό Digital-Micrograph software (Gatan GmbH, Munchen, Germany). Με τη χρήση του λογισμικού αυτού μετρούνταν το μήκος της βασικής μεμβράνης (BM) όλων των ανοικτών τριχοειδικών αγκυλών των σπειραμάτων (loop length, LL) καθώς και ο ακριβής αριθμός των ποδικών εκβλαστήσεων (FPN) που επικάλυπταν τη βασική μεμβράνη των αγκυλών (Εικόνα 19). Το πάχος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) σε κάθε τριχοειδή αγκύλη υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: $FPW = (\pi/4 \times LL) / FPN$, όπου το $\pi/4$ διορθώνει για την ταχεία διακύμανση της γωνίας τομής σε σχέση με τον κάθετο άξονα των ποδίσκων³⁷⁸.



Εικόνα 19: μέτρηση του μήκους της BM σε τριχοειδή αγκύλη (κόκκινη γραμμή, loop length, LL) καθώς και του αριθμού των ποδικών εκβλαστήσεων (FPN) που επικαλύπτουν το μήκος αυτό. Το πάχος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$FPW = (\pi/4 \times LL) / FPN$$

Για τον ανοσοφθορισμό (ΑΦ) ο παγωμένος ιστός κοβόταν σε λεπτές τομές πάχους 5 μm σε κρυτόμο (στους -20 βαθμούς Κελσίου) και οι τομές τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να ακολουθήσει μονιμοποίηση σε 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS 1X, pH=7.4 για 13 λεπτά. Ακολουθούσε επώαση με Triton X100 σε 0.1% PBS 1X, παρεμπόδιση μη ειδικής σύνδεσης (blocking) με BSA 5% και επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον ΑΦ ήταν έναντι αντιγόνων ποντικίου και συγκεκριμένα **1)** από χοιρίδιο Γουινέας έναντι νεφρίνης σε αραιώση 1:250, από Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany, **2)** από κουνέλι έναντι ποδοσίνης σε αραιώση 1:500, από Abcam, UK, **3)** από κουνέλι έναντι Ser473 p-Akt σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling, **4)** από κουνέλι έναντι ολικής Akt σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling,

Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα κασίικας έναντι κουνελιού ή χοιριδίου Γουνέας ή αρουραίου: Alexa Fluor 488 και 555, Molecular Probes, Invitrogen CA. Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονταν με το υλικό mowiol 4-88 (Calbiochem) και καλυπτρίδα. Τουλάχιστον 20 σπειράματα εξετάστηκαν ανά ζώο με τη χρήση ενός μικροσκοπίου φθορισμού Nikon εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα. Η ένταση του φθορισμού βαθμολογήθηκε σε μια κλίμακα από 0 έως 3+, όπου 0 = απουσία φθορισμού, 1+ = ήπιος, 2+ = μέτριος και 3+=ισχυρός φθορισμός.

Ο **δεξιός νεφρός**, μετά την αφαίρεση της κάψας, της πυέλου και της μυελώδους μοίρας υφίστατο επεξεργασία α) σε διάλυμα RIPA με αναστολείς πρωτεασών για απομόνωση πρωτεϊνών και μέτρηση με Western Blot και β) σε διάλυμα trizol για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων και μέτρηση mRNA με RT-PCR.

Το RIPA-buffer περιείχε 100mM HEPES, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10% v/v glycerol, 100mM NaF, 10mM Sodium Pyrophosphate, 0.5% w/v sodium deoxycholate, 1% v/v NP-40. Στο διάλυμα αυτό προσθέτονταν οι αναστολείς πρωτεασών (ανά ml διαλύματος RIPA): 10μl PMSF 1mM, 5μl Orthovanadate 1mM, 2.5μl Leupeptin 25mg/ml, 5μl Aprotinin 5 mg/ml. Περίπου 40mg νεφρικού ιστού ομογενοποιούνταν σε 1ml RIPA-buffer με αναστολείς πρωτεασών σε ειδικό γυάλινο γουδί. Ακολουθούσε διήθηση του ομογενοποιημένου ιστού από ηθμό για τη συγκράτηση ινωδών και μη ομογενοποιημένων ρακών, φυγοκέντρηση του διηθήματος στα 14000g, μέτρηση συνολικής περιεχόμενης πρωτεΐνης και αποθήκευση κλασμάτων (aliquots) των 40μg από το υπερκείμενο στους -80 °C μέχρι να γίνουν οι αναλύσεις western blot.

Για τη *western blot* δείγματα των 40μg ολικής πρωτεΐνης σε RIPA, βράζονταν για 5 λεπτά στους 100°C σε αναγωγικό διάλυμα φόρτωσης αποτελούμενο από 50mM Tris-Cl [pH 6.8], 2% w/v SDS, 0.1% w/v bromophenol blue, 10% v/v glycerol, 5% v/v β-mercaptoethanol) και στη συνέχεια γινόταν ηλεκτροφόρηση σε γέλη 7.5% SDS-polyacrylamide και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schlacher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany). Ακολουθούσε η διαδικασία παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης (blocking) για 1 ώρα με γάλα 5% χαμηλό σε λιπαρά σε 0.05%

Tween20-TBS και επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα καθόλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια πρωτογενή αντισώματα όπως και στον ΑΦ και συγκεκριμένα έναντι νεφρίνης (1:500), ποδοσίνης (1:500), Ser473pAkt (1:500), Akt (1:500), και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ακτίνης (1:3000) από Chemicon International, USA&CA για ομαλοποίηση των τιμών. Ακολούθως γινόταν ξέπλυμα των μεμβρανών 3 φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 0.05% Tween-20 σε TBS τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή του κατάλληλου δευτερογενούς κεκαθαρμένου αντισώματος συζευγμένου με περοξειδάση (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Οι μεμβράνες υποβάλλονταν σε αυτοραδιογραφία για διάστημα από 1/2 έως 5 λεπτά. Οι πρωτεϊνικές μπάντες μετρήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος πυκνομέτρησης ImageJ (διαθέσιμο στη διεύθυνση <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) και οι τιμές ομαλοποιήθηκαν βάση των αντίστοιχων μετρήσεων για την ακτίνη.

Ποσοτική, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative RT-PCR): ένα από τα τμήματα του δεξιού νεφρού χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή ολικού RNA με τη χρήση της μεθόδου Chomeczynski δηλαδή διαχωρισμού ολικού RNA σε υδατική φάση με θειοκυανικό γουανίδιο, φαινόλη και χλωροφόρμιο (Trizol Reagent, Life Technologies; Gibco BRL, Paisley, UK). Μετά το διαχωρισμό 1μg ολικού RNA μεταγράφηκε ανάστροφα (SUPERSRIPT II;Gibco) και πολλαπλασιάστηκε με PCR (RT-PCR). Τα προϊόντα της PCR ομαλοποιήθηκαν με βάση την έκφραση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης (Gardh). Όλες οι μετρήσεις έγιναν στη συσκευή για RT-PCR ABI Prism 7000 System (Applied Biosystems; Foster City, California, USA). Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε iTaq SYBR Green Supermix με ROX (Bio-Rad). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta C_t$ και όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 1.

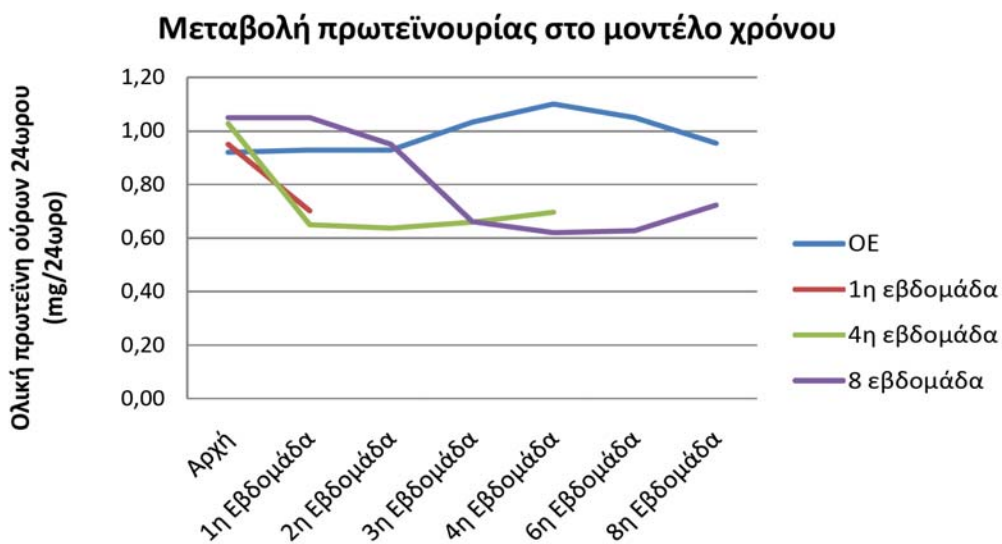
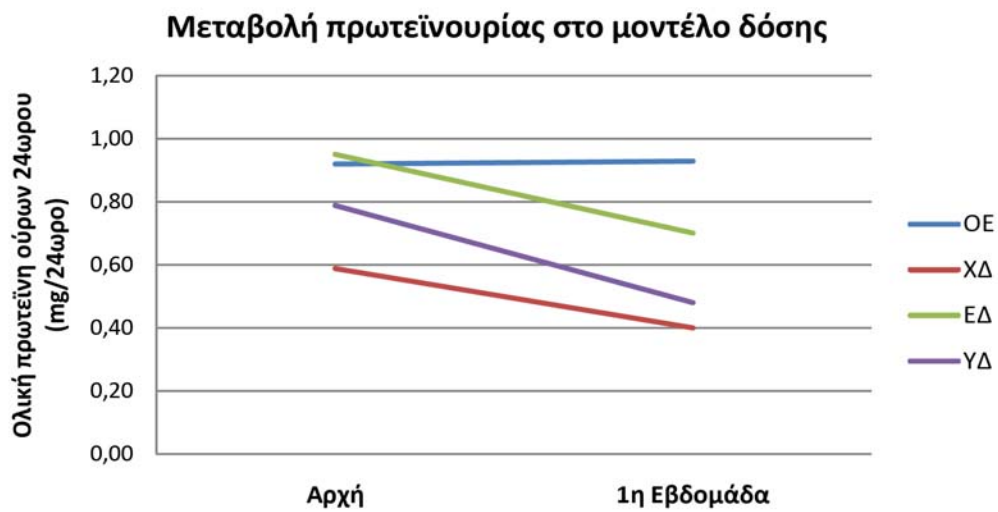
Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια νεφρίνης (Nphs1), ποδοσίνης (Nphs2) και GAPDH που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
Nphs1	Forward	5'- GCGAGGCACTTCGTGAAAC -3'	80 bp
	Reverse	5'- CACTTGCTCTCCCAGGAAC -3'	
Nphs2	Forward	5'- GTGTCCAAAGCCATCCAGTT -3'	117 bp
	Reverse	5'- GGCAACCTTTACATCTTGGG -3'	
Gapdh	Forward	5'- AATGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'	84 bp
	Reverse	5'- GATGCCTGCTTCACCACCTTCT -3'	

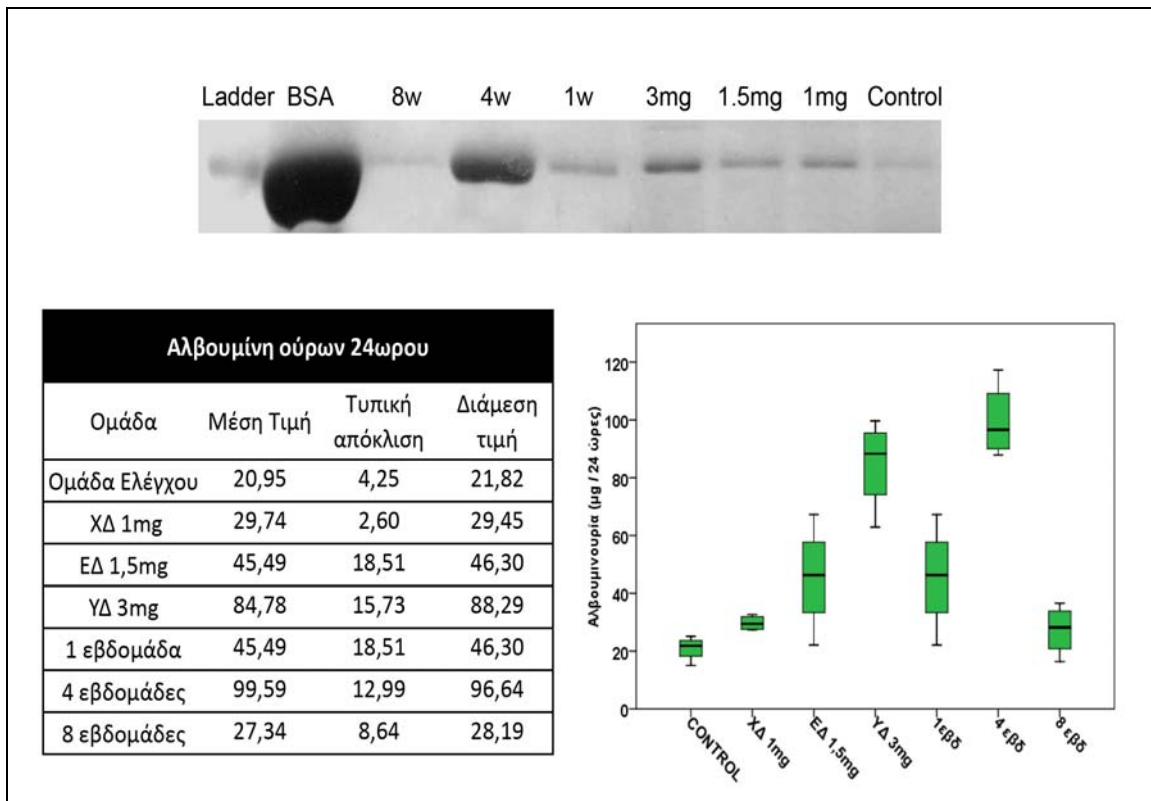
Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS/PC 17. Συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD). Η δοκιμασία μονού δείγματος Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ύπαρξης ή όχι κανονικής κατανομής στα δεδομένα. Ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) με post hoc διόρθωση κατά Dunnett, χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση συνεχών μεταβλητών. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $P < 0.05$ (διπλής ουράς).

1.3 Αποτελέσματα

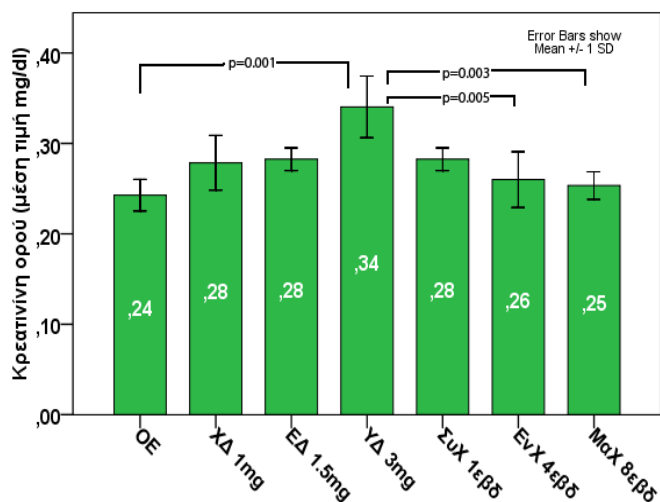
Κατά τη διάρκεια της μελέτης όλα τα ζώα που έλαβαν ραπαμυκίνη παρουσίασαν μείωση της συνολικής αποβολής πρωτεΐνης στα ούρα 24ώρου (Εικόνα 20). Η απέκκριση όμως της αλβουμίνης στα ούρα 24ωρου αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) στις ομάδες ΥΔ και ΕνΧ (Εικόνα 21). Η τιμή της κρεατινίνης παρουσίασε μικρή μη στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλες τις ομάδες που έλαβαν ραπαμυκίνη αλλά στην ομάδα της υψηλής δόσης η νεφρική λειτουργία επιδεινώθηκε στατιστικώς σημαντικά (Cr: 0.34 ± 0.03 vs. 0.24 ± 0.01 mg/dl στην ομάδα ελέγχου, $p = 0.001$, Εικόνα 22).



Εικόνα 20. Μεταβολή της πρωτεΐνης ούρων 24ώρου στο μοντέλο δόσης και στο μοντέλο χρόνου. Η πρωτεΐνη ούρων 24ώρου μειώθηκε σε όλες τις ομάδες που έλαβαν ραπαμυκίνη ανεξαρτήτως δόσης ή χρόνου χορήγησης ενώ στην ομάδα ελέγχου παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε όλο το διάστημα παρακολούθησης. Στο μοντέλο χρόνου μετά την αρχική πτώση, παρατηρείται σταθεροποίηση της πρωτεϊνουρίας από την 3η-4η εβδομάδα και μετά.

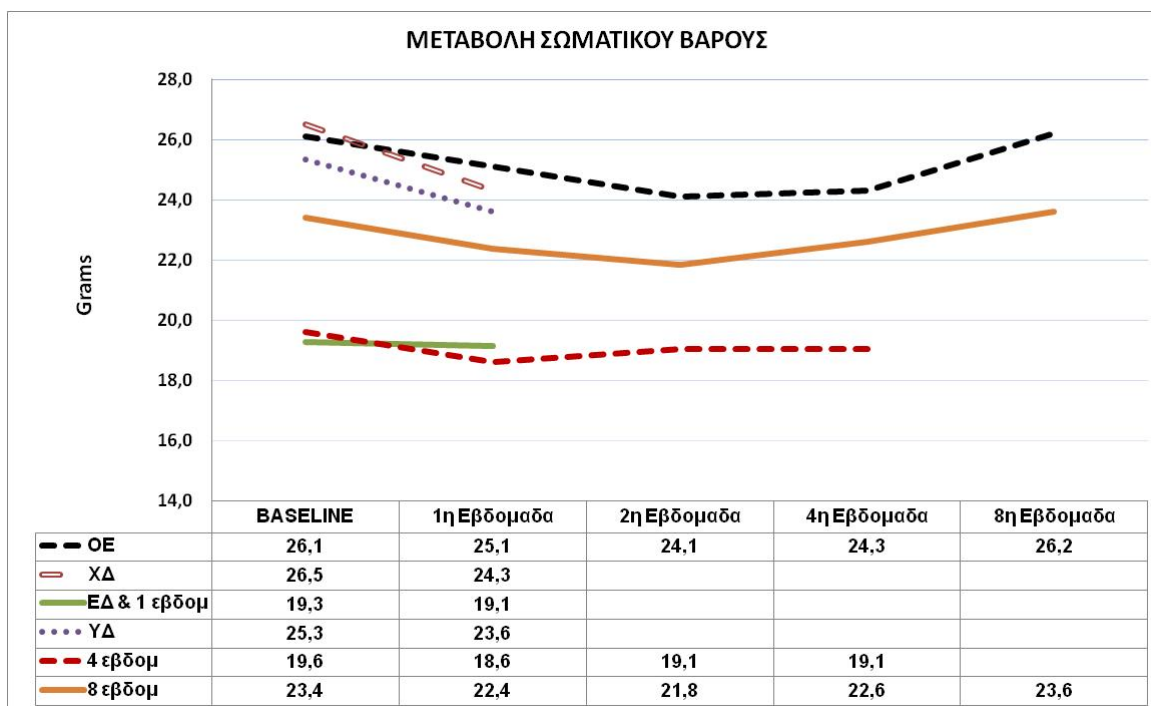


Εικόνα 21. Μεταβολή της αλβουμίνης ούρων 24ώρου στο μοντέλο δόσης και στο μοντέλο χρόνου. Η αλβουμινουρία αυξήθηκε στις ομάδες της ΥΔ και ΕνΧ ραπαμυκίνης.



Εικόνα 22. Μέση τιμή κρεατινίνης ορού στις διάφορες ομάδες. Στην ομάδα της ΥΔ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της τιμής της κρεατινίνης ορού. * $p=0,001$

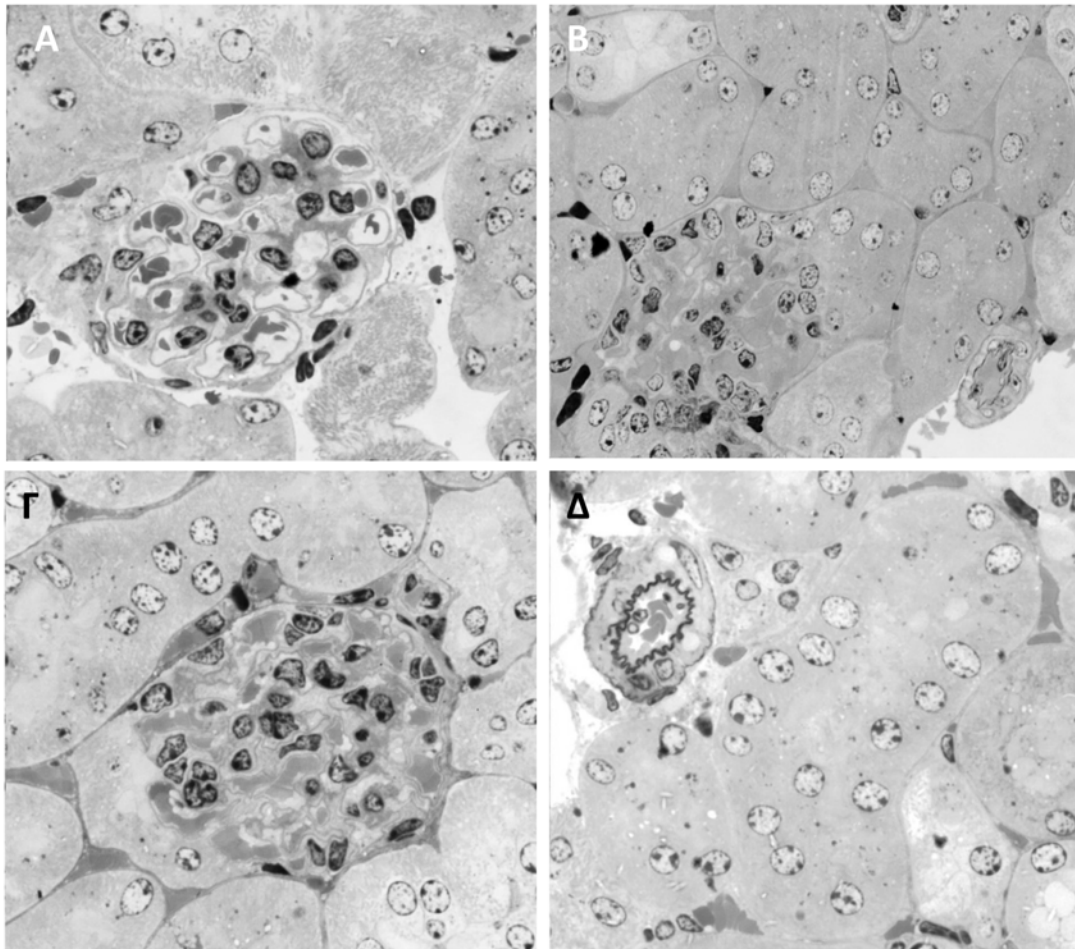
Το σωματικό τους βάρος παρουσίασε μείωση σε όλα τα ζώα (ακόμα και στην ΟΕ) κατά την 1^η και 2^η εβδομάδα χορηγήσεων και σταδιακά ανέκαμψε την 4^η και 8^η εβδομάδα, στα ποντίκια που έλαβαν ραπαμυκίνη για το διάστημα αυτό (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Μεταβολή του σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια της μελέτης. Αναφέρονται οι μέσες τιμές.

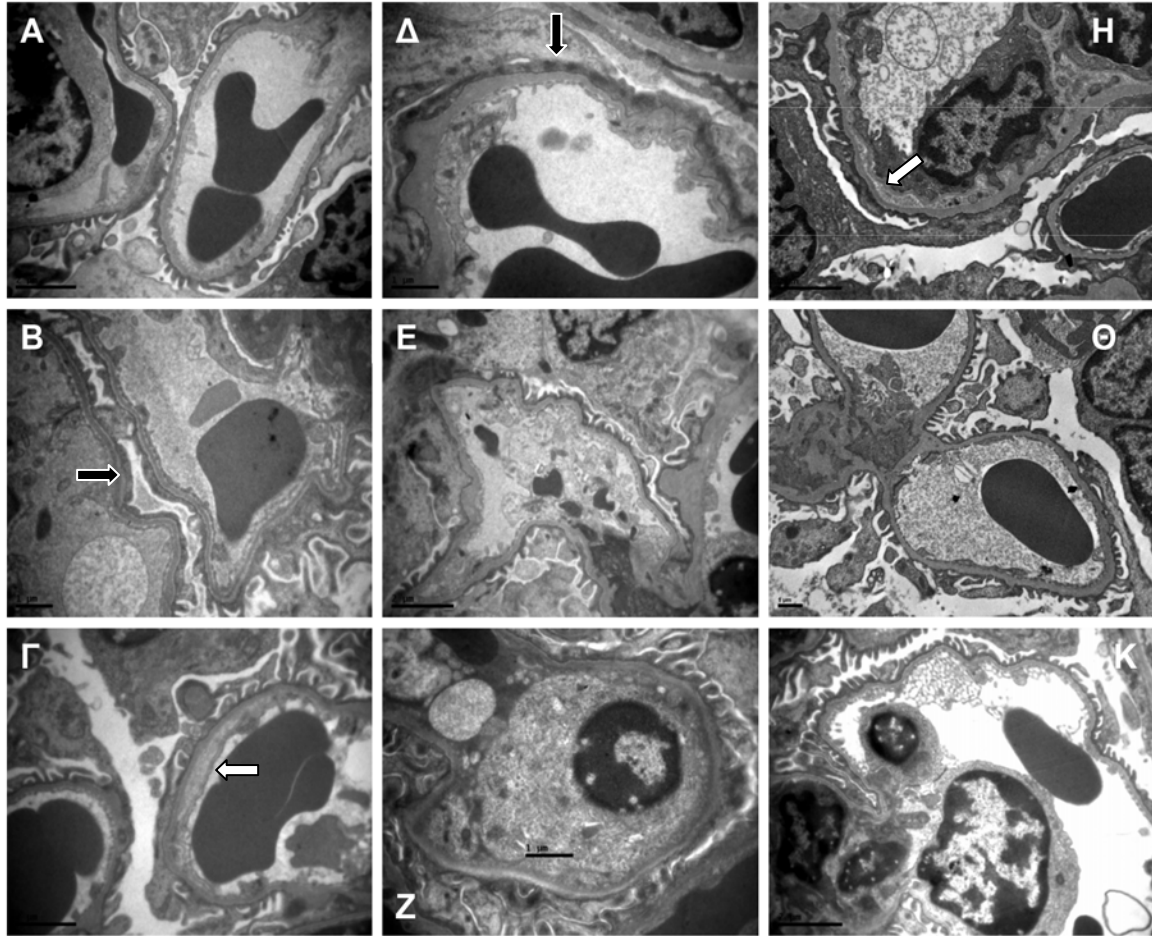
Παρατηρήθηκε επίσης σημαντική ($p=0,001$) μείωση της ποσότητας ούρων 24ωρου στην ομάδα υψηλής δόσης (YΔ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (OE) ($0,1\pm 0,02$ ml και $0,5\pm 0,2$ ml αντίστοιχα). Οι υπόλοιπες ομάδες παρουσίασαν επίσης μείωση της διούρησης έναντι της OE αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα μέσα κατώτερα επίπεδα ραπαμυκίνης στο αίμα των ποντικιών κυμαινόταν από 30 ng/ml στην ομάδα της χαμηλής δόσης (XD) έως τα 150 ng/ml στην ομάδα της YΔ.

Στο φωτονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 24) δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες παθολογικές μεταβολές σε καμία ομάδα.



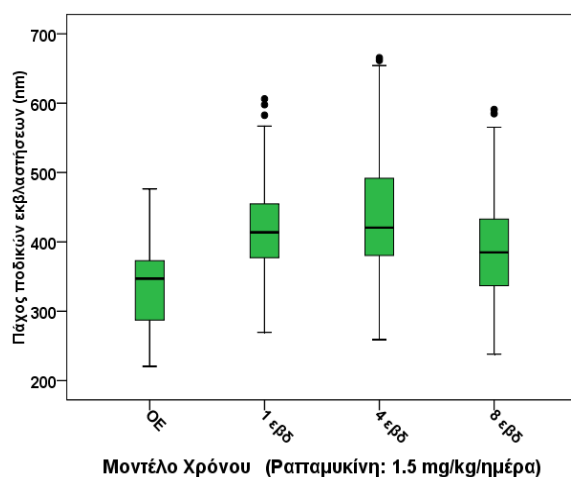
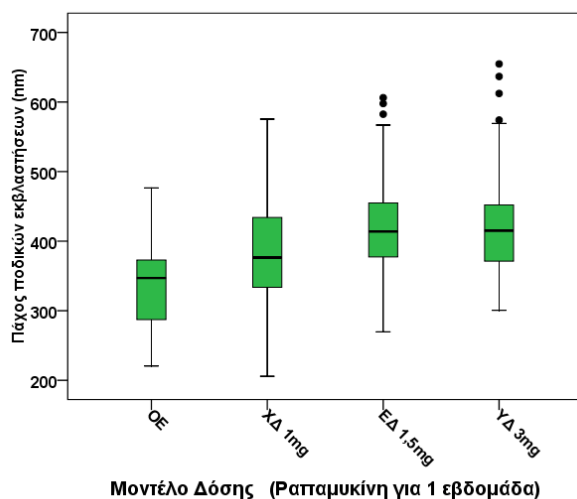
Εικόνα 24. Φωτονικό μικροσκόπιο. Χρώση με κυανό του μεθυλενίου σε τομή πάχους 1μm. A και B: εικόνες από ομάδα υψηλής δόσης (ΥΔ). Απουσία αλλοιώσεων τόσο στα σπειράματα (A, 400X) όσο και στα σωληνάκια (B, 200X). Δεν υπήρξε ουσιαστική διαφορά με την ομάδα ελέγχου (Γ και Δ).

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε αύξηση της μεσαγγείου ουσίας στην ομάδα της ΥΔ και διαφόρου βαθμού τμηματική τήξη ποδικών εκβλαστήσεων σε όλες τις ομάδες που έλαβαν ραπαμυκίνη (Εικόνα 25 Α,Β,Γ,Δ μαύρα βέλη). Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε διόγκωση-οίδημα των ποδοκυττάρων με σχεδόν πλήρη κατάληψη του ουρικού χώρου (Εικόνα 25 Ε) και σπανιότερα οίδημα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 25 Ζ), απώλεια των θυρίδων και αραιό πρωτεϊνικό υλικό υπο-ενδοθηλιακά (Εικόνα 25 Γ&Η, λευκά βέλη). Η ομάδα της ΧΔ παρουσίασε πολύ ήπιες βλάβες και σε ελάχιστα σπειράματα. Οι ομάδες της ΥΔ και ΕνΧ παρουσίασαν τις σημαντικότερες βλάβες οι οποίες όμως δεν αφορούσαν στο σύνολο των σπειραμάτων αλλά ήταν εστιακές.



Εικόνα 25. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. *A)* από ομάδα *XΔ*, παρατηρείται εστιακή τήξη ποδικών εκβλαστήσεων σε ελάχιστες αγκύλες, *B)* από ομάδα *ΕΔ*, παρατηρείται επίσης εστιακή τήξη ποδικών εκβλαστήσεων (μαύρο βέλος), *Γ)* από ομάδα *XΔ*, αραιό υλικό υπενδοθηλιακά ενδεικτικό εναπόθεσης πρωτεϊνών του πλάσματος (λευκό βέλος), *Δ)* από ομάδα *ΥΔ*, πλήρης τήξη ποδίσκων (μαύρο βέλος), *Ε)* από ομάδα *ΥΔ* οίδημα ποδοκυττάρων και κατάληψη ουρικού χώρου, *Ζ)* από ομάδα *ΥΔ*, οίδημα ενδοθηλιακών κυττάρων και απώλεια θυρίδων, *Η)* Από ομάδα *ΕΔ*, αραιό υλικό υπενδοθηλιακά (λευκό βέλος), *Θ)* Από ομάδα *ΜαΧ*, απουσία αλλοιώσεων, *Κ)* από ομάδα ελέγχου, απουσία αλλοιώσεων.

Παρά τις σχετικά ήπιες και εστιακές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο ΗΜ, η στατιστική ανάλυση την πρώτη εβδομάδα χορήγησης στο μοντέλο δόσης έδειξε μία σημαντική αύξηση του μέσου πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) (**OE 335nm, XΔ 385nm, ΕΔ 420nm, ΥΔ 423nm**). Η πάχυνση αυτή φάνηκε να αυξάνεται περαιτέρω στις 4 εβδομάδες χορήγησης (**EvX 456nm**) και να βελτιώνεται στις 8 εβδομάδες (**ΜαΧ 401nm**) (Εικόνα 26). Συνολικά μετρήθηκαν 750 τριχοειδικές αγκύλες με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω.



Ομάδα	Μέση τιμή	SD	Διάμεση τιμή	p
OE	336	59,8	347	
XΔ	385	77,5	376	,002
EΔ	420	65,4	414	,000
YΔ	423	73,9	415	,000
1 εβδο	420	65,4	413	,000
4 εβδο	456	145,4	420	,000
8 εβδο	401	91,3	385	,001

Εικόνα 26. Πάχος ποδικών εκβλαστήσεων. Απεικονίζεται η διάμεση τιμή, IQR και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

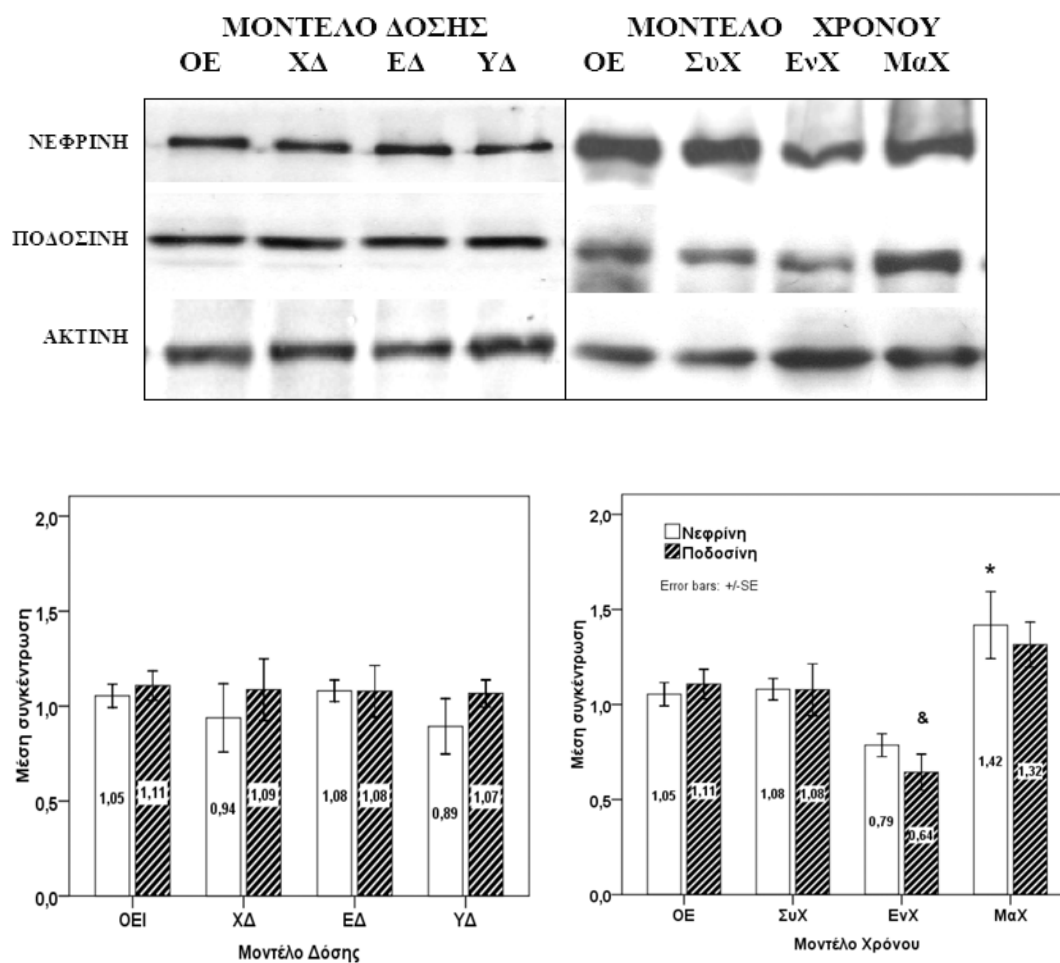
Παρατηρούμε σημαντική αύξηση του πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση.

Στο μοντέλο χρόνου με σταθερή δόση ραπαμυκίνης η πάχυνση που παρατηρείται ήδη από την 1^η εβδομάδα χορήγησης αυξάνεται περαιτέρω στις 4 εβδομάδες και βελτιώνεται στις 8 εβδομάδες.

Οι μέσες και διάμεσες τιμές για τις διάφορες ομάδες φαίνονται στον πίνακα. Οι τιμές σημαντικότητας (p) αφορούν την κάθε ομάδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων νεφρίνης και ποδοσίνης με Western Blot δεν έδειξε καμία διαφορά ανάμεσα στις διάφορες ομάδες στο μοντέλο δόσης τόσο για τη νεφρίνη όσο και για την ποδοσίνη (Εικόνα 27). Στο μοντέλο χρόνου παρατηρούμε πτώση των τιμών στις 4 εβδομάδες (στατιστικά σημαντική για την ποδοσίνη,

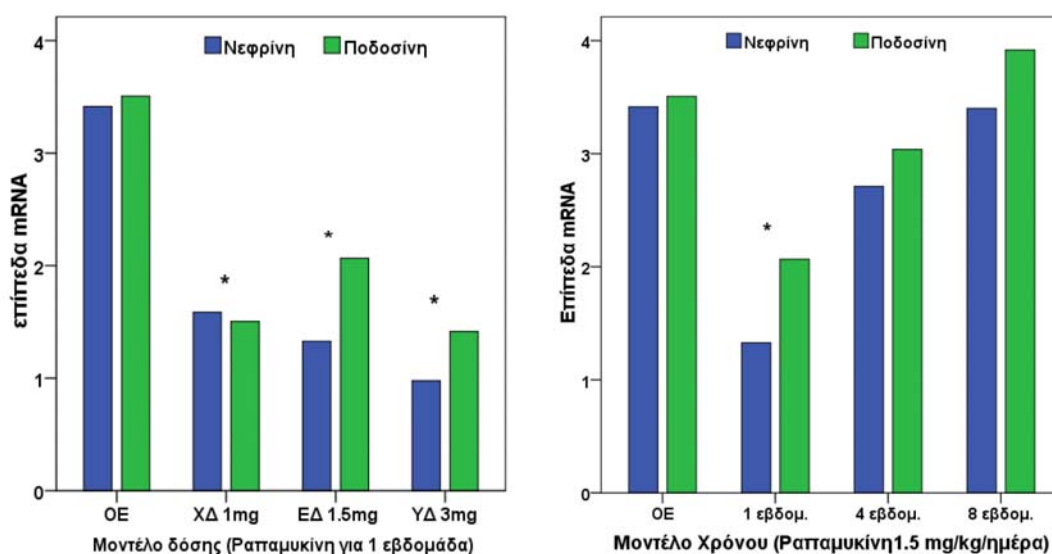
$p=0.007$) ενώ στις 8 εβδομάδες παρατηρούμε άνοδο των τιμών (στατιστικά σημαντική για την νεφρίνη, $p=0.03$)



Εικόνα 27. Πάνω: Ανάλυση Blot της νεφρίνης, ποδοσίνης και ολική ακτίνης στο μοντέλο δόσης και στο μοντέλο χρόνου. Κάτω: Μέση τιμή της πρωτεϊνικής έκφρασης νεφρίνης και ποδοσίνης (προσαρμογή ως προς ακτίνη) από 3 πειράματα. Στο μοντέλο δόσης δεν υπάρχει καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Στο μοντέλο χρόνου παρατηρούμε πτώση των τιμών στις 4 εβδομάδες (στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για την ποδοσίνη, $p=0.007$) ενώ στις 8 εβδομάδες παρατηρούμε άνοδο των τιμών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (στατιστικά σημαντική για την νεφρίνη, $p=0.03$)

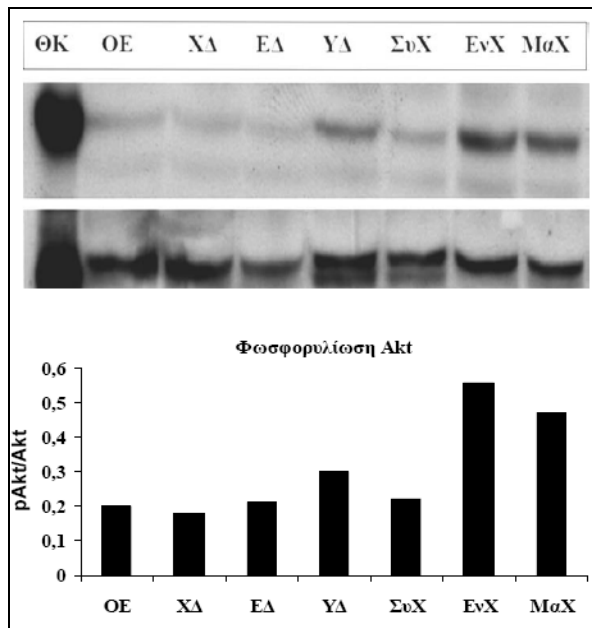
Η μέτρηση σε απομονωμένο ολικό RNA με RT-PCR έδειξε σημαντική ($p=0.01$) μείωση του mRNA της νεφρίνης και της ποδοσίνης (κατά 40-65%) κατά την οξεία

χορήγηση ραπαμκίνης (1^η εβδομάδα) χωρίς ιδιαίτερη εξάρτηση από τη χορηγούμενη δόση (Εικόνα 28). Η μείωση της γονιδιακής έκφρασης ήδη από την 1^η εβδομάδα, προηγείται επομένως της μείωσης της πρωτεϊνικής έκφρασης, η οποία παρατηρείται λίγο αργότερα (4^η εβδομάδα). Η μείωση της γονιδιακής έκφρασης αμβλύνεται στις 4 εβδομάδες (οπότε και το ναδίρ της πρωτεϊνικής έκφρασης) και αποκαθίσταται πλήρως στις 8 εβδομάδες παράλληλα με την αποκατάσταση της πρωτεϊνικής έκφρασης.



Εικόνα 28. Επίδραση της ραπαμκίνης στη γονιδιακή έκφραση της νεφρίνης και ποδοσίνης. Η μέτρηση με RT-PCR έδειξε σημαντική (40-65%) μείωση του mRNA της νεφρίνης και της ποδοσίνης κατά την οξεία χορήγηση ραπαμκίνης (1^η εβδομάδα) χωρίς ιδιαίτερη εξάρτηση από τη χορηγούμενη δόση (XD, ED, YD). Η μείωση της γονιδιακής έκφρασης αμβλύνεται στις 4 εβδομάδες (EnX) και αποκαθίσταται στις 8 εβδομάδες χορήγησης (MaX).

Ο βαθμός φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt παρουσίασε ήπια αύξηση στην ομάδα της YD και σημαντική αύξηση (2.5 φορές) στις ομάδες EnX και MaX (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Χαρακτηριστικά *Western Blots* για την *Ser473pAkt* (πάνω σειρά) και την ολική *Akt* (κάτω σειρά). Η φωσφορυλίωση της *Akt* παρουσιάζει αύξηση στις ομάδες *ΥΔ*, *ΕνΧ* και *ΜαΧ*. *ΘΚ*: θετικό κοντρόλ από γνωστή κυτταρική σειρά, *ΟΕ*: ομάδα ελέγχου, *ΧΔ*: χαμηλή δόση, *ΕΔ*: ενδιάμεση δόση, *ΥΔ*: υψηλή δόση, *ΣυΧ*: συντομη χορήγηση, *ΕνΧ*: ενδιάμεση χορήγηση, *ΜαΧ*: μακροχρόνια χορήγηση.

1.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να απαντήσουμε σε 4 ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια-τοξικότητα της ραπαμυκίνης: 1) αν η ραπαμυκίνη ασκεί νεφροτοξική δράση είτε με την έννοια της επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας είτε με την έννοια της πρόκλησης πρωτεϊνουρίας 2) αν η νεφροτοξικότητα αφορά στα σωληνάρια ή στα σπειράματα 3) αν είναι δοσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη, 4) ποιά είναι η επίδραση της ραπαμυκίνης σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο σε σημαντικές πρωτεΐνες των ποδοκυττάρων όπως η νεφρίνη και ποδοσίνη και ποιά η επίδραση στη φωσφορυλίωση της κινάσης, *Akt*.

Σχετικά με το πρώτο ερώτημα παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της τιμής της κρεατινίνης κατά 41% στην ομάδα της υψηλής δόσης (*ΥΔ*) (από 0.24 σε 0.34 mg/dl). Η αύξηση αυτή εκτός από στατιστικά σημαντική έχει ασφαλώς και κλινική σημασία γιατί παρατηρήθηκε σε ζώα νεαρής ηλικίας, χωρίς καμία παθολογία και με δίαιτα κανονική σε αλάτι. Επιπρόσθετα, η μείωση της νεφρικής λειτουργίας είναι ακόμα μεγαλύτερη αν αναλογιστούμε ότι παράλληλα μειώθηκε ελαφρά και το σωματικό βάρος των ζώων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στο σημείο αυτό ερχόμαστε και στην απάντηση στο 2^ο και 3^ο ερώτημα. Η απουσία ουσιαστικών ιστολογικών βλαβών στα σωληνάρια και το διάμεσο ιστό των ποντικών που έλαβαν *ΥΔ* ραπαμυκίνης, υποδηλώνει ότι η μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης

(ΡΣΔ) οφείλεται σε άμεσες επιδράσεις στο σπείραμα. Πράγματι από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η ραπαμυκίνη σε ΥΔ προκαλεί ιστολογικές διαταραχές στο σπείραμα σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο με αύξηση της μεσαγγείου ουσίας, οίδημα των ποδοκυττάρων, απώλεια ποδικών εκβλαστήσεων, υπενδοθηλιακή άθροιση πρωτεϊνικού υλικού και απώλεια θυρίδων που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Οι επιδράσεις αυτές είναι καταρχάς δόσοεξαρτώμενες καθώς παρατηρούνται κατά αυξανόμενη συχνότητα και ένταση από τις χαμηλές στις υψηλές δόσεις ραπαμυκίνης. Χορήγηση ΥΔ ραπαμυκίνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα μπορούσε να μας προσφέρει μια καλύτερη εικόνα των αλλαγών στα σπειραματικά κύτταρα, αλλά δεν κατέστη δυνατή είτε λόγω πρόωμης θνητότητας των ποντικών (π.χ από αιμορραγία στο έντερο), είτε λόγω σοβαρής εξασθένησης και ταχείας απώλειας βάρους σε προκαταρκτικά πειράματα καθορισμού της βέλτιστης δόσης. Το γεγονός αυτό μας ανάγκασε να περιορίσουμε τη χορηγούμενη δόση στο μοντέλο παρατεταμένης χορήγησης ραπαμυκίνης στα επίπεδα της ΕΔ (1,5 mg/ημέρα) μόνο.

Η χορήγηση ΕΔ για διάφορα χρονικά διαστήματα δεν συνοδεύτηκε από ευρήματα νεφροτοξικότητας με την έννοια της αύξησης της κρεατινίνης ορού ή της εμφάνισης πρωτεϊνουρίας. Αντίθετα παρατηρήσαμε αύξηση της ολιγολευκωματοουρίας στις 8 εβδομάδες χορήγησης που υποχώρησε πλήρως στις 8 εβδομάδες. Το εύρημα αυτό συμβαδίζει με τα ευρήματα από το ΗΜ. Πράγματι σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο παρατήσαμε μεταβολές κυρίως στα ποδοκύτταρα με αύξηση του πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων. Οι μεταβολές αυτές φαίνεται να είναι χρονοεξαρτώμενες καθώς εμφανίζονται άμεσα από την 1^η εβδομάδα, επιδεινώνονται την 4^η εβδομάδα και με άγνωστο τρόπο αποκαθίστανται την 8^η εβδομάδα. Οι ιστολογικές μεταβολές που παρατηρήσαμε σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, συνοδεύονται από παράλληλες μεταβολές της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής έκφρασης της νεφρίνης και ποδοσίνης. Μάλιστα φαίνεται να υπάρχει ένα είδος χρονικής εξάρτησης καθώς προηγείται η μείωση της γονιδιακής έκφρασης και έπεται η μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης και η αύξηση του πάχους των ποδίσκων. Επίσης πρώτα αποκαθίσταται η γονιδιακή και ακολουθεί η αποκατάσταση της πρωτεϊνικής έκφρασης και της ιστολογική εικόνας. Η ραπαμυκίνη, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, είναι σε θέση να επιδράσει τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε επίπεδο μετάφρασης. Με βάση τα δεδομένα της

παρούσας μελέτης είναι πιθανότερο η ραπαμυκίνη να προκαλεί άμεση και σημαντική μείωση της μεταγραφής των γονιδίων νεφρίνης και ποδοσίνης με αποτέλεσμα την ακόλουθη μείωση και του επιπέδου των πρωτεϊνών αυτών. Όμως δεν μπορεί να αποκλειστεί επιπρόσθετη επίδραση και επί της πρωτεϊνοσύνθεσης. Το γεγονός ότι η γονιδιακή και ακολούθως η πρωτεϊνική έκφραση νεφρίνης και ποδοσίνης αποκαθίστανται αντίστοιχα στον 1^ο και 2^ο μήνα χορήγησης σημαίνει ότι υπάρχουν μηχανισμοί διαφυγής από τη δράση της ραπαμυκίνης. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί σε ορισμένες κυτταρικές σειρές όπου η ραπαμυκίνη ενώ αρχικά προκάλεσε μείωση της φωσφορυλίωσης της 4EBP1 στη συνέχεια και μετά από παρατεταμένη εφαρμογή, οδήγησε σε υπερφωσφορυλίωσή της και ανάνηψη της cap-εξαρτώμενης πρωτεϊνοσύνθεσης⁶⁸. Άλλος μηχανισμός διαφυγής απαντάται και στην περίπτωση του ελέγχου της δραστηριότητας του eIF4B στη διαδικασία της μετάφρασης όπου «συγκλίνοντα» μονοπάτια που δεν αναστέλλονται από τη ραπαμυκίνη, όπως της RSK, διασώζουν την ενεργοποίησή του (δες παράγραφο 3.1 και 3.5.4). Οι μηχανισμοί διαφυγής που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα αφορούν κυρίως στη διαδικασία της μετάφρασης και όχι της μεταγραφής. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όμως παραπέμπουν ευθέως και σε μηχανισμούς διαφυγής από την ανασταλτική δράση της ραπαμυκίνης σε επίπεδο μεταγραφής οι οποίοι παραμένουν μέχρι στιγμής άγνωστοι καθώς είναι άγνωστοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων της νεφρίνης και ποδοσίνης.

Από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης φαίνεται επίσης ότι η Akt δεν παρουσιάζει σημαντικό βαθμό φωσφορυλίωσης στα πειράματα υπό φυσιολογικές συνθήκες, ούτε παρατηρείται μεταβολή της φωσφορυλίωσής της με χαμηλές δόσεις ραπαμυκίνης. Αντίθετα απ'ότι θα περιμέναμε, η φωσφορυλίωση της Akt αυξάνει σε πιο παρατεταμένη χορήγηση (στις 4 και λιγότερο στις 8 εβδομάδες), γεγονός που απομακρύνει την πιθανότητα η φωσφορυλίωσή της να εξαρτάται από το mTORC2, το οποίο αναστέλλεται από την παρατεταμένη χορήγηση ραπαμυκίνης⁶⁴ ή από τη φωσφατάση PP2A που επάγεται από τη ραπαμυκίνη¹²³. Είναι επομένως πιθανό η αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt στις ομάδες της EnX και MaX να σχετίζεται με τις μεταβολές της έκφρασης των πρωτεϊνών του λεπτού διαφράγματος²² ή με ενεργοποίηση άλλων κινασών με δραστηριότητα PDK2 όπως η ILK⁴². Παραμένει επομένως άγνωστος ο μηχανισμός ενεργοποίησης της Akt στο παρών μοντέλο και

επίσης άγνωστο το αν η ενεργοποίηση της Akt συμμετέχει στην παθογένεια των ιστολογικών αλλοιώσεων των σπειραματικών κυττάρων και δη των ποδοκυττάρων ή αποτελεί αντιρροπιστικό μηχανισμό που συμβάλλει στην τελική αποκατάσταση της βλάβης²².

Η μείωση του σωματικού βάρους σημαίνει ότι τα ποντίκια περιόρισαν την πρόσληψη τροφής. Παράλληλα με τη μείωση του σωματικού βάρους παρατηρήσαμε και μείωση των πρωτεϊνών του ορού. Δεν είναι απολύτως σαφές αν η ραπαμυκίνη επηρεάζει την πρόσληψη τροφής αλλά είναι σίγουρο ότι το mTORC1 αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή του κέντρου της πείνας στον εγκέφαλο των τρωκτικών όπου η ενεργοποίησή του φυσιολογικά μειώνει την πρόσληψη τροφής³⁷⁹⁻³⁸². Έτσι θεωρητικά τουλάχιστον θα έπρεπε τα ζώα που λαμβάνουν ραπαμυκίνη να έχουν αυξημένη όρεξη για πρόσληψη τροφής. Από την άλλη πλευρά όμως η ραπαμυκίνη θέτει τα κύτταρα σε μία κατάσταση που προσομοιάζει με τη νηστεία, με αύξηση της αυτοφαγίας και μείωση του μεγέθους και του αριθμού των κυττάρων οδηγώντας έτσι σε μείωση της μάζας των οργάνων και του συνολικού βάρους. Η δράση της ραπαμυκίνης μπορεί να μιμηθεί με τον τρόπο αυτό την αντι-γηραντική δράση της δίαιτας και να οδηγήσει σε αύξηση της συνολικής επιβίωσης στα τρωκτικά³⁸³. Μια άλλη, απλούστερη, εξήγηση για την απώλεια του σωματικού βάρους είναι το ενδεχόμενο στρες που προκλήθηκε από τις συχνές ενέσεις, τις συχνές συλλογές ούρων σε μεταβολικά κλουβιά και την αλλαγή περιβάλλοντος κατά τη μεταφορά τους στο χώρο των πειραμάτων. Η τελευταία εξήγηση είναι η πιθανότερη καθώς μείωση του σωματικού βάρους παρατηρήθηκε και στην ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε ραπαμυκίνη οπότε η αποκατάσταση του σωματικού βάρους μετά τις 4 εβδομάδες πιθανότατα σημαίνει προσαρμογή των ζώων στις νέες συνθήκες.

Παράλληλα με τη μείωση του σωματικού βάρους παρατηρήσαμε σημαντική μείωση της ημερήσιας αποβολής ούρων. Η αύξηση της τιμής της κρεατινίνης που παρατηρήθηκε στην ομάδα ΥΔ δεν μπορεί να εξηγήσει τη μείωση της διούρησης με την έννοια της οξείας νεφρικής βλάβης καθώς δεν υπήρχαν ιστολογικές βλάβες συμβατές με οξεία νεφρική βλάβη. Επίσης στα ζώα που έλαβαν ραπαμυκίνη δεν παρατηρήθηκε υπονατρίαζμία τέτοια που να παραπέμπει σε ενεργοποίηση της αντιδιουρητικής ορμόνης. Αντιθέτως υπήρξε μικρή αύξηση της τιμής του νατρίου ορού σε επίπεδα 147-154 mEq/L γεγονός που υποδηλώνει και μειωμένη πρόσληψη

νερού. Επίσης όλα τα ζώα (100%) που έλαβαν ραπαμυκίνη είχαν αυξημένη τιμή κρεατινίνης ορού, έστω και αν η μέσες τιμές δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την ΟΕ (με εξαίρεση την ομάδα ΥΔ). Επομένως η μείωση της διούρησης θα μπορούσε να αποδοθεί σε συνδυασμό μειωμένης πρόσληψης τροφής και νερού καθώς και σε μείωση της πειραματικής διήθησης συνεπεία των ιστολογικών αλλοιώσεων στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος. Δυστυχώς η ποσότητα τροφής και νερού που καταλάωναν τα ζώα δεν καταγράφηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος για άμεση επιβεβαίωση των παραπάνω συμπερασμάτων σχετικά με τη μείωση του σωματικού βάρους και της διούρησης.

Η μείωση της αποβολής λευκωμάτων στα ούρα 24ωρου στα ποντίκια που έλαβαν ραπαμυκίνη ήταν ανάλογη της μειωμένης ποσότητας ούρων με σταθερή συγκέντρωση λευκωμάτων στα ούρα. Επομένως, η μείωση της αποβολής λευκωμάτων στα ούρα δεν πρέπει να αποδοθεί σε κάποια ειδική αντι-πρωτεϊνουρική δράση της ραπαμυκίνης επί του πειραματικού ηθμού. Αντιθέτως αν ληφθεί υπόψη η αύξηση της αλβουμιουρίας και η εμφάνιση εστιακών βλαβών στα ποδοκύτταρα θα ήταν αναμενόμενη η εμφάνιση κάποιου βαθμού πρωτεϊνουρίας. Φαίνεται όμως ότι οι βλάβες αυτές δεν ήταν τόσες σε έκταση ώστε να προκαλέσουν την εμφάνιση κλινικά έκδηλης πρωτεϊνουρίας. Οι μεταβολές αυτές επίσης ήταν παροδικές και αποκαταστάθηκαν σχεδόν πλήρως τόσο σε ιστολογικό όσο και σε μοριακό επίπεδο στις 8 εβδομάδες χορήγησης, ίσως ως αποτέλεσμα «διαφυγής» από τη δράση της ραπαμυκίνης. Εάν δεν είχαν αποκατασταθεί πρώιμα θα οδηγούσαν κατά πάσα πιθανότητα σε εμφάνιση μόνιμων βλαβών του τύπου της ΕΤΣΣ και τα ποντίκια θα ανέπτυσσαν κλινικά έκδηλη πρωτεϊνουρία.

Συμπερασματικά: 1) Η ραπαμυκίνη προκαλεί πρώιμα ιστολογικές και μοριακές αλλαγές στα σπειράματα με ήπια αύξηση της αλβουμιουρίας, οι οποίες όμως αποκαθίστανται γρήγορα ενδεχομένως λόγω «διαφυγής» από τη δράση της. 2) Η ραπαμυκίνη προκαλεί πρώιμη, αναστρέψιμη και κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο μείωση του ρυθμού πειραματικής διήθησης συνεπεία δομικών μεταβολών στα ποδοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. 3) Ένας από τους μηχανισμούς διαφυγής από τη δράση της ραπαμυκίνης εντοπίζεται σε επίπεδο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης σημαντικών πρωτεϊνών του πειραματικού ηθμού ενώ περαιτέρω μελέτη χρειάζεται για την πιθανή εμπλοκή της κινάσης Akt.

2. Μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στη δομή και λειτουργία των επιθηλιακών σπειραματικών κυττάρων σε ποντίκια με νεφρίτιδα του Λύκου

2.1 Εισαγωγή

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) είναι μια χρόνια αυτοάνοση πάθηση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοδραστικών μνημονικών CD4+ κυττάρων τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό πολυκλωνικών Β κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε υπερ-γ-σφαιριναιμία και παραγωγή αντιπυρηνικών και anti-DNA αντισωμάτων. Περίπου το 50% των ασθενών εμφανίζουν σπειραματονεφρίτιδα (ΣΝΦ) λόγω της εναπόθεσης ανοσοσυμπλεγμάτων στο νεφρό, ακόλουθη ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος και διήθησης από T-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.³⁸⁴⁻³⁸⁶

Ένα από τα καλύτερα μελετημένα μοντέλα ΣΕΛ σε τρωκτικά είναι οι πρώτης γενιάς θηλυκοί απόγονοι των ποντικών New Zealand Black και New Zealand White, τα επονομαζόμενα New Zealand Black White (NZBW)/F1 υβρίδια που αναπτύσσουν όλα τα χαρακτηριστικά της νόσου τα οποία εμφανίζει και ο άνθρωπος, όπως οι αυξημένοι τίτλοι anti-dsDNA αντισωμάτων και η αυξημένη επίπτωση ΣΝΦ³⁸⁷. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν ΣΝΦ κατά την ηλικία των 5 μηνών και πεθαίνουν λόγω ουραιμίας στην ηλικία 10 με 12 μηνών.

Σε κάποιες πρόσφατες μελέτες³¹³⁻³¹⁷, ο αναστολέας της mTOR, ραπαμυκίνη, βελτίωσε την κλινική πορεία της νεφρίτιδας του λύκου (ΝΛ) σε NZBW/F1 ποντίκια. Βρέθηκε επίσης να παρατείνει την επιβίωση και να μειώνει τις φλεγμονώδεις αλλοιώσεις σε πολλά όργανα, περιλαμβανομένων και των νεφρών, σε ένα άλλο δημοφιλές μοντέλο ΝΛ των τρωκτικών, σε ποντίκια MRL/lpr³¹⁸. Επιπρόσθετα η ραπαμυκίνη μείωσε τη δραστηριότητα της νόσου σε 9 ασθενείς με ΣΕΛ που είχαν λάβει ανεπιτυχώς άλλες ανοσοκατασταλτικές θεραπείες³¹⁹.

Παραδοσιακά θεωρείται ότι η ραπαμυκίνη δρα αναστέλλοντας τη μετάδοση των σημάτων της IL-2, προλαμβάνοντας έτσι την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S στα T λεμφοκύτταρα και σε πολλές άλλες κυτταρικές σειρές⁵⁴. Εντούτοις στο ΣΕΛ η μεταγραφή της IL-2 είναι κατεσταλμένη³⁸⁸ και επομένως η επωφελής δράση της ραπαμυκίνης πρέπει να ασκείται μέσω άλλων μηχανισμών ανεξάρτητων από την απλή καταστολή της IL2.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt αποτελεί τον κύριο υπερκείμενο ρυθμιστή της κινάσης mTOR. Το μονοπάτι αυτό έχει πολλαπλώς ενοχοποιηθεί για την προαγωγή της νεοπλασίας αλλά και της αυτοανοσίας^{84, 85, 389}. Συνολικά το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR έχει βρεθεί ενεργοποιημένο σε Β^{299, 385-387} και Τ λεμφοκύτταρα³⁹⁰ ασθενών με ΣΕΛ. Σε μία πρόσφατη μελέτη, το 50% περίπου των σχετιζόμενων με ΣΕΛ γονιδίων, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε τρωκτικά, μπορούσαν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο να συνδεθούν με το μονοπάτι της mTOR³¹⁷.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινά με τη σύνδεση ουσιών όπως αυξητικοί παράγοντες, μιτογόνα και κυτταροκίνες στους αντίστοιχους υποδοχείς, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση της PI3K και την φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 (Thr308pAkt)^{64, 100, 391}. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt προϋποθέτει την ύπαρξη μιας δεύτερης φωσφορυλίωσης στη θέση Ser473 (Ser473pAkt), η οποία αυξάνει την ενεργότητα της Akt κατά 5 φορές⁹⁷. Η φωσφορυλίωση στη θέση Ser473 μπορεί να προκληθεί από διάφορες κινάσες^{42, 93-96} που ονομάζονται συλλήβδην PDK2s. Πρόσφατα δεδομένα όμως έδειξαν ότι η πιθανότερη υποψήφια κινάση για το ρόλο της PDK2, είναι η mTOR στο σύμπλεγμα mTORC2⁹⁷. Η ενεργοποιημένη Akt ασκεί τις πολλαπλές δράσεις της (όπως π.χ αναστολή απόπτωσης, ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, ρύθμιση κυτταροσκελετού και κυτταρικό πολλαπλασιασμό) μέσω φωσφορυλίωσης μιας πληθώρας υποκείμενων πρωτεϊνών όπως της mTOR στη θέση Ser2448 (Ser2448pTOR), στο σύμπλεγμα mTORC1^{65, 101-103, 389}. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι η αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR^{84, 85, 299, 300, 386, 392} εμπλέκεται στην παθογένεια του ΣΕΛ. Εντούτοις σε επίπεδο πειραματικής και γενικότερα νεφρικής προσβολής δεν υπάρχει καμία μελέτη μέχρι σήμερα που να καταδεικνύει μια τέτοια ενεργοποίηση. Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την έκφραση και τη δραστηριότητα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR σε σπειράματα πρωτεϊνουρικών NZBW/F1 ποντικών με πλήρη εκδήλωση της ΝΛ καθώς και σε μη πρωτεϊνουρικά υγιή NZBW/F1 ποντίκια. Μελετήσαμε επίσης την επίδραση της ραπαμυκίνης στην πρόληψη και θεραπεία των εκδηλώσεων της νόσου και στη δραστηριότητα του υπό εξέταση μονοπατιού. Τέλος ελέγξαμε ορισμένα πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία από in vitro πειράματα σχετικά με τη νεφροτοξική επίδραση της ραπαμυκίνης στις πρωτεΐνες του λεπτού διαφράγματος νεφρίνη και ποδοσίνη.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

Οι μέθοδοι που ακολουθήσαμε στην παρούσα μελέτη είναι οι ίδιες με αυτές που αναφέρονται και στη μελέτη της νεφροτοξικότητας της ραπαμυκίνης (προηγούμενη ενότητα του ειδικού μέρους) οπότε για λόγους οικονομίας θα αναφερθούν εδώ μόνο ο σχεδιασμός της μελέτης και οι παραλλαγές που εφαρμόστηκαν στις διάφορες μεθόδους.

Χρησιμοποιήσαμε 32 θηλυκά ποντίκια NZBW/F1 ηλικίας 4 μηνών τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: 1) **Ομάδα πρόληψης (PG)**, με 6 ποντίκια ηλικίας 4 μηνών στα οποία χορηγήσαμε ενδοπεριτοναϊκά ραπαμυκίνη, σε δόση 1 mg/kg τρεις φορές την εβδομάδα (Δ-Τ-Π) πριν την εμφάνιση παθολογικής (<4mg/ημέρα) πρωτεϊνουρίας και μέχρι συμπλήρωσεως της ηλικίας των 8 μηνών. 2) **Θεραπευτική ομάδα (TG)**, 6 ποντίκια στα οποία χορηγήσαμε ενδοπεριτοναϊκά ραπαμυκίνη σε δόση 1 mg/kg τρεις φορές την εβδομάδα (Δ-Τ-Π) ξεκινώντας από την ηλικία των 5-6 μηνών (μετά την εμφάνιση παθολογικής πρωτεϊνουρίας -πάνω από 20 mg/ημέρα-, διαπιστωμένης σε 2 διαδοχικές μετρήσεις) και μέχρι συμπλήρωσεως της ηλικίας των 8 μηνών. 3) **Ομάδα ελέγχου από υγιή NZBW/F1 ποντίκια (HC, 5 ποντίκια)**, τα οποία θυσιάστηκαν σε ηλικία 4 μηνών, πριν την εμφάνιση παθολογικής πρωτεϊνουρίας. 4) **Ομάδα του Λύκου (UG, 15 ποντίκια)** στην οποία τα ποντίκια δεν έλαβαν θεραπεία αλλά ετέθησαν σε παρακολούθηση της πορείας της νόσου, έως την ηλικία των 8 μηνών. Πολλά ποντίκια στην ομάδα UG πέθαιναν πρόωμα, δηλαδή πριν από τη συμπλήρωση της ηλικίας των 8 μηνών. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να λάβουμε νεφρικό ιστό για περαιτέρω μελέτες 6 ποντίκια από την ομάδα αυτή θυσιάστηκαν νωρίτερα, στην ηλικία των 6-7 μηνών, όταν εμφάνισαν σοβαρά συμπτώματα της νόσου όπως δυσκολία στην κίνηση, τριχόπτωση και απώλεια βάρους.

Η ραπαμυκίνη αγοράστηκε από τα LC Laboratories, MA, USA. Τα ποντίκια αγοράστηκαν από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας της Ελλάδος και τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με τη κείμενη ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ζώα βρίσκονταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με επαρκή αερισμό (35m³/ώρα), σταθερή θερμοκρασία (25 βαθμούς κελσίου) και αυτόματες συνθήκες φωτισμού (διαδοχικούς κύκλους σε σκοτάδι και σε φώς διάρκειας 12 ωρών). Στα ποντίκια μετρήθηκε το σωματικό βάρος και η πρωτεϊνουρία

ξεκινώντας από την ηλικία των 3 μηνών και έκτοτε ανά εβδομάδα μέχρι να θυσιαστούν. Η συλλογή ούρων 24ώρου γινόταν σε μεταβολικά κλουβιά στα οποία τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό. Η δόση της ραπαμυκίνης επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα στοχεύοντας σε συγκεντρώσεις στο αίμα της τάξης των 5-10ng/ml και προσαρμοζόταν κάθε φορά στις μετρήσεις του σωματικού βάρους. Η διαδικασία της θυσίας, η μονιμοποίηση και επεξεργασία των ιστών και οι αναλύσεις αίματος έγιναν με τον τρόπο που αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα. Επιπρόσθετα έγινε μέτρηση των επιπέδων των αντισωμάτων έναντι διπλής έλικας DNA (anti-dsDNA) στον ορό με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμης ELISA και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Alpha Diagnostic International, Texas). Για την παρακολούθηση της πρωτεϊνουρίας εκτός από την ποσοτική μέθοδο Bradford χρησιμοποιήσαμε και ποιοτική μέθοδο με ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ούρων από όλα τα ζώα σε γέλη SDS-πολυακρυλαμίδης και ακόλουθη χρώση με Coomassie blue.

Στον ανοσοφθορισμό (ΑΦ) προκειμένου να εξαλειφθεί η μη ειδική σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος σε θέσεις ύπαρξης ανοσοσυμπλεγμάτων και σε υποδοχείς του Fc κλάσματος των ανοσοσφαιρινών (FcR), χρησιμοποιήσαμε ορό κατσίκας 5% (ορός ίδιου είδους με αυτό του 2^{ου} αντισώματος) καθώς και κατσικίσια κεκαθαρμένα IgG μονοδύναμα Fab κλάσματα έναντι ποντικίσιας IgG(H+L) σε συγκέντρωση 0.1 mg/ml για 90 λεπτά (Jackson Immunoresearch, EU), πριν την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα. Το πρωτογενές αντίσωμα εφαρμόστηκε καθόλη τη διάρκεια της νύχτας. Για όλα τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε υπήρξαν και αντίστοιχα δείγματα αρνητικού ελέγχου (negative controls), με παράλειψη κάθε φορά του σχετικού πρωτογενούς αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον ΑΦ ήταν έναντι αντιγόνων ποντικίου και συγκεκριμένα **1)** από χοιρίδιο Γουνιάς έναντι γεφρίνης σε αραιώση 1:250, από Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany, **2)** από κουνέλι έναντι ποδοσίνης σε αραιώση 1:500, από Abcam, UK, **3)** από κουνέλι έναντι Thr308 p-Akt σε αραιώση 1:800, από Cell Signaling, USA, **4)** από κουνέλι έναντι Ser473 p-Akt σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling, **5)** από κουνέλι έναντι ολικής Akt σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling, **6)** από κουνέλι έναντι mTOR σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling, **7)** από κουνέλι έναντι Ser2448 p-TOR σε αραιώση 1:100, από Cell Signaling, **8)** από αρουραίο έναντι CD31 (ή PECAM) σε αραιώση 1:10 από BD Pharmigen, NJ, USA. Στη

συνέχεια εφαρμόστηκαν τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα κασίικας έναντι κουνελιού ή χοιριδίου Γουνέας ή αρουραίου: Alexa Fluor 488 και 555, Molecular Probes, Invitrogen CA. Σε ορισμένες τομές έγινε και χρώση πυρήνων μετά από εφαρμογή RNAσης (Sigma-Aldrich Germany) σε αραιώση 1:500 σε BSA 1% - PBS Tween 0.05%, pH=7.4 σε θερμοκρασία 37 °C για 30 λεπτά και επώαση με ιωδιούχο προπίδιο 1:1000 (Sigma-Aldrich Germany). Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονταν με το υλικό mowiol 4-88 (Calbiochem) και καλυπτρίδα. Τουλάχιστον 20 σπειράματα εξετάστηκαν ανά ζώο με τη χρήση ενός μικροσκοπίου φθορισμού Nikon εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα. Η ένταση του φθορισμού βαθμολογήθηκε σε μια κλίμακα από 0 έως 3+, όπου 0 = απουσία φθορισμού, 1+ = ήπιος, 2+ = μέτριος και 3+=ισχυρός φθορισμός.

Για τη western blot χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια πρωτογενή αντισώματα όπως και στον ΑΦ και συγκεκριμένα έναντι νεφρίνης (1:500), ποδοσίνης (1:500), Ser473pAkt (1:500), Thr308pAkt (1:500), Akt (1:500), και μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ακτίνης (1:3000) από Chemicon International, USA&CA για ομαλοποίηση των τιμών.

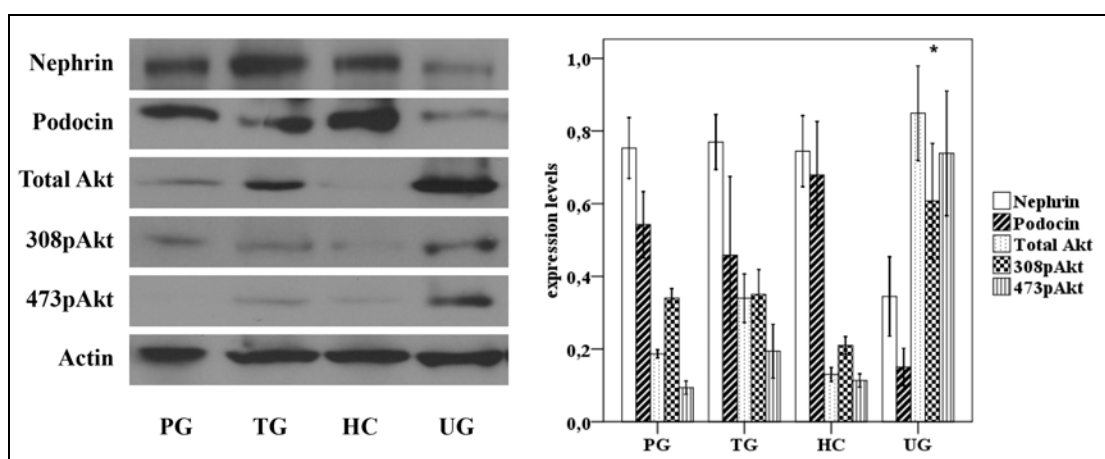
Για την ποσοτική, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος και αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο τοξικότητας (Πίνακας 1 της παραγράφου 1.2 του ειδικού μέρους).

Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS/PC 17. Συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD). Η δοκιμασία μονού δείγματος Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ύπαρξης ή όχι κανονικής κατανομής στα δεδομένα. Ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) με post hoc διόρθωση κατά Dunnett, χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση συνεχών μεταβλητών. Η δοκιμασία Mann Whitney U χρησιμοποιήθηκε για τις μη παραμετρικές συγκρίσεις. Η συνολική επιβίωση αναλύθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $P < 0.05$ (διπλής ουράς).

2.3 Αποτελέσματα

Η φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 αυξάνεται σημαντικά στη νεφρίτιδα του λύκου

Η φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 αξιολογήθηκε ως έμμεσος δείκτης της ενεργοποίησης της PI3K. Στην ομάδα HC και στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία υπήρξε χαμηλό επίπεδο έκφρασης της Thr308pAkt στη WB (Εικόνα 30) . Στις ίδιες ομάδες ποντικών υπήρξε απουσία ή χαμηλό επίπεδο έκφρασης (0-1+) για τη Thr308pAkt στη συντριπτική πλειοψηφία των σπειραμάτων (Εικόνα 31 Β,Ε,Η και Πίνακας 2) στον ανοσοφθορισμό(ΑΦ). Απ'την άλλη πλευρά στην ομάδα UG η έκφραση της Thr308pAkt ήταν σημαντικά αυξημένη τόσο με WB (Εικόνα 30) όσο και με ΑΦ (Εικόνα 31 Β,Ε,Η και Πίνακας 2) όπου εντοπιζόταν τόσο στο μεσάγγειο όσο και στις τριχοειδείς αγκύλες (Εικόνα 31 Κ). Ορισμένα φλουικά σωληνάκια από όλες τις ομάδες παρουσίασαν μέτρια έως έντονη χρώση για την Thr308pAkt στην ψυκτροειδή παρυφή (Εικόνα 31 Β,Ε).

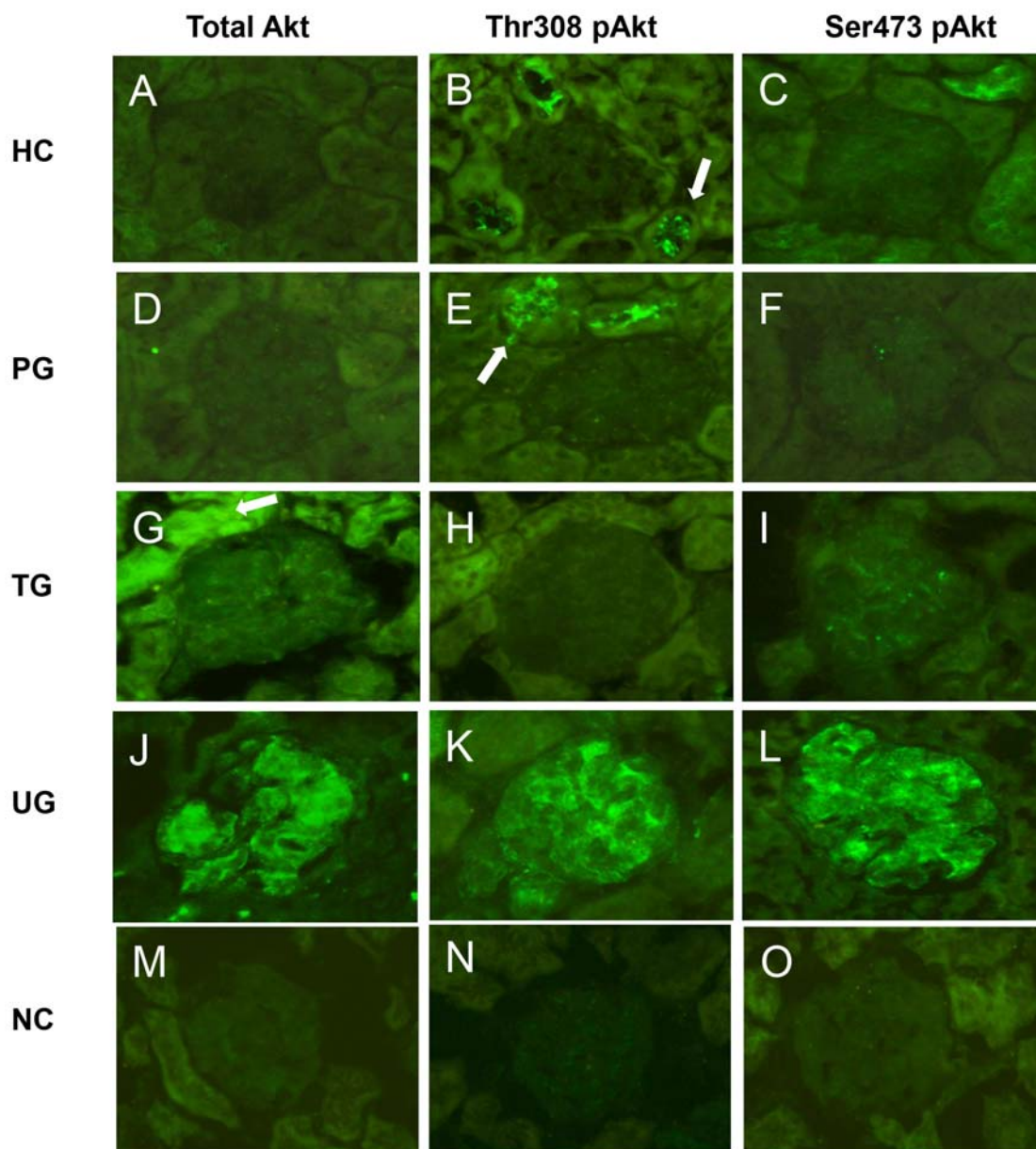


Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτική γέλη από western blot που δείχνει τη σπειραματική έκφραση των πρωτεϊνών νεφρίνη, ποδοσίνη, ολική Akt, Thr308pAkt και Thr473pAkt. Το πείραμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν και οι μέσες τιμές για κάθε πρωτεΐνη σε κάθε ομάδα φαίνονται στο διάγραμμα δεξιά (οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης). Τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα ποντίκια χωρίς θεραπεία (UG), ενώ η ολική Akt, η Thr308pAkt και η Thr473pAkt ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ίδια ομάδα. * $P < 0.001$ για όλες τις πρωτεΐνες μεταξύ της ομάδας του λύκου (UG) και όλων των άλλων ομάδων.

Πίνακας 2. Ποσοστό σπειραμάτων με ένταση φθορισμού > 1+, για την ολική Akt, τη Thr308pAkt, τη Ser473pAkt, την ολική mTOR και τη Ser2448pTOR.

	PG (%)	TG (%)	HC (%)	UG (%)
Ολική Akt	4.8	5.3	0	67.1 ^a
Thr308pAkt	1.2	5.7	0	83.1 ^a
Ser473pAkt	6.3	5.9	0	62.7 ^a
Ολική mTOR	1.2	5.7	0	86.9 ^a
Ser2448pTOR	0	2.6	0	77.2 ^a

PG: ομάδα πρόληψης, TG: ομάδα θεραπείας, HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο; Οι τιμές αντιπροσωπεύουν ποσοστά σπειραμάτων (εντός των ομάδων) με ένταση φθορισμού 2+ ή 3+. Η δοκιμασία U κατά Mann-Whitney δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων PG, TG and HC για οποιαδήποτε από τις εξεταζόμενες κινάσες. a: $p < 0.001$ για όλες τις κινάσες μεταξύ της ομάδας UG και όλων των άλλων ομάδων.



Εικόνα 31. Ο ανοσοφθορισμός σε νεφρούς από την ομάδα ελέγχου υγιών ποντικών (A, B, C), την ομάδα πρόληψης (D, E, F) και την ομάδα θεραπείας (G, H, I) έδειξε ασθενή σπειραματική χρώση για την ολική Akt, τη Thr308pAkt και τη Ser473pAkt. Ορισμένα σωληνάρια εκφράζουν έντονα τη Thr308pAkt και την ολική Akt (βέλη) σε όλες τις ομάδες ποντικών. Αντιθέτως στην ομάδα χωρίς θεραπεία (J, K, L) παρατηρείται έντονη σπειραματική χρώση για την ολική Akt, τη Thr308pAkt και τη Ser473pAkt. Τα δείγματα αρνητικού ελέγχου (NC) δεν παρουσιάζουν μη ειδική σύνδεση αντισώματος (M, N, O). HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, PG: ομάδα πρόληψης, TG: ομάδα θεραπείας, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο. Αρχική μεγέθυνση: 400x

Η ολική Akt αυξάνεται στη νεφρίτιδα του λύκου

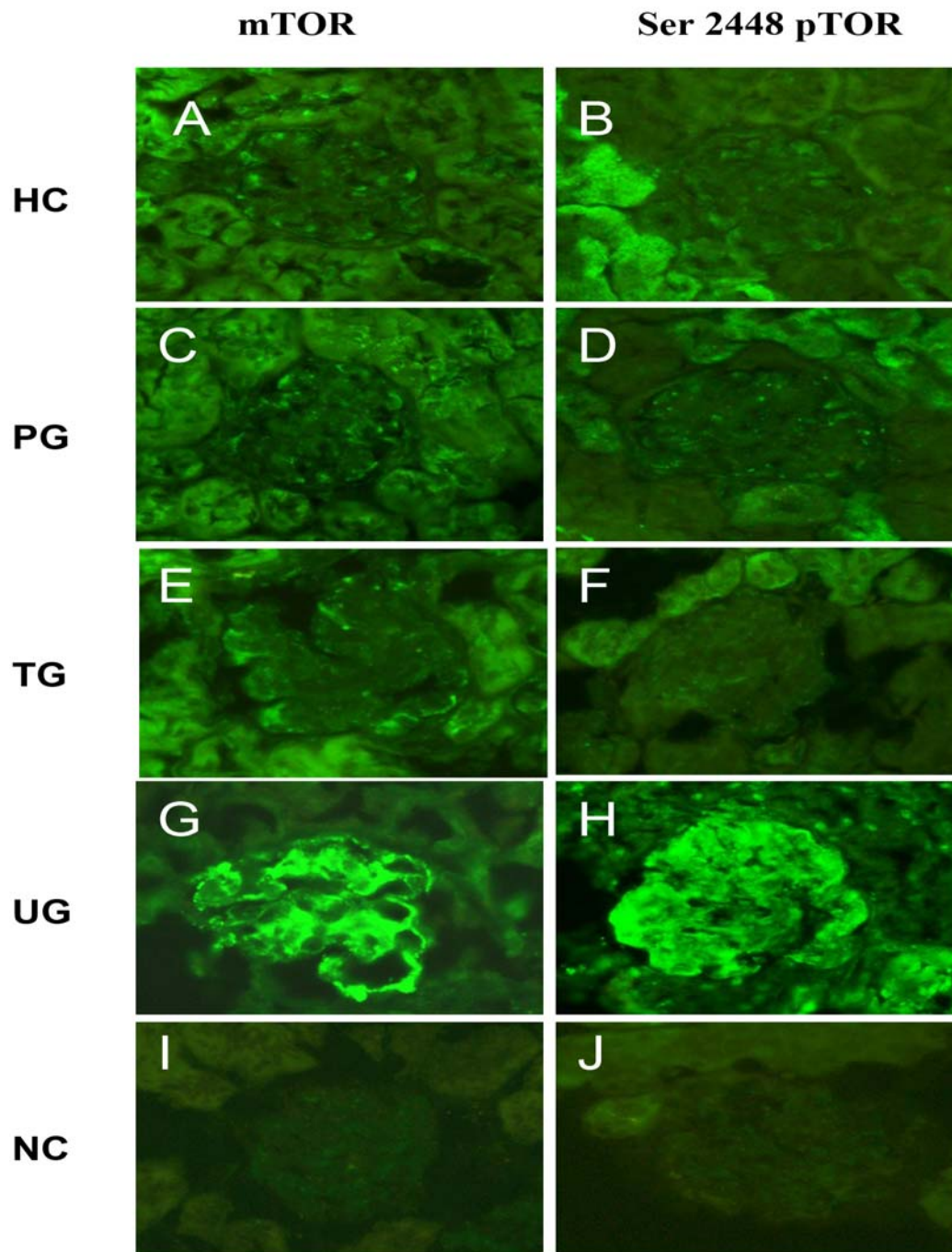
Η σπειραματική έκφραση της ολικής Akt (total Akt) ήταν σημαντικά αυξημένη ($p < 0.001$) στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία σε σύγκριση με τα θεραπευμένα και τα υγιή ποντίκια τόσο στη WB (Εικόνα 30) όσο και στον AΦ (Εικόνα 31_{A,D,G,J} και Πίνακας 2), καταδεικνύοντας έτσι ότι πέραν της αυξημένης ενεργοποίησης από την PI3K υπάρχει και ποσοτική αύξηση στην έκφραση της ολικής Akt στη ΝΛ.

Η κινάση Akt είναι πλήρως ενεργοποιημένη στη νεφρίτιδα του λύκου

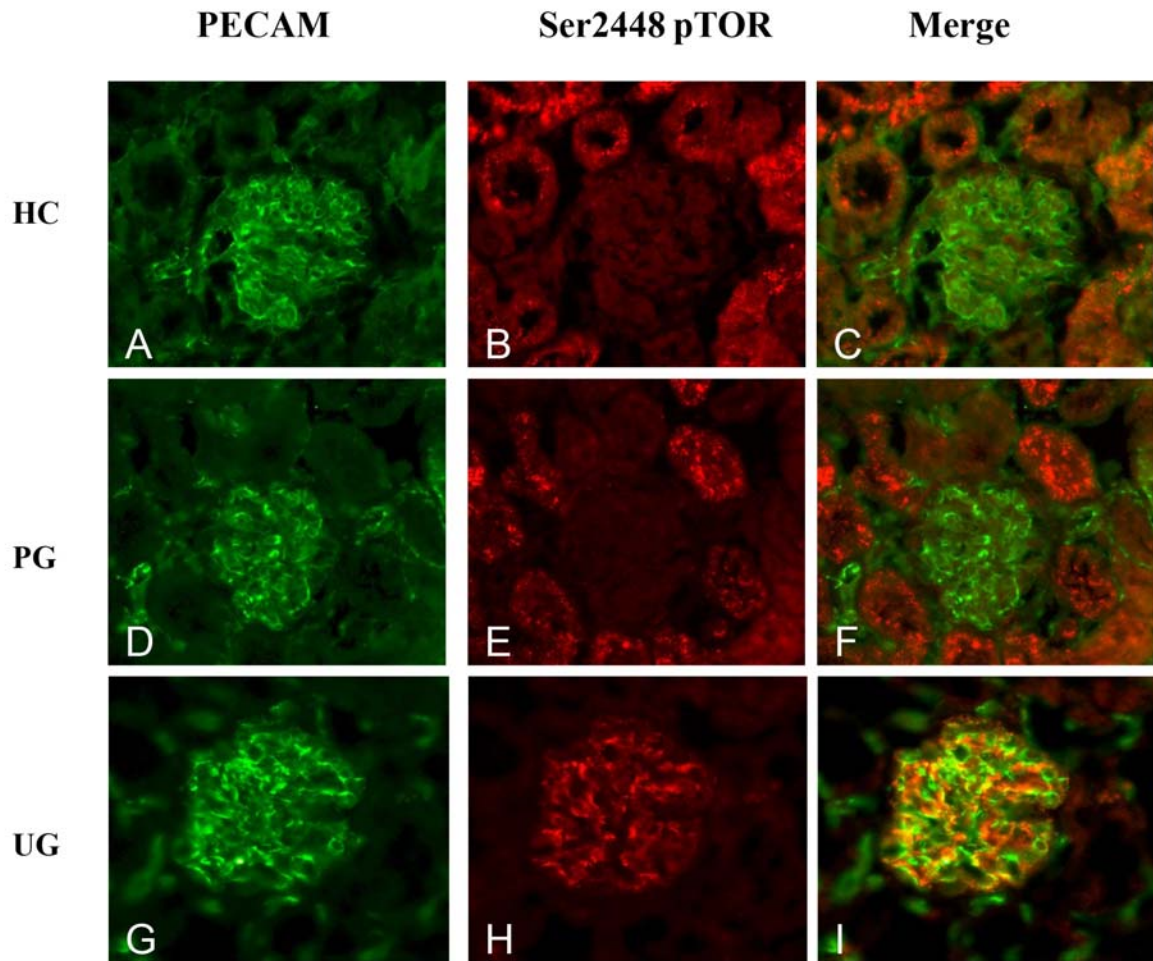
Η δεύτερη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Ser473, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης πλήρους ενεργοποίησης της Akt. Στην ομάδα HC και στα θεραπευμένα ζώα (PG & TG) υπήρξε είτε έλλειψη είτε χαμηλά επίπεδα έκφρασης (0-1+) για τη Ser473pAkt στη συντριπτική πλειοψηφία των σπειραμάτων. Αντιθέτως στην ομάδα UG η σπειραματική έκφραση της Ser473pAkt ήταν σημαντικά αυξημένη ($p < 0.001$), υποδεικνύοντας έτσι πλήρη ενεργοποίηση της Akt από υπερκείμενες κινάσες (Εικόνες 30 & 31 και Πίνακας 2).

Η κινάση mTOR υπερεκφράζεται και είναι ενεργοποιημένη στα σπειράματα ποντικών με νεφρίτιδα του λύκου.

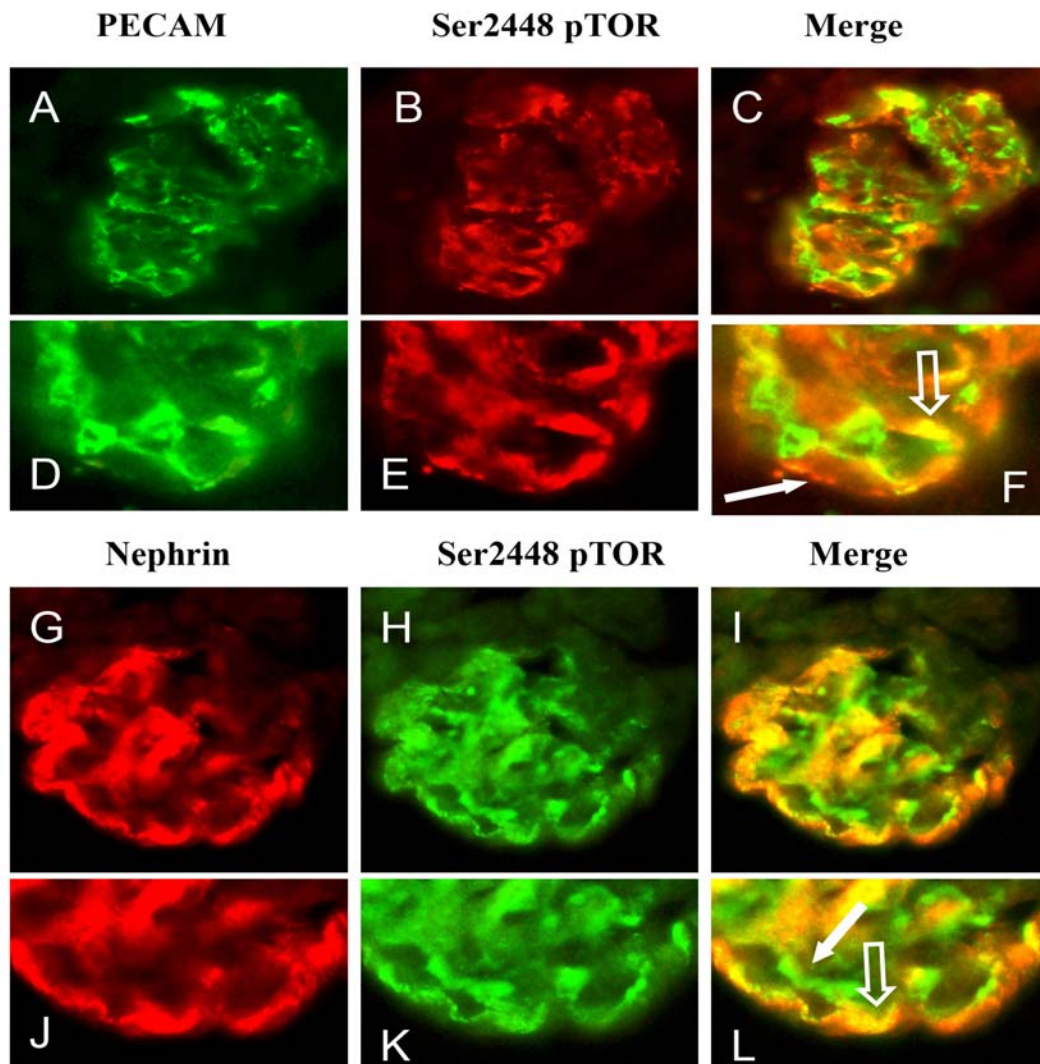
Σε πλήρη συμφωνία με την αύξηση της έκφρασης και της δραστηριότητας της Akt, η σπειραματική έκφραση της mTOR ήταν αυξημένη στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία (Εικόνα 32 και Πίνακας 2). Η κατανομή της mTOR στο σπείραμα ήταν παρόμοια με αυτή της Akt, καθόσον και οι δύο εκφράζονταν στο μεσάγγειο και στις τριχοειδείς αγκύλες (Εικόνες 31_G και 32_G). Απ' την άλλη πλευρά τα υγιή και τα θεραπευμένα ποντίκια παρουσίασαν χαμηλό επίπεδο σπειραματικής έκφρασης της mTOR μόνο στην περιφέρεια των σπειραματικών αγκυλών (Εικόνα 32_{A,C,E} και Πίνακας 2). Η πλειοψηφία των σπειραμάτων στην ομάδα UG παρουσίασε μέτρια ή έντονη χρώση για τη Ser2448pTOR (Πίνακας 2 και Εικόνα 32_H) σε αντίθεση με τα υγιή και τα θεραπευμένα ποντίκια που παρουσίασαν ασθενή έκφραση για τη Ser2448pTOR και μόνο στην περιφέρεια των σπειραματικών αγκυλών (Εικόνα 32_{B,D,F}).



Εικόνα 32. Ο ανοσοφθορισμός σε νεφρούς από την ομάδα ελέγχου υγιών ποντικών (A, B), την ομάδα πρόληψης (C, D) και την ομάδα θεραπείας (E, F) έδειξε ασθενή περιφερική χρώση στα σπειράματα για την mTOR και τη Ser2448pTOR. Σε ορισμένα σωληνάρια παρατηρείται φθορισμός για την mTOR και τη Ser2448pTOR (βέλος). Αντιθέτως στη ομάδα ποντικών χωρίς θεραπεία (G, H) παρατηρείται αυξημένος φθορισμός για την mTOR και τη Ser2448pTOR στο μεσάγγειο και τις τριχοειδείς αγκύλες. Τα δείγματα αρνητικού ελέγχου από προσβεβλημένα σπειράματα (NC) δεν παρουσιάζουν μη ειδική σύνδεση αντισώματος (I, J). HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, PG: ομάδα πρόληψης, TG: ομάδα θεραπείας, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο. Αρχική μεγέθυνση: 400x



Εικόνα 33. Μελέτη συνεντόπισης σε νεφρικές βιοψίες από την ομάδα ελέγχου υγιών ποντικών (A, B, C), την ομάδα πρόληψης (D, E, F) και την ομάδα χωρίς θεραπεία (G, H, I) για τον ενδοθηλιακό δείκτη PECAM, (με πράσινο χρώμα) και τη Ser2448pTOR (με κόκκινο χρώμα). Παρατηρείται αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR στην ομάδα χωρίς θεραπεία (H) και μερική ταύτιση των δύο πρωτεϊνών (I) υποδηλώνοντας έτσι αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR στα ενδοθηλιακά κύτταρα (μεταξύ άλλων). Υπάρχει επίσης αυξημένης έντασης στικτός κυτταροπλασματικός φθορισμός για τη Ser2448pTOR στα σωληνάρια των υγιών (B, C) και θεραπευμένων ποντικών (E, F). HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, PG: ομάδα πρόληψης, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο. Αρχική μεγέθυνση: 400x



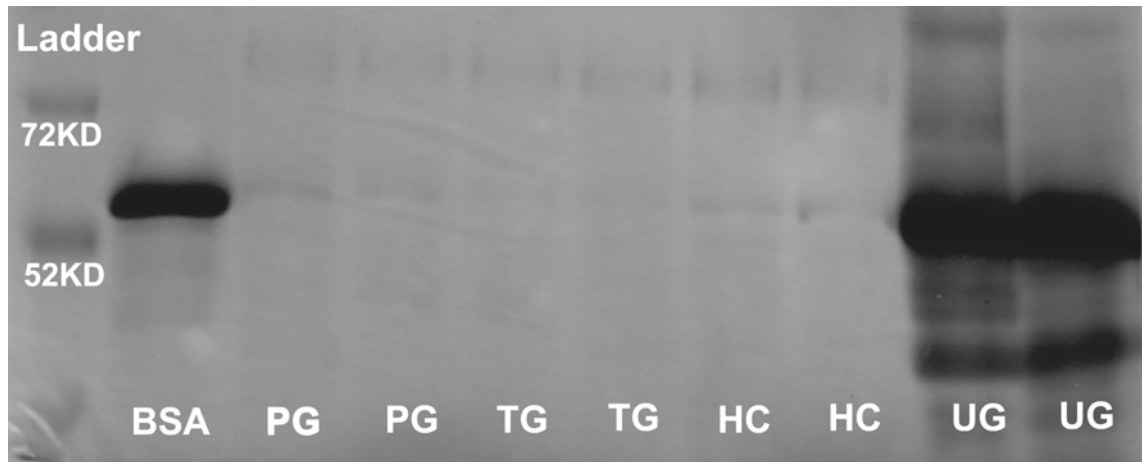
Εικόνα 34. Μελέτη συνεντόπισης σε νεφρικές βιοψίες από μη θεραπευμένα ζώα με νεφρίτιδα του λύκου για τον ενδοθηλιακό δείκτη PECAM, (με πράσινο χρώμα, A) και τη Ser2448pTOR (με κόκκινο χρώμα, B). Παρατηρείται μερική ταύτιση των δύο πρωτεϊνών (κίτρινο χρώμα, C). Λεπτομέρεια από τα ίδια σπειράματα παρουσιάζεται στις εικόνες D, E, F. Ο δείκτης PECAM και η Ser2448pTOR συνεντοπίζονται σε κάποιες τριχοειδικές αγκύλες (με κίτρινο χρώμα στην εικόνα F, ανοικτό βέλος), υποδεικνύοντας έτσι αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα σε άλλα σημεία δεν παρατηρείται συνεντοπισμός (με κόκκινο χρώμα στην εικόνα F, κλειστό βέλος) υποδεικνύοντας έτσι αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR σε άλλα σπειραματικά κύτταρα πέραν των ενδοθηλιακών. Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη νεφρίνη (με κόκκινο στις εικόνες G και J) και τη Ser2448pTOR (με πράσινο στις εικόνες H και K) η οποία επίσης έδειξε μερική ταύτιση των δύο πρωτεϊνών (με κίτρινο στην εικόνα I και L) σε κάποια σημεία των τριχοειδικών αγκυλών (ανοικτό βέλος) υποδεικνύοντας έτσι αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR στα ποδοκύτταρα. Αντίθετα σε άλλα σημεία δεν παρατηρείται συνεντοπισμός (με πράσινο χρώμα στην εικόνα L, κλειστό βέλος) υποδεικνύοντας έτσι αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR σε άλλα σπειραματικά κύτταρα πέραν των ποδοκυττάρων.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει αυξημένη ενεργοποίηση της mTOR από την Akt στη ΝΛ. Ορισμένα σωληνάρια από όλες τις ομάδες παρουσίασαν σημαντική κυτταροπλασματική έκφραση της mTOR και της Ser2448pTOR (Εικόνα 32_{A,B} και 33_{B,E}). Προκειμένου να καθορίσουμε το είδος των πειραματικών κυττάρων που υπερεκφράζει την ενεργοποιημένη TOR στην ομάδα του λύκου (UG), προχωρήσαμε σε μελέτες ΑΦ χρησιμοποιώντας είτε τον ενδοθηλιακό δείκτη CD31 (γνωστό και ως platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM) ή τον ποδοκυτταρικό δείκτη νεφρίνη, σε διπλές χρώσεις με τη Ser2448pTOR. Με τον τρόπο αυτό βρήκαμε ότι η αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR στα τριχοειδή των προσβεβλημένων πειραμάτων οφείλεται τόσο στα ποδοκύτταρα όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 33 και 34).

Η ραπαμυκίνη παρατείνει την επιβίωση, διαφυλάσσει τη φυσιολογική νεφρική λειτουργία και μειώνει τα επίπεδα των anti-dsDNA αντισωμάτων.

Όλα τα ζώα που έλαβαν θεραπεία επιβίωσαν έως και τους 8 μήνες οπότε και θυσιάστηκαν. Αντιθέτως στην ομάδα UG, μόνο 2 από τα αρχικά 9 ποντίκια (22%) επιβίωσαν έως τους 8 μήνες (Log rank test = 7.4; p = 0.02). Στην ομάδα πρόληψης, η πρωτεϊνουρία παρέμεινε εντός των φυσιολογικών ορίων (<4mg/ημέρα) σε όλες τις μετρήσεις. Στην ομάδα θεραπείας παρατηρήθηκε πλήρης ομαλοποίηση της πρωτεϊνουρίας (από 30.6±5.3 σε 2.3±1.4mg/ημέρα) σε χρονικό διάστημα 4-5 εβδομάδων από την έναρξη της θεραπείας. Η πρωτεϊνουρία στην ομάδα UG ήταν μη εκλεκτική (Εικόνα 35) και υπερέβαινε τα 30mg/ημέρα κατά το τέλος της μελέτης (Πίνακας 3).

Η νεφρική μάζα, η κρεατινίνη του ορού και τα επίπεδα των anti-dsDNA αντισωμάτων ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα υγιή και στα θεραπευμένα ζώα σε σύγκριση με τα μη θεραπευμένα (Πίνακας 3). Συγκεκριμένα όλα τα ποντίκια στις ομάδες HC και PG είχαν φυσιολογική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού ≤0.3mg/dl). Στην ομάδα TG μόνο ένα ποντίκι ανέπτυξε παθολογική τιμή κρεατινίνης (0.5mg/dl) παρά την αποκατάσταση της πρωτεϊνουρίας. Αντίστροφα όλα τα ποντίκια στην ομάδα UG είχαν αυξημένη τιμή κρεατινίνης ορού κατά τη θυσία η οποία κυμαινόταν από 0.5mg/dl έως και 0.9mg/dl. Τέλος τα κατώτερα επίπεδα ραπαμυκίνης κυμαινόταν εντός του θεραπευτικού στόχου σε όλα τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία.



Εικόνα 35. Ηλεκτροφόρηση ούρων σε SDS gel και χρώση με coomassie blue. Η πρωτεϊνουρία στην ομάδα UG ήταν εξεσημασμένη και μη εκλεκτική. Οι υπόλοιπες ομάδες δεν παρουσίασαν πρωτεϊνουρία (HC, PG) ή αποκατέστησαν πλήρως φυσιολογικά επίπεδα μετά την έναρξη της ραπαμυκίνης (TG). HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, PG: ομάδα πρόληψης, TG: ομάδα θεραπείας, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο, BSA: ορός βόιου αλβουμίνης.

Πίνακας 3. Κλινική έκβαση και επίπεδα mRNA της νεφρίνης και της ποδοσίνης

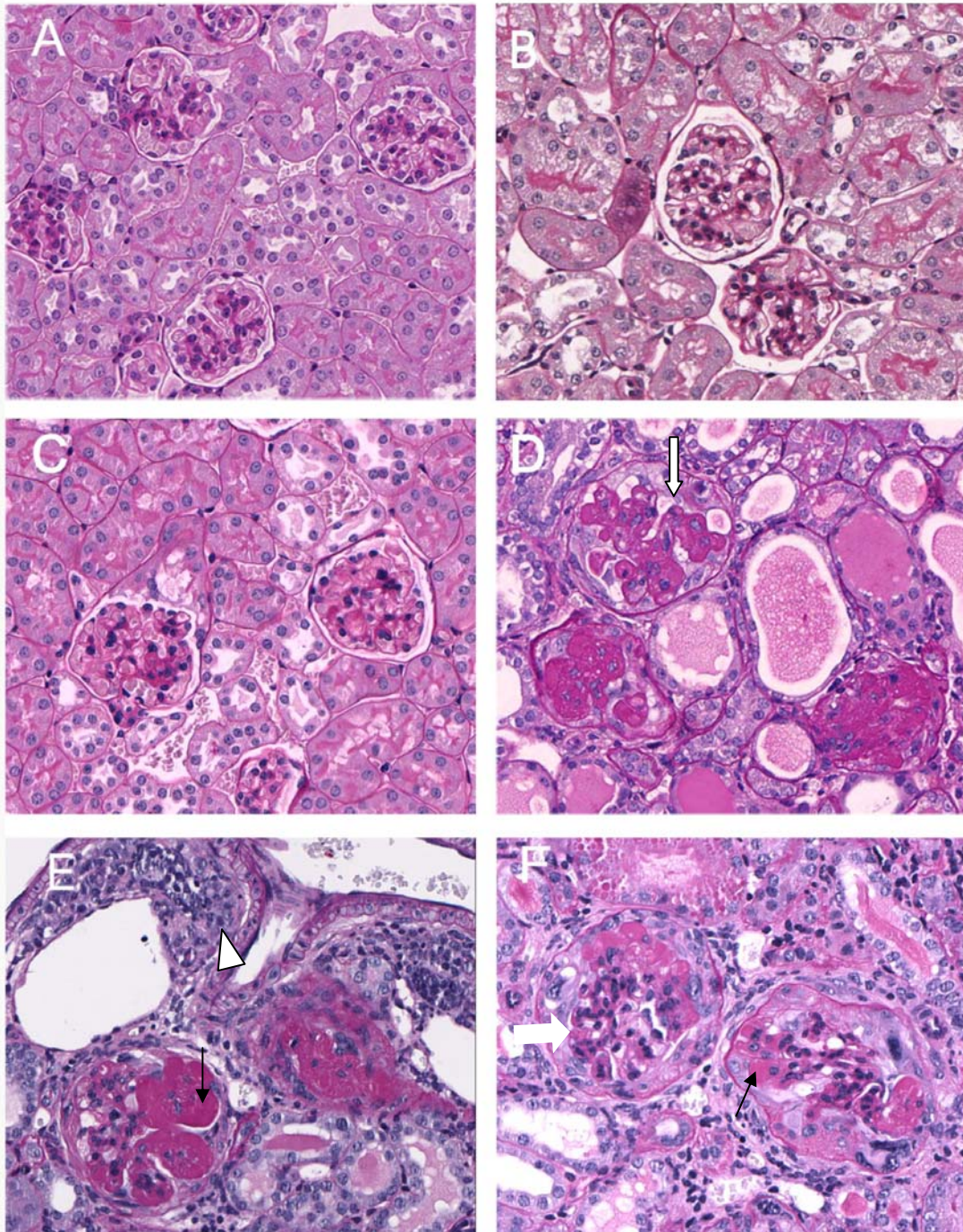
	PG	TG	HC	UG
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.24±0.05 ^d	0.32±0.12 ^e	0.28±0.04 ^f	0.58±0.24
Anti dsDNA (kU/ml)	28.6±4.7 ^g	26±3.8 ^h	30.3±10.4 ⁱ	44.3±9.8
Πρωτεΐνη ούρων κατά τη θυσία (mg/ημέρα)	2.7±1.1 ^f	2.3±1.4 ^h	2±0.9 ^f	32.2±25
Νεφρική μάζα (gr)	0.52±0.01 ^a	0.52±0.02 ^b	0.46±0.09 ^c	0.67±0.13
Σπληνική μάζα (gr)	0.20±0.05	0.15±0.04	0.17±0.11	0.26±0.1
mRNA Νεφρίνης	3.26±0.65	3.36±0.41	3.85±0.6 ⁱ	2.72±0.7
mRNA Ποδοσίνης	2.95±0.8	2.42±0.5	3.48±0.7 ^c	1.73±0.3

PG: ομάδα πρόληψης, TG: ομάδα θεραπείας, HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο, ^ap=0.009, ^bp=0.015, ^cp=0.001, ^dp<0.001, ^ep=0.008, ^fp=0.002, ^gp=0.004, ^hp=0.003, ⁱp=0.01, όλες οι τιμές p είναι έναντι της ομάδας UG. Οι τιμές για το mRNA είναι προσαρμοσμένες ως προς τη γονιδιακή έκφραση του οικείου (housekeeping) γονιδίου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH).

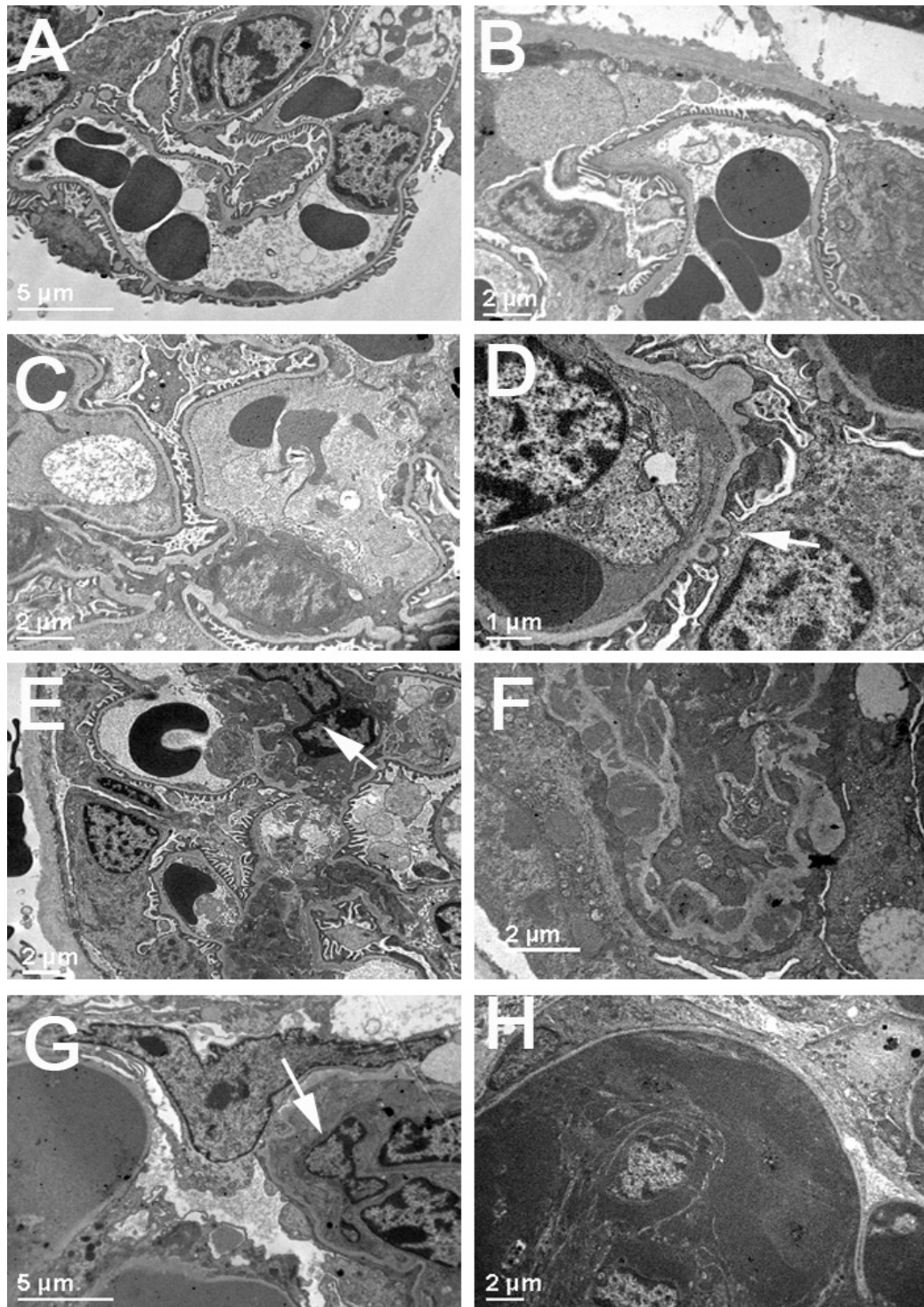
Η ραπαμυκίνη προλαμβάνει ή αποκαθιστά τις ιστολογικές βλάβες στη νεφρίτιδα του λύκου.

Στο φωτονικό μικροσκόπιο οι νεφροί από την ομάδα UG παρουσίασαν μεσαγγειακή και ενδοτριχοειδική υπερπλασία, θρόμβους υαλίνης, υπενδοθηλιακές εναποθέσεις και συρμάτινες αγκύλες (wire loops) ενώ κάποια σπειράματα εμφάνισαν τμηματική ή καθολική σκλήρυνση (Εικόνα 36_{D,E,F}). Επιπλέον υπήρχαν διάμεσες διηθήσεις (κυρίως περιαγγειακά) από κύτταρα χρόνιας φλεγμονής και ίνωση του διαμέσου ιστού η οποία συνοδευόταν από ατροφία σωληναρίων. Ορισμένα διατεταμένα σωληνάκια πληρούνταν από πρωτεϊνικό υλικό και εγγύς σωληναριακά κύτταρα περιείχαν σταγονίδια υαλίνης. Απ' την άλλη πλευρά τα νεφρά σε όλα τα ποντίκια από τις ομάδες HC και PG είχαν φυσιολογική μορφολογία (Εικόνα 36_{A,B}). Στην ομάδα TG παρατηρήθηκαν σε ελάχιστα σπειράματα μεσαγγειακή υπερπλασία και λίγοι θρόμβοι υαλίνης (Εικόνα 36_C). Οι χρώσεις για IgG και C3 στον ΑΦ ήταν αρνητικές στα θεραπευμένα και στα υγιή ζώα και θετικές στα μη θεραπευμένα.

Στο ΗΜ η ομάδα UG παρουσίαζε μαζικές μεσαγγειακές, υπενδοθηλιακές και υπό-επιθηλιακές εναποθέσεις, διάχυτη τήξη των ποδικών εκβλαστήσεων, μεσαγγειακή και ενδοτριχοειδική υπερπλασία με καθολική κατάληψη πολλών τριχοειδικών αυλών. (Εικόνα 35_{E,F,G,H}). Απ' την άλλη πλευρά, οι ομάδες PG, TG και HC παρουσίασαν φυσιολογικό πάχος ποδίσκων (αριθμητικός μέσος 352±53nm, 356±65nm και 352±41nm αντίστοιχα, p=0.3). Στα νεφρά ποντικών από τις ομάδες PG και HC (Εικόνα 37_{A,B,C}) παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης απουσία πυκνών εναποθέσεων, ενώ στην ομάδα TG παρατηρήθηκαν ελάχιστες υποεπιθηλιακές εναποθέσεις (Εικόνα 37_D).



Εικόνα 36. Φωτονικό μικροσκόπιο, νεφρικός ιστός, χρώση PAS. Τα σπειράματα, τα σωληνάρια και ο διάμεσος ιστός στα υγιή ποντίκια (A) και στην ομάδα πρόληψης (B) ήταν φυσιολογικά. Στην ομάδα θεραπείας υπήρχαν ελάχιστα σπειράματα με ήπια μεσαγγειακή υπερπλασία και λίγοι θρόμβοι υαλίνης (C). Στα μη θεραπευμένα ποντίκια παρατηρήθηκαν ποικίλου βαθμού μεσαγγειακή και ενδοτριχοειδική υπερπλασία (ανοιχτό λευκό βέλος), θρόμβοι υαλίνης (μαύρα βέλη), υπενδοθηλιακές εναποθέσεις, συρμάτινες αγκύλες (λευκό κλειστό βέλος), τμηματική ή καθολική σπειραματοσκλήρυνση (D, δεξιά κάτω). Επιπλέον υπήρχε διάμεση φλεγμονή (λευκό τρίγωνο, E), ίνωση και ατροφία σωληναρίων. Ορισμένα διατεταμένα σωληνάρια πληρούταν από πρωτεϊνικό υλικό (D στο κέντρο). Αρχική μεγέθυνση: A:300x, B:350x, C:350x, D, E, F: 400x.

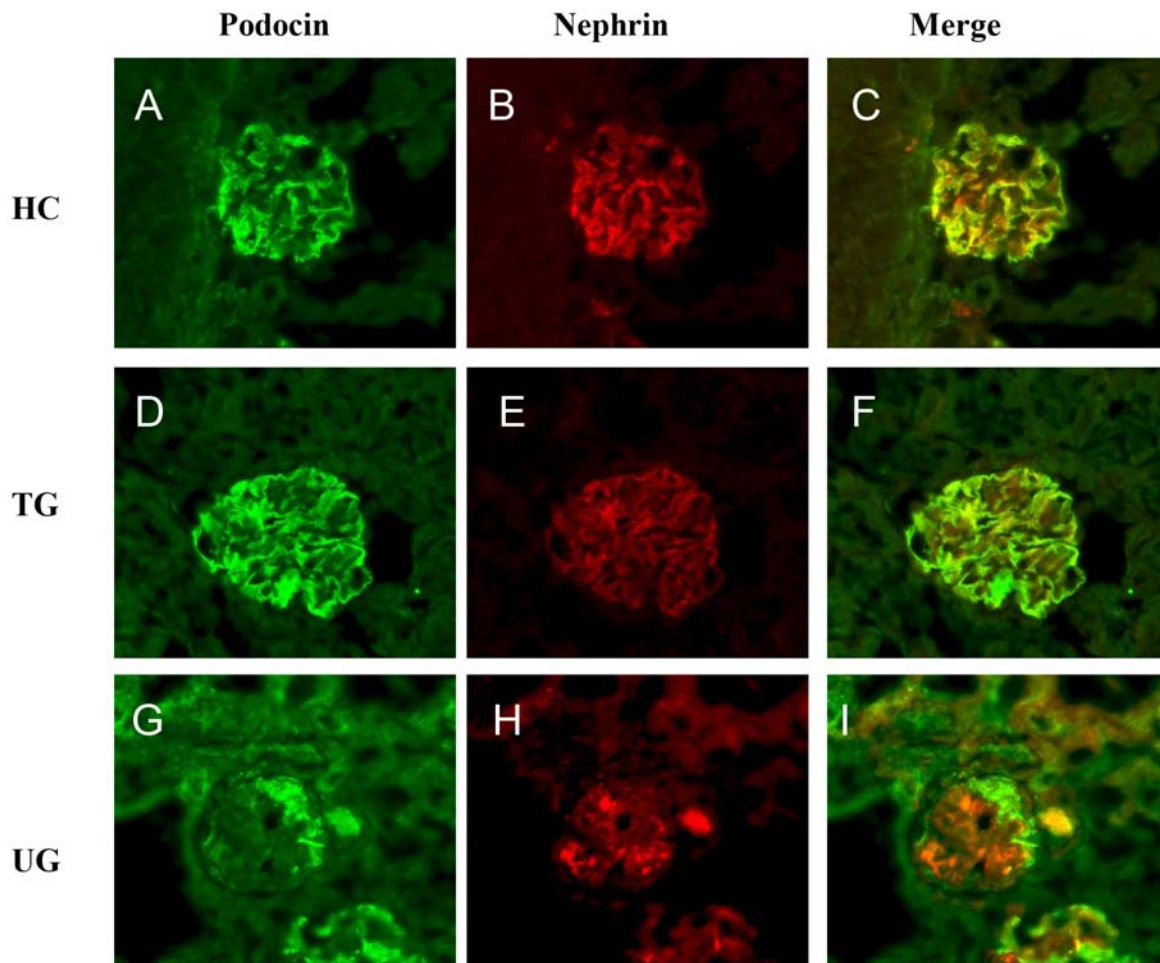


Εικόνα 37. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από δείγματα νεφρικού φλοιού. Τα ποντίκια στην ομάδα υγιών μαρτύρων (A) και στην ομάδα πρόληψης (B, C) διατήρησαν τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του σπειράματος, φυσιολογικό πάχος ποδικών εκβλαστήσεων και σχεδόν πλήρη απουσία ανοσοεναποθέσεων. Στην ομάδα θεραπείας παρατηρήθηκαν σπάνιες υποεπιθηλιακές εναποθέσεις (βέλος, D). Στην ομάδα χωρίς θεραπεία τα λιγότερο προσβεβλημένα σπειράματα παρουσίαζαν εκτεταμένες μεσαγγειακές εναποθέσεις (βέλος, E) και μέτρια-σοβαρή υπερπλασία (E). Σπειράματα με σοβαρότερη προσβολή παρουσίαζαν πλήρη απόφραξη των τριχοειδικών αυλών με

εκτεταμένες υπενδοθηλιακές και υποεπιθηλιακές εναποθέσεις (F, H), ενδοτριχοειδική υπερπλασία (βέλος στην εικόνα G) και πλήρη τήξη των ποδικών εκβλαστήσεων (F, G, H).

Η ραπαμυκίνη διατηρεί τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών του λεπτού διαφράγματος νεφρίνη και ποδοσίνη

Αναφορικά με τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της νεφρίνης και ποδοσίνης δεν υπήρξε καμία διαφορά μεταξύ της ομάδας πρόληψης, θεραπείας και υγιών μαρτύρων. (Εικόνα 30). Τα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις άλλες τρεις ομάδες (όλες οι τιμές $p < 0.001$). Στο σύνολο των ποντικών τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης σχετίζονταν αρνητικά με τα επίπεδα των πρωτεϊνών ολική Akt, Thr308pAkt και Ser473pAkt (όλες οι τιμές $p < 0.03$). Τα επίπεδα mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης βρέθηκαν αυξημένα στις ομάδες PG, TG και HC σε σχέση με αυτά στην ομάδα UG, αλλά η διαφορά έφτασε τα όρια της σημαντικότητας μόνο για την ομάδα των υγιών ποντικών (Πίνακας 3). Στον ανοσοφθορισμό τα θεραπευμένα και υγιή ποντίκια παρουσίαζαν έντονη (3+) γραμμική χρώση στις τριχοειδείς αγκύλες, τόσο για τη νεφρίνη όσο και για την ποδοσίνη. Σε μελέτες με διπλή χρώση οι δύο πρωτεΐνες ταυτίζονταν απόλυτα στο χώρο των τριχοειδικών αγκυλών. Αντίθετα στην ομάδα χωρίς θεραπεία η πλειοψηφία των πειραμάτων (77 από τα 130 που εξετάστηκαν στην ομάδα αυτή, ή 59%) παρουσίαζε τμηματική ή διάχυτη απώλεια των δυο πρωτεϊνών μαζί με ποιοτικές διαταραχές υπό την έννοια της χωροταξικής αποσύνδεσης τους καθώς και της διάχυσης τους έξω από την περιοχή των αγκυλών δηλαδή προς το μεσαγγειακό χώρο (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Μελέτη συνεντοπισμού σε νεφρικό ιστό για τη νεφρίνη (με κόκκινο χρώμα στις εικόνες B, E and H) και την ποδοσίνη (με πράσινο χρώμα A, D, G) και η συγχώνευση των αντίστοιχων εικόνων (G, F, I). Στα υγιή ποντίκια (A, B, C) και στην ομάδα θεραπείας (D, E, F) υπήρχε έντονη γραμμική χρώση και οι δύο πρωτεΐνες ταυτίζονταν απόλυτα στην περιφέρεια των τριχοειδικών αγκυλών (C, F). Αντίθετα στην ομάδα χωρίς θεραπεία (G, H, I) υπήρχε εκτεταμένη απώλεια τόσο της ποδοσίνης (G) όσο και της νεφρίνης (H) καθώς και μερική απώλεια της συσχέτισης των δύο πρωτεϊνών στο χώρο (I). HC: ομάδα ελέγχου από υγιή ποντίκια, TG: ομάδα θεραπείας, UG: ομάδα ελέγχου με λύκο. Αρχική μεγέθυνση: 400x

2.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η κινάση σερίνης-θρεονίνης mTOR στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα mTORC1 αποτελεί μια καλά μελετημένη πρωτεΐνη-στόχο στην κατωφέρεια της Akt. Η Akt μπορεί άμεσα να ενεργοποιεί το mTORC1 μέσω φωσφορυλίωσης της mTOR στη θέση Ser2448^{65, 101-103}. Η Akt μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει έμμεσα το mTORC1 μέσω του μονοπατιού των πρωτεϊνών του συμπλέγματος της οζώδους σκλήρυνσης^{100, 393}. Η ενεργοποίηση του mTORC1 έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της S6 κινάσης (p70S6K) και άλλων κινασών που ελέγχουν την σύνθεση πρωτεϊνών, τη μεταγραφή γονιδίων και τη βιογένεση των ριβοσωμάτων^{64, 394}. Η mTOR θεωρείται γενικά ως κινάση που επιστρατεύεται στην κατωφέρεια της Akt. Ωστόσο έχει βρεθεί πρόσφατα ότι η mTOR συνδεδεμένη στο σύμπλεγμα mTORC2 λειτουργεί ως υπερκείμενος ρυθμιστής της Akt συνιστώντας την κυριότερη κινάση ικανή να φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473 και έτσι να την ενεργοποιεί⁹⁷. Αν και το mTORC2 θεωρείται ανθεκτικό στη ραπαμυκίνη πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η παρατεταμένη θεραπεία με ραπαμυκίνη επιδρά αρνητικά στο σχηματισμό του mTORC2 από τις συστατικές του πρωτεΐνες και αναστέλλει κατά τον τρόπο αυτό τη δράση του επί της Akt⁶⁷. Η p70S6K μπορεί επίσης να ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στο μονοπάτι καταλύοντας μια ανασταλτική φωσφορυλίωση στις πρωτεΐνες του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης [insulin receptor substrate (IRS)] αναστέλλοντας έτσι την περαιτέρω ενεργοποίηση της PI3K από τον υποδοχέα των αυξητικών παραγόντων. Συμβάλλει με τον τρόπο αυτό στη δημιουργία ενός μηχανισμού αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης στο μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR⁶⁴ που ενδέχεται να διαταράσσεται από τη ραπαμυκίνη.

Η μελέτη του βαθμού φωσφορυλίωσης της Akt αποτελεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό και ερευνητικό εργαλείο καθώς η φωσφορυλίωσή της στη θέση Thr308 από την PI3K αποτελεί έμμεσο δείκτη ενεργοποίησης της PI3K³⁹⁵⁻³⁹⁸, ενώ η 2^η φωσφορυλίωση στη θέση Ser473 αποτελεί δείκτη πλήρους ενεργοποίησης της Akt από το mTORC2. Έτσι η πλήρης ενεργοποίηση της Akt υποδηλώνει αφενός την ύπαρξη μη κατεσταλμένου mTORC2 και αφετέρου αυξάνει την πιθανότητα οι κατωφερείς πρωτεΐνες-στόχοι της (όπως π.χ η mTOR), να είναι επίσης ενεργοποιημένες. Επιπρόσθετα η φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση Ser2448 αποτελεί άμεση απόδειξη της ενεργοποίησης της mTOR από την Akt⁶⁵ και έμμεση απόδειξη ύπαρξης

ενεργού Akt. Αναφορικά με τα ποδοκύτταρα (αλλά και τα υπόλοιπα νεφρικά κύτταρα) λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με τη δράση των κινασών Akt και mTOR. Σε μια πρόσφατη μελέτη περιγράφηκε ένα μονοπάτι διασύνδεσης μεταξύ της νεφρίνης και των κινασών PI3K και Akt, το οποίο φάνηκε να ασκεί ρυθμιστικό ρόλο επί του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων³⁹⁹. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί σε in vitro πειράματα ότι το σύμπλεγμα νεφρίνης, ποδοσίνης και CD2AP αλληλεπιδρά άμεσα με την p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K επάγοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Ser473, η οποία με τη σειρά της προάγει την επιβίωση των ποδοκυττάρων και αναστέλλει την απόπτωσή τους, μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Bad²². Ωστόσο, αν και το μονοπάτι PI3K/Akt αντιπροσωπεύει τη μόνη μέχρι σήμερα γνωστή οδό μετάδοσης σήματος από την περιοχή του λεπτού διαφράγματος προς το εσωτερικό του κυττάρου, η σημασία του σε in vivo μοντέλα πρωτεϊνουρίας παραμένει εντελώς άγνωστη²².

Στη παρούσα μελέτη οι κινάσες Akt και mTOR παρουσίασαν ένα χαμηλό επίπεδο έκφρασης και φωσφορυλίωσης στα υγιή μη πρωτεϊνουρικά ποντίκια, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR παρουσιάζει μικρού βαθμού δραστηριότητα στα υγιή σπειράματα που περιορίζεται κυρίως στα ποδοκύτταρα. Αντιθέτως είναι έντονα ενεργοποιημένο σε τμήματα σωληναρίων του φλοιού γεγονός που πιθανά σχετίζεται (ως αίτιο ή μέρος του μηχανισμού) με τον αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των νεφρικών σωληναρίων.

Σε αντίθεση με τα υγιή ποντίκια, τα ποντίκια με ΝΛ (UG) παρουσίασαν αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση των δυο κινασών στα σπειράματα παράλληλα με την ανάπτυξη σοβαρής μεσαγγειακής και ενδοτριχοειδικής υπερπλασίας. Η αυξημένη έκφραση της Thr308pAkt στα σπειραματικά κύτταρα υποδηλώνει ενεργοποίηση της PI3K, πιθανότατα από αυξητικούς παράγοντες ή/και κυτταροκίνες στη ΝΛ. Η αυξημένη έκφραση της Ser473pAkt, υποδηλώνει ότι η Akt είναι πλήρως ενεργοποιημένη αλλά και ότι οι κατωφερείς πρωτεΐνες-στόχοι της θα πρέπει να είναι ενεργοποιημένες. Πράγματι η αυξημένη έκφραση της Ser2448pTOR προσφέρει μια επιπρόσθετη απόδειξη ενεργοποίησης της Akt και συνιστά άμεση απόδειξη ενεργοποίησης της mTOR. Συνολικά θεωρούμενα, τα ευρήματα αυτά δείχνουν ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR στα σπειραματικά κύτταρα σε

ενεργό ΝΛ. Επομένως είναι λογικό να υποθέσουμε ότι οι υπερπλαστικές βλάβες που παρατηρούνται στη ΝΛ μπορεί να συνδέονται με την αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, ειδικά αν λάβουμε υπόψη μας τον παγιωμένο ρόλο της Akt και της mTOR στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού³⁸⁹. Επιπρόσθετα τα ποντίκια με ενεργό ΝΛ παρουσίασαν μειωμένη έκφραση και διαταραγμένη κατανομή και διασύνδεση των πρωτεϊνών νεφρίνη και ποδοσίνη, σε πλήρη αντιστοιχία με την εμφάνιση βαριάς πρωτεϊνουρίας και σύντηξης των ποδικών εκβλαστήσεων.

Η αναστολή της mTOR από τη ραπαμυκίνη ανέστειλε ή ανέστρεψε την εξέλιξη της νόσου, μείωσε την πρωτεϊνική έκφραση και τη δραστική συγκέντρωση των κινασών Akt και mTOR και αποκατέστησε την έκφραση και κατανομή της νεφρίνης και ποδοσίνης. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ραπαμυκίνης δείχνει με σαφήνεια ότι όχι μόνο το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR είναι ενεργοποιημένο αλλά και ότι η αναστολή του είναι χρήσιμη στην αναστροφή ή στην πρόληψη της νόσου. Διαφαίνεται επίσης ότι η ραπαμυκίνη δεν αναστέλλει απλά τη μετάδοση του σήματος από την ενεργοποιημένη mTOR στις υποκείμενες πρωτεΐνες στόχους της, αλλά αντιθέτως επιδρά και στα ίδια τα συστατικά στοιχεία του μονοπατιού καθώς μειώνει τόσο τη συγκέντρωση όσο και την ενεργοποίηση της mTOR και της Akt. Η αύξηση των συγκεντρώσεων (ολικών και ενεργών) της Akt και της TOR στη ΝΛ αποτελεί ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα της παρούσης μελέτης καθώς σε όλες σχεδόν τις *in vitro* μελέτες που εξετάζουν τις κινάσες αυτές, οι ολικές συγκεντρώσεις διατηρούνται σχετικά σταθερές και μεταβάλλεται μόνο ο βαθμός φωσφορυλίωσή τους. Επίσης, όπως θα δούμε παρακάτω, τα δεδομένα από *in vivo* μελέτες είναι ελάχιστα. Μια υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει το φαινόμενο αυτό είναι ότι η χρόνια ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί μέσω τροποποίησης του μεταγραφικού ή μεταφραστικού ελέγχου σε υπερέκφραση των κινασών αυτών στα πάσχοντα από λύκο σπειράματα. Παρόμοια ευρήματα έχουν περιγραφεί και στη διαβητική νεφροπάθεια. Για παράδειγμα σε μία μελέτη από τη Zdychonά σε παχύσαρκους διαβητικούς αρουραίους Zucker³³⁴, οι συγκεντρώσεις στα νεφρά για την ολική Akt, τη Ser473pAkt, την mTOR και τη Ser2448pTOR ήταν όλες αυξημένες. Σε μια ακόμα μελέτη βρέθηκε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της mTOR σε διαβητικά νεφρά η οποία αποκαταστάθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από

θεραπεία με ραπαμυκίνη ³³¹. Επιπλέον υπάρχουν τουλάχιστον 4 άλλες in vitro μελέτες που δείχνουν παρόμοια μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης ή της φωσφορυλίωσης της Akt ή/και της mTOR μετά από χορήγηση ραπαμυκίνης ^{18, 65, 334, 400}.

Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Thr308 στα ζώα που έλαβαν θεραπεία επίσης αποτελεί ένα ενδιαφέρον εύρημα. Έχει βρεθεί ότι η αναστολή της mTOR από τη ραπαμυκίνη καταργεί το μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που ασκείται από την ενεργοποιημένη p70S6K επί του IRS οδηγώντας έτσι σε ανεμπόδιστη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 ¹⁰⁰. Στη παρούσα μελέτη όμως δεν παρατηρήσαμε καμία αύξηση της Thr308 φωσφορυλίωσης στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία έναντι των υγιών που δεν έλαβαν καθόλου ραπαμυκίνη. Τα μόνα ζώα που παρουσίασαν αύξηση της φωσφορυλίωσης Thr308 ήταν τα άρρωστα που δεν έλαβαν ραπαμυκίνη. Επομένως η ραπαμυκίνη ίσως περιορίζει υπερκείμενα της PI3K σήματα, από αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, που ευθύνονται για την παρατηρούμενη φωσφορυλίωση στη θέση Thr308. Μια διαφορετική και κάπως αιρετική άποψη που έχει αναφερθεί σε διαφορετική περίπτωση αλλά μπορεί να εξηγήσει τα παρόντα ευρήματα είναι ότι η φωσφορυλίωση της mTOR από την Akt στη θέση Ser2448, συντελεί στη μεταφορά σημάτων διαφορετικών απ'αυτά που απαιτούνται για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της p70S6K ⁶⁵.

Ένα ακόμα εύρημα που απαιτεί μεγαλύτερη ανάλυση είναι η μείωση των συγκεντρώσεων της Ser473pAkt στα σπειράματα μετά από θεραπεία με ραπαμυκίνη. Η μείωση αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αναστολή είτε του mTORC2 είτε άλλων κινασών ικανών να φωσφορυλιώνουν της Akt στη θέση Ser473 ^{42, 93-96}. Αναστολή του σχηματισμού του συμπλέγματος mTORC2 συμβαίνει σε ορισμένες (αλλά όχι όλες) κυτταρικές σειρές μετά από παρατεταμένη χορήγηση ραπαμυκίνης ⁶⁷. Η δράση αυτή έχει προταθεί σαν ο υπεύθυνος μηχανισμός που εξηγεί τη νεφροτοξικότητα της ραπαμυκίνης και την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας σε ορισμένους μεταμοσχευμένους ασθενείς ^{175, 181}. Μέσω του ίδιου μηχανισμού βρέθηκε επίσης να μειώνεται και η έκφραση νεφρίνης και ποδοσίνης σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων ¹⁸. Στην παρούσα μελέτη η αποσύνθεση και αναστολή της λειτουργίας του mTORC2 από τη ραπαμυκίνη αποτελεί πιθανό σενάριο αλλά σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες όχι μόνο δεν οδήγησε σε πρωτεϊνουρία ή σε μείωση της έκφρασης νεφρίνης και

ποδοσίνης αλλά αντιθέτως οδήγησε σε μείωση της πρωτεϊνουρίας σε φυσιολογικά επίπεδα και σε αύξηση της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Η αντίθεση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα επίπεδα ραπαμυκίνης στο αίμα που επιτεύχθηκαν στην παρούσα μελέτη (5-10ng/ml) τα οποία ήταν πολύ χαμηλότερα σε σχέση με τις υψηλές συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης στις προαναφερόμενες μελέτες (έως και 100ng/ml). Θα πρέπει επίσης να τονίσουμε ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας του mTORC2 είναι παντελώς άγνωστοι μέχρι σήμερα. Επίσης εάν δεχθούμε ότι η mTORC2 είναι η κυρίαρχη ενεργοποιός κινάση της Akt, μιας κινάσης με κεντρικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων, τότε θα πρέπει η ρύθμιση της δραστηριότητάς της να υπόκειται σε πιο λεπτές, σύνθετες και ταχείες διαδικασίες. Στην περίπτωση αυτή είναι δύσκολο να δεχτούμε ότι η ρύθμιση της δραστηριότητάς της βασίζεται στη συναρμολόγηση ή διάλυση του συμπλόκου της, με κύρια εξάρτηση από τη ραπαμυκίνη. Αν και στις περισσότερες μελέτες εξετάζεται συνήθως μόνο η μία φωσφορυλίωση της Akt (Ser473), υπάρχουν και λίγες μελέτες που εξετάζουν και τις δυο φωσφορυλιώσεις. Στις μελέτες αυτές διαφαίνεται ότι οι δυο φωσφορυλιώσεις βαίνουν παράλληλα και ίσως να είναι και αλληλοεξαρτώμενες. Μόνο σπάνια παρατηρήθηκε αύξηση της μίας φωσφορυλίωσης χωρίς παράλληλη αύξηση της άλλης. Επομένως είναι πολύ πιθανό η ρύθμιση της δραστηριότητας του mTORC2 (και κατά συνέπεια η φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Ser473) να υπόκειται σε ανώτερη ρύθμιση από τους ίδιους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι και για την Thr308 φωσφορυλίωση, δηλαδή από αυξητικούς παράγοντες ή/και κυτταροκίνες. Αν η ραπαμυκίνη αναστέλλει τα ερεθίσματα αυτά, τότε θα μπορούσε πολύ εύκολα να αναστείλει τη φωσφορυλίωση της Akt και στις 2 θέσεις κλειδιά χωρίς να προκαλέσει αποσύνθεση του mTORC2.

Τέλος πρέπει να παρατηρήσουμε ότι τα επίπεδα των anti-dsDNA αντισωμάτων μειώθηκαν κατά 40% στα ποντίκια που έλαβαν ραπαμυκίνη (μάλιστα σε επίπεδα όμοια ή και χαμηλότερα απ'αυτά των υγιών ποντικών) σε συμφωνία με την ανοσορυθμιστική δράση της ραπαμυκίνης. Τέτοια μείωση δεν παρατηρείται μετά από θεραπεία με το κλασσικό ανοσοκατασταλτικό φάρμακο κυκλοφωσφαμίδη. Αν και μέτρια, η μείωση αυτή αποδεικνύεται αρκετή για την υποχώρηση των ανοσοεναποθέσεων.

Συμπερασματικά η παρούσα μελέτη δείχνει ότι: 1) Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νεφρίτιδας του λύκου σε ποντίκια NZBW. 2) Στη νεφρίτιδα του λύκου, η ραπαμυκίνη δεν σταματάει απλά την μεταφορά του σήματος στην κατωφέρεια της ενεργοποιημένης mTOR αλλά αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR στο σύνολο του 3) Η μονοθεραπεία με ραπαμυκίνη μπορεί να προλάβει πλήρως την εξέλιξη της νόσου εάν χορηγηθεί πρώιμα, αλλά και να αναστρέψει σε σημαντικό βαθμό τις εκδηλώσεις της ήδη εγκατεστημένης νόσου. Τα ευρήματα αυτά δικαιολογούν περαιτέρω έρευνα σε ανθρώπους που υποφέρουν από νεφρίτιδα του λύκου. Η μελέτη της δραστηριότητας του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα και γνώση πάνω στην παθογένεια της νόσου και να οδηγήσει σε πιο εξατομικευμένες και λιγότερο τοξικές θεραπείες της νεφρίτιδας του λύκου.

E. Βιβλιογραφία

1. Neal C, Crook H, Bell E, *et al.* Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1223-1235.
2. Mundel P, Shankland S. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 3005-3015.
3. Kestilä M, Männikkö M, Holmberg C, *et al.* Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 757-764.
4. Lenkkeri U, Männikkö M, McCready P, *et al.* Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; **64**: 51-61.
5. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; **1**: 575-582.
6. Patrakka J, Ruotsalainen V, Reponen P, *et al.* Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation* 2002; **73**: 394-403.
7. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; **83**: 253-307.
8. Rodewald R, Karnovsky M. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; **60**: 423-433.
9. Topham P, Kawachi H, Haydar S, *et al.* Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1559-1566.
10. Furness P, Hall L, Shaw J, *et al.* Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**: 1234-1237.
11. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, *et al.* Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; **158**: 1723-1731.
12. Luimula P, Ahola H, Wang S, *et al.* Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 2000; **58**: 1461-1468.
13. Yuan H, Takeuchi E, Taylor G, *et al.* Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 946-956.
14. Aaltonen P, Luimula P, Aström E, *et al.* Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2001; **81**: 1185-1190.

15. Bonnet F, Cooper M, Kawachi H, *et al.* Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001; **44**: 874-877.
16. Wang S, Menè P, Holthöfer H. Nephrin mRNA regulation by protein kinase C. *J Nephrol* **14**: 98-103.
17. Huwiler A, Ren S, Holthöfer H, *et al.* Inflammatory cytokines upregulate nephrin expression in human embryonic kidney epithelial cells and podocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **305**: 136-142.
18. Vollenbroeker B, George B, Wolfgart M, *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F418-426.
19. Simons M, Schwarz K, Kriz W, *et al.* Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol* 2001; **159**: 1069-1077.
20. Yuan H, Takeuchi E, Salant D. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **282**: F585-591.
21. Verma R, Wharram B, Kovari I, *et al.* Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 20716-20723.
22. Huber T, Hartleben B, Kim J, *et al.* Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 4917-4928.
23. Schwarz K, Simons M, Reiser J, *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1621-1629.
24. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, *et al.* CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F785-792.
25. Shih N, Li J, Karpitskii V, *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; **286**: 312-315.
26. Dreyer S, Zhou G, Baldini A, *et al.* Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998; **19**: 47-50.
27. Kawachi H, Kurihara H, Topham P, *et al.* Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 1997; **273**: F984-993.
28. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi M, *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 477-489.

29. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, *et al.* FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001; **59**: 1003-1012.
30. Ahola H, Heikkilä E, Aström E, *et al.* A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1731-1737.
31. Ahola H. Nephrin expression, localization and role as an interacting molecule : Emphasis on kidney glomerular podocytes.
32. Kerjaschki D, Sharkey D, Farquhar M. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1591-1596.
33. Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, *et al.* Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995; **69**: 397-403.
34. Patrie K, Drescher A, Goyal M, *et al.* The membrane-associated guanylate kinase protein MAGI-1 binds megalin and is present in glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 667-677.
35. Regoli M, Bendayan M. Expression of beta1 integrins in glomerular tissue of Streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Cell Biol* 1999; **77**: 71-78.
36. Koukouritaki S, Tamizuddin A, Lianos E. Enhanced expression of the cytoskeleton-associated proteins paxillin and focal adhesion kinase in glomerular immune injury. *J Lab Clin Med* 1999; **134**: 173-179.
37. Morino N, Matsumoto T, Ueki K, *et al.* Glomerular overexpression and increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125FAK in lupus-prone MRL/MP-lpr/lpr mice. *Immunology* 1999; **97**: 634-640.
38. Bains R, Furness P, Critchley D. A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states. *J Pathol* 1997; **183**: 272-280.
39. Hannigan G, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, *et al.* Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996; **379**: 91-96.
40. Kretzler M, Teixeira V, Unschuld P, *et al.* Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *FASEB J* 2001; **15**: 1843-1845.
41. Radeva G, Petrocelli T, Behrend E, *et al.* Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13937-13944.
42. Delcommenne M, Tan C, Gray V, *et al.* Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 11211-11216.

43. Novak A, Hsu S, Leung-Hagesteijn C, *et al.* Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 4374-4379.
44. Kobayashi N, Mominoki K, Wakisaka H, *et al.* Morphogenetic activity of extracellular matrices on cultured podocytes. Laminin accelerates podocyte process formation in vitro. *Ital J Anat Embryol* 2001; **106**: 423-430.
45. Shirato I, Sakai T, Kimura K, *et al.* Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1283-1296.
46. Whiteside C, Cameron R, Munk S, *et al.* Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1993; **142**: 1641-1653.
47. Kaplan J, Kim S, North K, *et al.* Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; **24**: 251-256.
48. Endlich N, Kress K, Reiser J, *et al.* Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 413-422.
49. Reiser J, Pixley F, Hug A, *et al.* Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication. *Kidney Int* 2000; **57**: 2035-2042.
50. Kim Y, Goyal M, Wharram B, *et al.* GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron* 2002; **90**: 471-476.
51. Wharram B, Goyal M, Gillespie P, *et al.* Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest* 2000; **106**: 1281-1290.
52. Noakes P, Miner J, Gautam M, *et al.* The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet* 1995; **10**: 400-406.
53. Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, *et al.* Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1649-1659.
54. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; **31**: 335-340.
55. Brown E, Albers M, Shin T, *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; **369**: 756-758.
56. Chiu M, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 12574-12578.

57. Sabatini D, Erdjument-Bromage H, Lui M, *et al.* RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; **78**: 35-43.
58. Harris TE, Lawrence JC, Jr. TOR signaling. *Sci STKE* 2003; **2003**: re15.
59. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 117-126.
60. Chen J, Zheng X, Brown E, *et al.* Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 4947-4951.
61. Choi J, Chen J, Schreiber S, *et al.* Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 1996; **273**: 239-242.
62. Peterson R, Beal P, Comb M, *et al.* FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7416-7423.
63. Takahashi T, Hara K, Inoue H, *et al.* Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells* 2000; **5**: 765-775.
64. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; **18**: 1926-1945.
65. Sekulic A, Hudson C, Homme J, *et al.* A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 2000; **60**: 3504-3513.
66. Brown E, Beal P, Keith C, *et al.* Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995; **377**: 441-446.
67. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; **22**: 159-168.
68. Choo A, Yoon S, Kim S, *et al.* Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 17414-17419.
69. Peterson T, Laplante M, Thoreen C, *et al.* DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009; **137**: 873-886.
70. Guertin D, Stevens D, Thoreen C, *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006; **11**: 859-871.

71. Kim D, Sarbassov D, Ali S, *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; **110**: 163-175.
72. Kim D, Sabatini D. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; **279**: 259-270.
73. Hara K, Maruki Y, Long X, *et al.* Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002; **110**: 177-189.
74. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, *et al.* The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 2003; **278**: 15461-15464.
75. Beugnet A, Wang X, Proud C. Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J Biol Chem* 2003; **278**: 40717-40722.
76. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006; **127**: 125-137.
77. Hall M. The TOR signalling pathway and growth control in yeast. *Biochem Soc Trans* 1996; **24**: 234-239.
78. Schmelzle T, Hall M. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; **103**: 253-262.
79. Crespo J, Hall M. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; **66**: 579-591, table of contents.
80. Kim D, Sarbassov D, Ali S, *et al.* GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003; **11**: 895-904.
81. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, *et al.* Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 2004; **9**: 359-366.
82. Podsypanina K, Lee R, Politis C, *et al.* An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 10320-10325.
83. Neshat M, Mellinghoff I, Tran C, *et al.* Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 10314-10319.
84. Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, *et al.* Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 2000; **14**: 895-903.

85. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, *et al.* Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice. *Science* 1999; **285**: 2122-2125.
86. Oldham S, Montagne J, Radimerski T, *et al.* Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 2000; **14**: 2689-2694.
87. Zhang H, Stallock J, Ng J, *et al.* Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 2000; **14**: 2712-2724.
88. Cheatham B, Vlahos C, Cheatham L, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4902-4911.
89. Chung J, Grammer T, Lemon K, *et al.* PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994; **370**: 71-75.
90. Brunn G, Williams J, Sabers C, *et al.* Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 1996; **15**: 5256-5267.
91. Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, *et al.* Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8035-8046.
92. Gingras A, Kennedy S, O'Leary M, *et al.* 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998; **12**: 502-513.
93. Balendran A, Casamayor A, Deak M, *et al.* PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* 1999; **9**: 393-404.
94. Chan TO, Tsichlis PN. PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* 2001; **2001**: PE1.
95. Feng J, Park J, Cron P, *et al.* Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 41189-41196.
96. Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, *et al.* Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 2004; **279**: 47720-47725.
97. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, *et al.* Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**: 1098-1101.
98. Dong L, Liu F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **289**: E187-196.
99. Feldman M, Apsel B, Uotila A, *et al.* Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009; **7**: e38.

100. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; **122**: 3589-3594.
101. Scott P, Brunn G, Kohn A, *et al.* Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 7772-7777.
102. Reynolds Tt, Bodine S, Lawrence JJ. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17657-17662.
103. Navé B, Ouwens M, Withers D, *et al.* Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999; **344 Pt 2**: 427-431.
104. Potter C, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 2001; **105**: 357-368.
105. Inoki K, Li Y, Zhu T, *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 648-657.
106. Peng X, Xu P, Chen M, *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 2003; **17**: 1352-1365.
107. Huang J, Dibble C, Matsuzaki M, *et al.* The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4104-4115.
108. Saucedo L, Gao X, Chiarelli D, *et al.* Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 566-571.
109. Sancak Y, Peterson T, Shaul Y, *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; **320**: 1496-1501.
110. Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, *et al.* Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 559-565.
111. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, *et al.* Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001; **294**: 1942-1945.
112. Tee A, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and - independent phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 37288-37296.
113. Dennis P, Jaeschke A, Saitoh M, *et al.* Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 2001; **294**: 1102-1105.

114. Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, *et al.* A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 2003; **8**: 65-79.
115. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; **30**: 214-226.
116. Verras M, Papandreou I, Lim A, *et al.* Tumor hypoxia blocks Wnt processing and secretion through the induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 7212-7224.
117. Inoki K, Zhu T, Guan K. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; **115**: 577-590.
118. Cheng S, Fryer L, Carling D, *et al.* Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15719-15722.
119. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, *et al.* Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008; **22**: 239-251.
120. Ma X, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 307-318.
121. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, *et al.* IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; **130**: 440-455.
122. Dan H, Baldwin A. Differential involvement of I κ B kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. *J Immunol* 2008; **180**: 7582-7589.
123. Pim D, Massimi P, Dilworth S, *et al.* Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 2005; **24**: 7830-7838.
124. Hardinger K, Koch M, Brennan D. Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. *Pharmacotherapy* 2004; **24**: 1159-1176.
125. Product Information: Rapamune[®] (sirolimus) Oral Solution and Tablets, Wyeth Laboratories, Division of Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc., Philadelphia 1/2006. In
126. Kelly P, Gruber S, Behbod F, *et al.* Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy* 1997; **17**: 1148-1156.
127. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, *et al.* Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation* 1995; **59**: 390-395.

128. El-Hashemite N, Zhang H, Henske E, *et al.* Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet* 2003; **361**: 1348-1349.
129. Zimmerman J, Kahan B. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol* 1997; **37**: 405-415.
130. Kahan B, Napoli K. Role of therapeutic drug monitoring of rapamycin. *Transplant Proc* 1998; **30**: 2189-2191.
131. Ferron G, Mishina E, Zimmerman J, *et al.* Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **61**: 416-428.
132. Yatscoff R, LeGatt D, Keenan R, *et al.* Blood distribution of rapamycin. *Transplantation* 1993; **56**: 1202-1206.
133. Yatscoff R, Wang P, Chan K, *et al.* Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit* 1995; **17**: 666-671.
134. Kahan B. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000; **356**: 194-202.
135. MacDonald A. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; **71**: 271-280.
136. Kahan B, Napoli K, Kelly P, *et al.* Therapeutic drug monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity. *Clin Transplant* 2000; **14**: 97-109.
137. Groth C, Bäckman L, Morales J, *et al.* Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999; **67**: 1036-1042.
138. Kreis H, Cisterne J, Land W, *et al.* Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; **69**: 1252-1260.
139. Hartmann B, Schmid G, Graeb C, *et al.* Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: a novel approach for tailored immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 2005; **68**: 2593-2598.
140. Augustine J, Knauss T, Schulak J, *et al.* Comparative effects of sirolimus and mycophenolate mofetil on erythropoiesis in kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2004; **4**: 2001-2006.

141. Grinyó J, Cruzado J. Mycophenolate mofetil and sirolimus combination in renal transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1991-1999.
142. Murgia M, Jordan S, Kahan B. The side effect profile of sirolimus: a phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients. *Kidney Int* 1996; **49**: 209-216.
143. Groth C, Brattström C, Claesson K, *et al.* New trails in transplantation: how to exploit the potential of sirolimus in clinical transplantation. *Transplant Proc* 1998; **30**: 4064-4065.
144. Langer R, Van Buren C, Katz S, *et al.* De novo hemolytic uremic syndrome after kidney transplantation in patients treated with cyclosporine-sirolimus combination. *Transplantation* 2002; **73**: 756-760.
145. Fortin M, Raymond M, Madore F, *et al.* Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporin-sirolimus combination. *Am J Transplant* 2004; **4**: 946-952.
146. Kraemer F, Takeda D, Natu V, *et al.* Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism* 1998; **47**: 555-559.
147. Brattström C, Wilczek H, Tydén G, *et al.* Hypertriglyceridemia in renal transplant recipients treated with sirolimus. *Transplant Proc* 1998; **30**: 3950-3951.
148. Kasiske B, de Mattos A, Flechner S, *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; **8**: 1384-1392.
149. van Gelder T, ter Meulen C, Hené R, *et al.* Oral ulcers in kidney transplant recipients treated with sirolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2003; **75**: 788-791.
150. Smith M, Newstead C, Ahmad N, *et al.* Poor tolerance of sirolimus in a steroid avoidance regimen for renal transplantation. *Transplantation* 2008; **85**: 636-639.
151. Champion L, Stern M, Israël-Biet D, *et al.* Brief communication: sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Ann Intern Med* 2006; **144**: 505-509.
152. Morelon E, Stern M, Kreis H. Interstitial pneumonitis associated with sirolimus therapy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2000; **343**: 225-226.
153. Pham P, Pham P, Danovitch G, *et al.* Sirolimus-associated pulmonary toxicity. *Transplantation* 2004; **77**: 1215-1220.
154. Weiner S, Sellin L, Vonend O, *et al.* Pneumonitis associated with sirolimus: clinical characteristics, risk factors and outcome--a single-centre experience and review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 3631-3637.

155. Andoh T, Lindsley J, Franceschini N, *et al.* Synergistic effects of cyclosporine and rapamycin in a chronic nephrotoxicity model. *Transplantation* 1996; **62**: 311-316.
156. Shihab F, Bennett W, Yi H, *et al.* Sirolimus increases transforming growth factor-beta1 expression and potentiates chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004; **65**: 1262-1271.
157. Saunders R, Bicknell G, Nicholson M. The impact of cyclosporine dose reduction with or without the addition of rapamycin on functional, molecular, and histological markers of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003; **75**: 772-780.
158. Gallon L, Perico N, Dimitrov B, *et al.* Long-term renal allograft function on a tacrolimus-based, pred-free maintenance immunosuppression comparing sirolimus vs. MMF. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1617-1623.
159. Mendez R, Gonwa T, Yang H, *et al.* A prospective, randomized trial of tacrolimus in combination with sirolimus or mycophenolate mofetil in kidney transplantation: results at 1 year. *Transplantation* 2005; **80**: 303-309.
160. Kobashigawa J, Miller L, Russell S, *et al.* Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1377-1386.
161. Kaplan B, Kirk A. Tacrolimus and sirolimus: when bad things happen to good drugs. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1501-1502.
162. McTaggart R, Gottlieb D, Brooks J, *et al.* Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 2003; **3**: 416-423.
163. Stallone G, Di Paolo S, Schena A, *et al.* Addition of sirolimus to cyclosporine delays the recovery from delayed graft function but does not affect 1-year graft function. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 228-233.
164. Smith K, Wrenshall L, Nicosia R, *et al.* Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1037-1045.
165. Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, *et al.* Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transpl Int* 2004; **17**: 215-220.
166. Butani L. Investigation of pediatric renal transplant recipients with heavy proteinuria after sirolimus rescue. *Transplantation* 2004; **78**: 1362-1366.
167. Izzedine H, Brocheriou I, Frances C. Post-transplantation proteinuria and sirolimus. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2088-2089.

168. Senior P, Paty B, Cockfield S, *et al.* Proteinuria developing after clinical islet transplantation resolves with sirolimus withdrawal and increased tacrolimus dosing. *Am J Transplant* 2005; **5**: 2318-2323.
169. Letavernier E, Pe'raldi M, Pariente A, *et al.* Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation* 2005; **80**: 1198-1203.
170. Sennesael J, Bosmans J, Bogers J, *et al.* Conversion from cyclosporine to sirolimus in stable renal transplant recipients. *Transplantation* 2005; **80**: 1578-1585.
171. Morelon E, Kreis H. Sirolimus therapy without calcineurin inhibitors: Necker Hospital 8-year experience. *Transplant Proc* 2003; **35**: 52S-57S.
172. Horita Y, Miyazaki M, Koji T, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13**: 2519-2528.
173. Laurinavicius A, Hurwitz S, Rennke H. Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: a clinicopathological and follow-up study. *Kidney Int* 1999; **56**: 2203-2213.
174. Stephany B, Augustine J, Krishnamurthi V, *et al.* Differences in proteinuria and graft function in de novo sirolimus-based vs. calcineurin inhibitor-based immunosuppression in live donor kidney transplantation. *Transplantation* 2006; **82**: 368-374.
175. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, *et al.* High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; **2**: 326-333.
176. Diekmann F, Gutiérrez-Dalmau A, López S, *et al.* Influence of sirolimus on proteinuria in de novo kidney transplantation with expanded criteria donors: comparison of two CNJ-free protocols. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 2316-2321.
177. Aliabadi A, Pohanka E, Seebacher G, *et al.* Development of proteinuria after switch to sirolimus-based immunosuppression in long-term cardiac transplant patients. *Am J Transplant* 2008; **8**: 854-861.
178. Schena F, Pascoe M, Alberu J, *et al.* Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009; **87**: 233-242.
179. Pinheiro H, Amaro T, Braga A, *et al.* Post-rapamycin proteinuria: incidence, evolution, and therapeutic handling at a single center. *Transplant Proc* 2006; **38**: 3476-3478.
180. Straathof-Galema L, Wetzels J, Dijkman H, *et al.* Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; **6**: 429-433.
181. Letavernier E, Bruneval P, Vandermeersch S, *et al.* Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**: 630-638.

182. Pelletier R, Nadasdy T, Nadasdy G, *et al.* Acute renal failure following kidney transplantation associated with myoglobinuria in patients treated with rapamycin. *Transplantation* 2006; **82**: 645-650.
183. Zuber J, Anglicheau D, Elie C, *et al.* Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; **8**: 1471-1479.
184. Hardinger K, Cornelius L, Trulock Er, *et al.* Sirolimus-induced leukocytoclastic vasculitis. *Transplantation* 2002; **74**: 739-743.
185. Pasqualotto A, Bianco P, Sukiennik T, *et al.* Sirolimus-induced leukocytoclastic vasculitis: the second case reported. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1549-1551.
186. Stallone G, Infante B, Di Paolo S, *et al.* Sirolimus and angiotensin-converting enzyme inhibitors together induce tongue oedema in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 2906-2908.
187. Mahé E, Morelon E, Lechaton S, *et al.* Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation* 2005; **79**: 476-482.
188. Desai N, Heenan S, Mortimer P. Sirolimus-associated lymphoedema: eight new cases and a proposed mechanism. *Br J Dermatol* 2009; **160**: 1322-1326.
189. Steele G, Adamkovic A, Demopoulos L, *et al.* Pericardial effusion coincident with sirolimus therapy: a review of Wyeth's safety database. *Transplantation* 2008; **85**: 645-647.
190. Kaplan B, Meier-Kriesche H, Napoli K, *et al.* The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **63**: 48-53.
191. Vu M, Qi S, Xu D, *et al.* Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; **64**: 1853-1856.
192. McAlister V, Mahalati K, Peltekian K, *et al.* A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 346-350.
193. Hong J, Kahan B. Sirolimus rescue therapy for refractory rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; **71**: 1579-1584.
194. Swanson S, Hale D, Mannon R, *et al.* Kidney transplantation with rabbit antithymocyte globulin induction and sirolimus monotherapy. *Lancet* 2002; **360**: 1662-1664.
195. Chiang G, Abraham R. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 433-442.

196. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; **8**: 128-135.
197. Land S, Tee A. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 2007; **282**: 20534-20543.
198. Nührenberg T, Voisard R, Fahlisch F, *et al.* Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *FASEB J* 2005; **19**: 246-248.
199. Yard B, Pancham R, Paape M, *et al.* CsA, FK506, corticosteroids and rapamycin inhibit TNF alpha production by cultured PTEC. *Kidney Int* 1993; **44**: 352-358.
200. Lock HR, Sacks SH, Robson MG. Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F76-81.
201. Laugharne M, Cross S, Richards S, *et al.* Sirolimus toxicity and vascular endothelial growth factor release from islet and renal cell lines. *Transplantation* 2007; **83**: 1635-1638.
202. Lieberthal W, Fuhro R, Andry C, *et al.* Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance. *Transplantation* 2006; **82**: 17-22.
203. Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, *et al.* Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **294**: C22-28.
204. Witzgall R. Are renal proximal tubular epithelial cells constantly prepared for an emergency? Focus on "the proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **294**: C1-3.
205. Shankland S. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; **69**: 2131-2147.
206. Huang S, Houghton P. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat* 2001; **4**: 378-391.
207. Kang C, Hong Y, Dhe-Paganon S, *et al.* FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* 2008; **16**: 318-325.
208. Bansbach C, Wancio D, Caccese R, *et al.* Rapamycin's inhibition of thymocyte proliferation, unlike that of cyclosporin A or prednisolone, is not associated with cytotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **685**: 114-116.

209. Gadir N, Jackson D, Lee E, *et al.* Defective TGF-beta signaling sensitizes human cancer cells to rapamycin. *Oncogene* 2008; **27**: 1055-1062.
210. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, *et al.* Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int* 2006; **70**: 1019-1025.
211. Shen C, Lancaster C, Shi B, *et al.* TOR signaling is a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 7007-7017.
212. Krämer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, *et al.* Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **294**: F440-449.
213. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, *et al.* Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2001; **145**: 438-445.
214. Martel R, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; **55**: 48-51.
215. Thomson A, Propper D, Woo J, *et al.* Comparative effects of rapamycin, FK 506 and cyclosporine on antibody production, lymphocyte populations and immunoglobulin isotype switching in the rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993; **15**: 355-369.
216. Halloran P. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2715-2729.
217. Sehgal S. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003; **35**: 7S-14S.
218. Chiang P, Wang L, Bonham C, *et al.* Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway. *J Immunol* 2004; **172**: 1355-1363.
219. Monti P, Mercalli A, Leone B, *et al.* Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* 2003; **75**: 137-145.
220. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; **105**: 4743-4748.
221. Tian L, Lu L, Yuan Z, *et al.* Acceleration of apoptosis in CD4+CD8+ thymocytes by rapamycin accompanied by increased CD4+CD25+ T cells in the periphery. *Transplantation* 2004; **77**: 183-189.
222. Dixon R, Brunskill N. Activation of mitogenic pathways by albumin in kidney proximal tubule epithelial cells: implications for the pathophysiology of proteinuric states. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 1487-1497.

223. Lieberthal W, Fuhro R, Andry C, *et al.* Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F693-706.
224. Chen J, Chen J, Neilson E, *et al.* Role of EGF receptor activation in angiotensin II-induced renal epithelial cell hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1615-1623.
225. Pallet N, Thervet E, Le Corre D, *et al.* Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int* 2005; **67**: 2422-2433.
226. Shen W, Brown N, Finn P, *et al.* Akt and Mammalian target of rapamycin regulate separate systems of proteolysis in renal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2414-2423.
227. Eddy A. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**: 1273-1287.
228. Fan J, Ng Y, Hill P, *et al.* Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; **56**: 1455-1467.
229. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007; **178**: 437-451.
230. Copeland J, Beaumont B, Merrilees M, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of human proximal tubular epithelial cells: effects of rapamycin, mycophenolate, cyclosporin, azathioprine, and methylprednisolone. *Transplantation* 2007; **83**: 809-814.
231. Wu M, Wen M, Chiu Y, *et al.* Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 2006; **69**: 2029-2036.
232. Zhang L, Li J, Young L, *et al.* AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 17272-17277.
233. Swinford R, Pascual M, Diamant D, *et al.* Rapamycin increases transforming growth factor-beta mRNA expression in immortalized rat proximal renal tubular cells. *Transplantation* 2002; **73**: 319-320.
234. Shegogue D, Trojanowska M. Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 23166-23175.
235. Winbanks C, Grimwood L, Gasser A, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR pathways in the regulation of renal fibroblast function and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 206-219.

236. Russo L, Sandoval R, McKee M, *et al.* The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* 2007; **71**: 504-513.
237. Mreich E, Coombes J, Rangan G. Sirolimus does not reduce receptor-mediated endocytosis of albumin in proximal tubule cells. *Transplantation* 2007; **83**: 105-107.
238. Kim M, Park J, Ha H, *et al.* Rapamycin inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen, but not fibronectin, synthesis in rat mesangial cells. *Yonsei Med J* 2004; **45**: 1121-1126.
239. Lock H, Sacks S, Robson M. Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F76-81.
240. Wang W, Chan YH, Lee W, *et al.* Effect of rapamycin and FK506 on mesangial cell proliferation. *Transplant Proc* 2001; **33**: 1036-1037.
241. Nagai K, Matsubara T, Mima A, *et al.* Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; **68**: 552-561.
242. Solà-Vilà D, Camacho M, Solà R, *et al.* IL-1beta induces VEGF, independently of PGE2 induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells. *Kidney Int* 2006; **70**: 1935-1941.
243. Varghese Z, Fernando R, Moorhead J, *et al.* Effects of sirolimus on mesangial cell cholesterol homeostasis: a novel mechanism for its action against lipid-mediated injury in renal allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F43-48.
244. Daniel C, Pippin J, Shankland S, *et al.* The rapamycin derivative RAD inhibits mesangial cell migration through the CDK-inhibitor p27KIP1. *Lab Invest* 2004; **84**: 588-596.
245. van den Akker J, Wetzels J, Hoitsma A. Proteinuria following conversion from azathioprine to sirolimus in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2006; **70**: 1355-1357.
246. Brukamp K, Jim B, Moeller M, *et al.* Hypoxia and podocyte-specific Vhlh deletion confer risk of glomerular disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F1397-1407.
247. Schiffer M, Bitzer M, Roberts I, *et al.* Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001; **108**: 807-816.
248. Foster R, Saleem M, Mathieson P, *et al.* Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: F48-57.
249. D'Agati V. Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney Int* 2008; **73**: 399-406.

250. Vollenbröker B, George B, Wolfgart M, *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F418-426.
251. Eremina V, Baelde H, Quaggin S. Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol* 2007; **106**: p32-37.
252. Eremina V, Sood M, Haigh J, *et al.* Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; **111**: 707-716.
253. Izzedine H, Rixe O, Billefont B, *et al.* Angiogenesis inhibitor therapies: focus on kidney toxicity and hypertension. *Am J Kidney Dis* 2007; **50**: 203-218.
254. Mathieson P. How much VEGF do you need? *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 602-603.
255. Amaravadi R, Thompson C. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2618-2624.
256. Di Joseph J, Sehgal S. Functional and histopathologic effects of rapamycin on mouse kidney. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993; **15**: 45-56.
257. DiJoseph J, Mihatsch M, Sehgal S. Influence of rat strain on rapamycin's kidney effects. *Transplant Proc* 1993; **25**: 714-715.
258. Andoh T, Burdmann E, Fransechini N, *et al.* Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int* 1996; **50**: 1110-1117.
259. Golbaekdal K, Nielsen C, Djurhuus J, *et al.* Effects of rapamycin on renal hemodynamics, water and sodium excretion, and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide, and vasopressin in pigs. *Transplantation* 1994; **58**: 1153-1157.
260. Nielsen F, Starklint H, Dieperink H. Impaired glomerular and tubular function as a short-term effect of sirolimus treatment in the rat. *Am J Nephrol* 2005; **25**: 411-416.
261. Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, *et al.* Acute effects of rapamycin on glomerular dynamics: a micropuncture study in the rat. *Transplantation* 2000; **69**: 1946-1990.
262. Thliveris J, Yatscoff R. Effect of rapamycin on morphological and functional parameters in the kidney of the rabbit. *Transplantation* 1995; **59**: 427-429.
263. Boletta A, Germino G. Role of polycystins in renal tubulogenesis. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 484-492.
264. Boca M, Distefano G, Qian F, *et al.* Polycystin-1 induces resistance to apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 637-647.

265. Distefano G, Boca M, Rowe I, *et al.* Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 2359-2371.
266. Nijland M, Schlabritz-Loutsevitch N, Hubbard G, *et al.* Non-human primate fetal kidney transcriptome analysis indicates mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central nutrient-responsive pathway. *J Physiol* 2007; **579**: 643-656.
267. Han H, Sigurdson W, Nickerson P, *et al.* Both mitogen activated protein kinase and the mammalian target of rapamycin modulate the development of functional renal proximal tubules in matrigel. *J Cell Sci* 2004; **117**: 1821-1833.
268. Morales J, Andrés A, Dominguez-Gil B, *et al.* Tubular function in patients with hypokalemia induced by sirolimus after renal transplantation. *Transplant Proc* 2003; **35**: 154S-156S.
269. Kahan B. Two-year results of multicenter phase III trials on the effect of the addition of sirolimus to cyclosporine-based immunosuppressive regimens in renal transplantation. *Transplant Proc* 2003; **35**: 37S-51S.
270. Mota A, Arias M, Taskinen E, *et al.* Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant* 2004; **4**: 953-961.
271. Shillingford J, Murcia N, Larson C, *et al.* The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 5466-5471.
272. Baba M, Furihata M, Hong S, *et al.* Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. *J Natl Cancer Inst* 2008; **100**: 140-154.
273. Wahl P, Serra A, Le Hir M, *et al.* Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 598-604.
274. Wahl P, Le Hir M, Vogetseder A, *et al.* Mitotic activation of Akt signalling pathway in Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007; **12**: 357-363.
275. Edelstein C. Mammalian target of rapamycin and caspase inhibitors in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1219-1226.
276. Wu M, Wahl P, Le Hir M, *et al.* Everolimus retards cyst growth and preserves kidney function in a rodent model for polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2007; **30**: 253-259.
277. Serra A, Poster D, Kistler A, *et al.* Sirolimus and Kidney Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2010.

278. Walz G, Budde K, Mannaa M, *et al.* Everolimus in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2010.
279. Le Tourneau C, Faivre S, Serova M, *et al.* mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? *Br J Cancer* 2008; **99**: 1197-1203.
280. Luan F, Hojo M, Maluccio M, *et al.* Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* 2002; **73**: 1565-1572.
281. Luan F, Ding R, Sharma V, *et al.* Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. *Kidney Int* 2003; **63**: 917-926.
282. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, *et al.* Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356**: 2271-2281.
283. Al-Saleem T, Wessner L, Scheithauer B, *et al.* Malignant tumors of the kidney, brain, and soft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. *Cancer* 1998; **83**: 2208-2216.
284. Henske E. Tuberous sclerosis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond. *Pediatr Nephrol* 2005; **20**: 854-857.
285. Kenerson H, Aicher L, True L, *et al.* Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. *Cancer Res* 2002; **62**: 5645-5650.
286. Kenerson H, Dundon T, Yeung R. Effects of rapamycin in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex. *Pediatr Res* 2005; **57**: 67-75.
287. Wienecke R, Fackler I, Linsenmaier U, *et al.* Antitumoral activity of rapamycin in renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex. *Am J Kidney Dis* 2006; **48**: e27-29.
288. Krischock L, Beach R, Taylor J. Sirolimus and tuberous sclerosis-associated renal angiomyolipomas. *Arch Dis Child* 2010; **95**: 391-392.
289. Liu Y. Rapamycin and chronic kidney disease: beyond the inhibition of inflammation. *Kidney Int* 2006; **69**: 1925-1927.
290. Inman S, Davis N, Olson K, *et al.* Rapamycin preserves renal function compared with cyclosporine A after ischemia/reperfusion injury. *Urology* 2003; **62**: 750-754.
291. Jain S, Bicknell G, Whiting P, *et al.* Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; **33**: 556-558.
292. Yang B, Jain S, Pawluczyk I, *et al.* Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int* 2005; **68**: 2050-2067.

293. Viklický O, Bohmová R, Ouyang N, *et al.* Effect of sirolimus on renal ischaemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats. *Transpl Int* 2004; **17**: 432-441.
294. Simon J, Swanson S, Agodoa L, *et al.* Induction sirolimus and delayed graft function after deceased donor kidney transplantation in the United States. *Am J Nephrol* 2004; **24**: 393-401.
295. Lisik W, Kahan B. Individualization of immunosuppressive therapy. II. Sirolimus as a less nephrotoxic alternative to calcineurin inhibitors. *Transplant Proc* 2006; **38**: 69-73.
296. Loverre A, Ditunno P, Crovace A, *et al.* Ischemia-reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and antiapoptotic pathways: differential modulation by rapamycin. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2675-2686.
297. Couser W. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; **353**: 1509-1515.
298. Marshall C, Shankland S. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol* 2006; **102**: e39-48.
299. Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, *et al.* PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 2005; **11**: 933-935.
300. Zoja C, Casiraghi F, Conti S, *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibition limits glomerulonephritis and extends lifespan of mice with systemic lupus. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 1629-1637.
301. Bonegio RG, Fuhro R, Wang Z, *et al.* Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 2063-2072.
302. Naumovic R, Jovovic D, Basta-Jovanovic G, *et al.* Effects of rapamycin on active Heymann nephritis. *Am J Nephrol* 2007; **27**: 379-389.
303. Daniel C, Ziswiler R, Frey B, *et al.* Proinflammatory effects in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis of the immunosuppressive agent SDZ RAD, a rapamycin derivative. *Exp Nephrol* 2000; **8**: 52-62.
304. Rangan GK, Coombes JD. Renoprotective effects of sirolimus in non-immune initiated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 2175-2182.
305. Coombes JD, Mreich E, Liddle C, *et al.* Rapamycin worsens renal function and intratubular cast formation in protein overload nephropathy. *Kidney Int* 2005; **68**: 2599-2607.

306. Tsagalis G, Psimenou E, Iliadis A, *et al.* Rapamycin for focal segmental glomerulosclerosis: a report of 3 cases. *Am J Kidney Dis* 2009; **54**: 340-344.
307. Skhiri H, Morelon E, Noel L, *et al.* Unusual post-transplantation recurrence of focal segmental glomerulosclerosis which resolved with cyclosporine but not with sirolimus. *Transpl Int* 2005; **18**: 458-460.
308. Tumlin J, Miller D, Near M, *et al.* A prospective, open-label trial of sirolimus in the treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 109-116.
309. Cho M, Hurley J, Kopp J. Sirolimus therapy of focal segmental glomerulosclerosis is associated with nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 2007; **49**: 310-317.
310. Daniel C, Renders L, Amann K, *et al.* Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat. *Am J Transplant* 2005; **5**: 2849-2861.
311. Wittmann S, Daniel C, Braun A, *et al.* The mTOR inhibitor everolimus attenuates the time course of chronic anti-Thy1 nephritis in the rat. *Nephron Exp Nephrol* 2008; **108**: e45-56.
312. Keller K, Daniel C, Schocklmann H, *et al.* Everolimus inhibits glomerular endothelial cell proliferation and VEGF, but not long-term recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 2724-2735.
313. Alperovich G, Rama I, Lloberas N, *et al.* New immunosuppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis. *Lupus* 2007; **16**: 18-24.
314. Lui SL, Yung S, Tsang R, *et al.* Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Lupus* 2008; **17**: 305-313.
315. Ramos-Barron A, Pinera-Haces C, Gomez-Alamillo C, *et al.* Prevention of murine lupus disease in (NZBxNZW)F1 mice by sirolimus treatment. *Lupus* 2007; **16**: 775-781.
316. Lui SL, Tsang R, Chan KW, *et al.* Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 2768-2776.
317. Reddy PS, Legault HM, Sypek JP, *et al.* Mapping similarities in mTOR pathway perturbations in mouse lupus nephritis models and human lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**: R127.
318. Warner LM, Adams LM, Sehgal SN. Rapamycin prolongs survival and arrests pathophysiologic changes in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 289-297.

319. Fernandez D, Bonilla E, Mirza N, *et al.* Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 2983-2988.
320. Stylianou K, Petrakis I, Mavroeidi V, *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 2010: gfq496.
321. Ding M, Cui S, Li C, *et al.* Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 2006; **12**: 1081-1087.
322. Hohegger K, Jansky G, Soleiman A, *et al.* Differential effects of rapamycin in anti-GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1520-1529.
323. Fervenza FC, Fitzpatrick PM, Mertz J, *et al.* Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 1288-1292.
324. Aymanns C, Voehringer M, Rasche F, *et al.* Effects of sirolimus on proteinuria and renal function in focal segmental glomerulonephritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006; **44**: 675-676.
325. Pollak M. Focal segmental glomerulosclerosis: recent advances. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; **17**: 138-142.
326. Patel P, Pal S, Ashley C, *et al.* Combination therapy with sirolimus (rapamycin) and tacrolimus (FK-506) in treatment of refractory minimal change nephropathy, a clinical case report. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 985-987.
327. Davison R, Fenwick S. The combined use of sirolimus and cyclosporin in the management of refractory minimal change nephropathy: 'a novel use of sirolimus'. *NDT Plus* 2009; **2**: 368-369.
328. Constantinescu A, Liang M, Laskow D. Sirolimus lowers myeloperoxidase and p-ANCA titers in a pediatric patient before kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2002; **40**: 407-410.
329. Baeder W, Sredy J, Sehgal S, *et al.* Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice. *Clin Exp Immunol* 1992; **89**: 174-178.
330. Lee M, Feliars D, Mariappan M, *et al.* A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F617-627.
331. Lloberas N, Cruzado J, Franquesa M, *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1395-1404.

332. Sataranatarajan K, Mariappan M, Lee M, *et al.* Regulation of elongation phase of mRNA translation in diabetic nephropathy: amelioration by rapamycin. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1733-1742.
333. Yang Y, Wang J, Qin L, *et al.* Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats. *Am J Nephrol* 2007; **27**: 495-502.
334. Zdychová J, Kazdová L, Pelikanová T, *et al.* Renal activity of Akt kinase in obese Zucker rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; **233**: 1231-1241.
335. Chen JK, Chen J, Neilson EG, *et al.* Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1384-1391.
336. Vogelbacher R, Wittmann S, Braun A, *et al.* The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation* 2007; **84**: 1492-1499.
337. Diekmann F, Rovira J, Carreras J, *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 2653-2660.
338. Rovira J, Arellano E, Carreras J, *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition prevents glomerular hypertrophy in a model of renal mass reduction. *Transplantation* 2009; **88**: 646-652.
339. Damião M, Bertocchi A, Monteiro R, *et al.* The effects of rapamycin in the progression of renal fibrosis. *Transplant Proc* 2007; **39**: 457-459.
340. Schaefer L, Tsalastra W, Babelova A, *et al.* Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol* 2007; **170**: 301-315.
341. Teng D, Lu Y, Gao R, *et al.* Comparison of rapamycin versus FK506 on expression of cytoprotective genes in the rat kidney allografts undergoing chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2006; **38**: 2172-2175.
342. Ninova D, Covarrubias M, Rea D, *et al.* Acute nephrotoxicity of tacrolimus and sirolimus in renal isografts: differential intragraft expression of transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin. *Transplantation* 2004; **78**: 338-344.
343. Shihab F, Bennett W, Yi H, *et al.* Combination therapy with sirolimus and mycophenolate mofetil: effects on the kidney and on transforming growth factor-beta1. *Transplantation* 2004; **77**: 683-686.
344. Finckenberg P, Inkinen K, Ahonen J, *et al.* Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am J Pathol* 2003; **163**: 355-366.

345. Shihab F, Bennett W, Yi H, *et al.* Effect of cyclosporine and sirolimus on the expression of connective tissue growth factor in rat experimental chronic nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2006; **26**: 400-407.
346. Flechner S, Kurian S, Solez K, *et al.* De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1776-1785.
347. Flechner SM, Goldfarb D, Solez K, *et al.* Kidney transplantation with sirolimus and mycophenolate mofetil-based immunosuppression: 5-year results of a randomized prospective trial compared to calcineurin inhibitor drugs. *Transplantation* 2007; **83**: 883-892.
348. Anil Kumar MS, Irfan Saeed M, Ranganna K, *et al.* Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes. *Transpl Immunol* 2008; **20**: 32-42.
349. Saurina A, Campistol J, Lario S, *et al.* Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in kidney transplant patients reduces the urinary transforming growth factor-beta1 concentration. *Transplant Proc* 2007; **39**: 2138-2141.
350. Diekmann F, Budde K, Slowinski T, *et al.* Conversion to sirolimus for chronic allograft dysfunction: long-term results confirm predictive value of proteinuria. *Transpl Int* 2008; **21**: 152-155.
351. Letavernier E, Legendre C. mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management. *Transplant Rev (Orlando)* 2008; **22**: 125-130.
352. Bumbea V, Kamar N, Ribes D, *et al.* Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 2517-2523.
353. Kuypers D. Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation. *Drug Saf* 2005; **28**: 153-181.
354. Saurina A, Campistol J, Piera C, *et al.* Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft dysfunction: changes in glomerular haemodynamics and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 488-493.
355. Ruiz J, Campistol J, Sánchez-Fructuoso A, *et al.* Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 3252-3257.
356. Russ G, Jamieson N, Oberbauer R, *et al.* Three-year health-related quality-of-life outcomes for sirolimus-treated kidney transplant patients after elimination of cyclosporine. *Transpl Int* 2007; **20**: 875-883.

357. Ramanathan V, Suki W, Rosen D, *et al.* Chronic allograft nephropathy and nephrotic range proteinuria. *Clin Transplant* 2005; **19**: 413-417.
358. Stokes M, De Palma J. Post-transplantation nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2006; **69**: 1088-1091.
359. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, *et al.* Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; **357**: 2562-2575.
360. Bakker R, Hollander A, Mallat M, *et al.* Conversion from cyclosporine to azathioprine at three months reduces the incidence of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2003; **64**: 1027-1034.
361. Ducloux D, Motte G, Billerey C, *et al.* Cyclosporin withdrawal with concomitant conversion from azathioprine to mycophenolate mofetil in renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy: a 2-year follow-up. *Transpl Int* 2002; **15**: 387-392.
362. Ruiz J, Campistol J, Sanchez-Fructuoso A, *et al.* Early sirolimus use with cyclosporine elimination does not induce progressive proteinuria. *Transplant Proc* 2007; **39**: 2151-2152.
363. Ruiz JC, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, *et al.* Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 3252-3257.
364. Long C, Cook L, Hamilton S, *et al.* FK506 binding protein 12/12.6 depletion increases endothelial nitric oxide synthase threonine 495 phosphorylation and blood pressure. *Hypertension* 2007; **49**: 569-576.
365. Harris D, Rangan G. Retardation of kidney failure -- applying principles to practice. *Ann Acad Med Singapore* 2005; **34**: 16-23.
366. Castro C, Campistol J, Sancho D, *et al.* Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27 Kip1 - independent pathway. *Atherosclerosis* 2004; **172**: 31-38.
367. Elloso M, Azrolan N, Sehgal S, *et al.* Protective effect of the immunosuppressant sirolimus against aortic atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Am J Transplant* 2003; **3**: 562-569.
368. Di Paolo S, Teutonico A, Legrande D, *et al.* Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2236-2244.
369. Teutonico A, Schena P, Di Paolo S. Glucose metabolism in renal transplant recipients: effect of calcineurin inhibitor withdrawal and conversion to sirolimus. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3128-3135.

370. Pavlakis M, Goldfarb-Rumyantzev A. Diabetes after transplantation and sirolimus: what's the connection? *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1255-1256.
371. Johnston O, Rose C, Webster A, *et al.* Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1411-1418.
372. Shen L, Wu F. Nanomedicines in renal transplant rejection--focus on sirolimus. *Int J Nanomedicine* 2007; **2**: 25-32.
373. Whiting PH, Adam BJ, Woo J, *et al.* The effect of rapamycin on renal function in the rat: a comparative study with cyclosporine. *Toxicol Lett* 1991; **58**: 169-179.
374. DiJoseph JF, Sharma RN, Chang JY. The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 1992; **53**: 507-513.
375. Thliveris JA, Solez K, Yatscoff RW. A comparison of the effects of rapamycin and cyclosporine on kidney and heart morphology in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Histol Histopathol* 1995; **10**: 417-421.
376. DiJoseph JF, Mihatsch MJ, Sehgal SN. Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat. *Transpl Int* 1994; **7**: 83-88.
377. Stylianou K, Petrakis I, Mavroei V, *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 2010.
378. Deegens JK, Dijkman HB, Borm GF, *et al.* Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2008; **74**: 1568-1576.
379. Simpson SJ, Raubenheimer D. Macronutrient balance and lifespan. *Aging (Albany NY)* 2009; **1**: 875-880.
380. Obici S. Minireview: Molecular targets for obesity therapy in the brain. *Endocrinology* 2009; **150**: 2512-2517.
381. Cota D. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in energy balance and obesity. *Physiol Behav* 2009; **97**: 520-524.
382. Woods SC, Seeley RJ, Cota D. Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr* 2008; **28**: 295-311.
383. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; **460**: 392-395.
384. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, *et al.* Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1784**: 159-185.

385. Wu T, Qin X, Kurepa Z, *et al.* Shared signaling networks active in B cells isolated from genetically distinct mouse models of lupus. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2186-2196.
386. Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, *et al.* Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol* 2006; **176**: 589-593.
387. Li N, Nakamura K, Jiang Y, *et al.* Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 171-179.
388. Katsiari CG, Tsokos GC. Transcriptional repression of interleukin-2 in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006; **5**: 118-121.
389. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, *et al.* Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008; **11**: 32-50.
390. Niculescu F, Nguyen P, Niculescu T, *et al.* Pathogenic T cells in murine lupus exhibit spontaneous signaling activity through phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 1071-1079.
391. Reif K, Burgering BM, Cantrell DA. Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 14426-14433.
392. Peairs A, Radjavi A, Davis S, *et al.* Activation of AMPK inhibits inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells. *Clin Exp Immunol* 2009; **156**: 542-551.
393. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, *et al.* Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 2005; **280**: 32081-32089.
394. Geissler EK, Schlitt HJ, Thomas G. mTOR, cancer and transplantation. *Am J Transplant* 2008; **8**: 2212-2218.
395. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, *et al.* Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**: 647-662.
396. Oehler-Jänne C, von Bueren A, Vuong V, *et al.* Temperature sensitivity of phospho-Ser(473)-PKB/AKT. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **375**: 399-404.
397. Ma K, Cheung S, Marshall A, *et al.* PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity. *Cell Signal* 2008; **20**: 684-694.
398. Ono H, Katagiri H, Funaki M, *et al.* Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 1411-1422.

399. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, *et al.* Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int* 2008; **73**: 556-566.
400. Varma S, Khandelwal RL. Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1770**: 71-78.