

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Contribución de la vía PI3k/Akt-PTEN y sus blancos corriente abajo en iniciación y progresión de glioblastoma multiforme

Gonzalo Arboleda (1)

1 Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E., Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Laboratorio de Genética, Bogotá, D.C., Colombia.

Resumen

Los tumores malignos del sistema nervioso central constituyen un problema importante en oncología debido a que son de difícil tratamiento y tienen un alto porcentaje de resistencia a la terapia, además de que su pronóstico es muy pobre. El análisis de los cambios genéticos y moleculares asociados a la iniciación y progresión del proceso tumoral constituye una herramienta importante para establecer grupos de tratamiento específico, para reducir la incidencia de resistencia al mismo y para establecer nuevos blancos terapéuticos.

Este artículo busca analizar diversos aspectos genéticos y moleculares subyacentes a la iniciación y progresión del tumor cerebral maligno más frecuente, el glioblastoma multiforme, procesos que siguen siendo poco conocidos. El análisis se centrará en la vía de supervivencia neuronal mediada por los receptores tirosina quinasa (RTK) y sus blancos corriente abajo: PTEN, PI3K, Akt, mTOR y hexoquinasa. Poco se sabe, sin embargo, acerca de cómo cambios genéticos y moleculares en estas vías de señalización celular se interrelacionan temporal y funcionalmente para determinar la progresión maligna y la resistencia a la terapia en glioblastoma multiforme. En la actualidad se está desarrollando un estudio in vivo e in vitro utilizando especímenes quirúrgicos y líneas celulares de glioblastoma, para analizar sus cambios genéticos y moleculares asociados a la vía PI3K/Akt-PTEN, y realizar una correlación con la expresión de hexoquinasa, mTOR y telomerasa, y su importancia en cuanto a resistencia a la terapia.

Palabras clave: Neoplasmas del sistema nervioso central, glioblastoma, proteínas oncogénicas virales, Fosfatidilinositoles, hexoquinasa, mTOR, telomerasa, proteína oncogénica Akt.

Correspondencia:

Gonzalo Arboleda, Grupo Biología del Cáncer, Laboratorio de Genética, Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E., Av. 1ª No 9-85, Bogotá, D.C., Colombia
Tel.: 3340090, Fax:3341360
garboleda@incancerologia.gov.co

Recibido:29/11/04; aceptado: 28/01/05

Contribution of the pi3k/akt-pten pathway and its downstream targets to the initiation and progression of multiform glioblastoma

Abstract

Central nervous system tumors represent an important problem in oncology because their treatment is complicated because of a high degree of resistance to therapy and a poor prognosis. Studies on the genetic and molecular changes associated with initiation and progression of the tumoral process constitute an important tool in order to establish specific treatment groups, to reduce the incidence of resistance to therapy, and to discover new therapeutic targets.

The present review aims to analyze diverse genetic and molecular characteristics associated to the initiation and progression of the most common malignant central nervous system tumor, the multiform glioblastoma (GBM). However, such processes are still poorly understood. This review will focus on the neuronal survival pathway mediated by the tyrosine kinase receptors (TrKR) and their downstream targets: PI3K, Akt, PTEN, mTOR, and hexokinase. Little is known about how genetic and molecular changes in these signalling pathways are temporarily and functionally related to determine malignant progression and resistance to therapy in GBM.

We are currently developing an in vivo and in vitro study using clinical samples and cell lines of glioblastoma to analyze their genetic and molecular changes associated to the PI3K/Akt-PTEN pathway. In addition, we intend to study how modifications in this cell pathway are correlated with the expression and function of hexokinase, mTOR, and telomerase, aiming to explore their relevance in the development of resistance to therapy.

Key words: Neoplasms, central nervous system, glioblastoma, PI3K, Akt, PTEN, hexokinase, mTOR, telomerase.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los gliomas, que son los tumores primarios más frecuentes del sistema nervioso central (SNC), en grados I-IV dependiendo de la malignidad. El astrocitoma grado IV o glioblastoma multiforme (GBM) se divide en primario y secundario. El GBM primario se genera como un evento de novo en ausencia de una lesión de bajo grado; el GBM secundario se desarrolla de forma progresiva a partir de una lesión de bajo grado (1,2). Los GBM constituyen un problema importante en oncología, ya que son considerados de difícil tratamiento, alto porcentaje de resistencia a las terapias convencionales y muy pobre pronóstico (2,3).

La presente revisión busca analizar diversos aspectos genéticos y moleculares subyacentes a la iniciación

y progresión del GBM, procesos que siguen siendo poco conocidos. El análisis se centrará en la vía de supervivencia neuronal mediada por los receptores tirosina quinasa (RTK) y sus blancos corriente abajo (PTEN, PI3K, Akt, mTOR, hexoquinasa), considerados importantes en los procesos de iniciación y progresión de los gliomas. Poco se sabe, sin embargo, acerca de cómo estas vías se interrelacionan temporal y funcionalmente para determinar la progresión maligna y la resistencia a la terapia.

Los cambios moleculares en esta vía se constituyen en blancos terapéuticos potenciales que han sido poco explorados. Su análisis representa una novedosa oportunidad de racionalizar el tratamiento, reducir la resistencia a los mismos y desarrollar nuevos blancos tera-

péuticos basados en el bloqueo o la reinserción de los mecanismos celulares activados o modificados por las alteraciones genéticas (4,5), y abre la posibilidad de terapias sinérgicas contra diversos blancos moleculares.

En la actualidad se están desarrollando un estudio in vivo que utiliza especímenes quirúrgicos de GBM y ensayos in vitro en líneas de glioblastomas, para analizar sus cambios genéticos y moleculares asociados a la vía PI3K/Akt-PTEN, y su correlación con la expresión de hexoquinasa, mTOR y telomerasa. Con los ensayos in vivo se espera determinar la correlación de los cambios moleculares de la vía RTK/PI3K/Akt/mTOR/hexoquinasa/telomerasa con la patología y la clínica; los ensayos in vitro permitirán evaluar potenciales terapias sobre esta vía y correlacionar la respuesta a las mismas con los cambios moleculares observados tanto in vitro como in vivo.

Vías moleculares de iniciación y progresión de GBM

Cambios moleculares descritos en tumores de origen astrocítico de diversos grados

El gen supresor tumoral P53 (TP53), un factor de transcripción que funciona como regulador de progresión del ciclo celular e inductor de apoptosis (6), se encuentra alterado genéticamente en el 60% de los casos con astrocitomas de bajo y alto grado de malignidad, de tal forma que se altera en etapas tempranas durante el proceso neoplásico en GBM (7). Pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni que portan mutaciones germinales en el gen TP53 están predispuestos a varias neoplasias, incluyendo tumores del SNC (8,9). Sin embargo, no se ha establecido aún una relación causal directa entre pérdida de TP53 y formación de astrocitomas, pues ratones transgénicos TP53 *-/-* no desarrollan astrocitomas, aunque sí son más propensos a su transformación maligna (10,11).

En astrocitomas de diversos grados se ha descrito elevación de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor (PDGFR) (12,13). Estudios de expresión exógena de PDGF han demostrado su capacidad de inducir la formación de astrocitomas, en particular de GBM (13). Sin embargo, no se han demostrado defectos en línea astrocítica en modelos transgénicos PDGF *-/-* (14). PDGF parece estar más involucrado en la migración que en la proliferación de astrocitos.

La sobreexpresión de Ras oncogénico en astrocitos genera la formación de astrocitomas (15), de tal forma que Ras contribuye a la iniciación de estos tumores. No se han identificado mutaciones en Ras en astrocitomas (16), y por consiguiente tal aumento en la actividad Ras parece depender de la sobreactividad de los receptores RTK, ya sea por aumento de los factores de crecimiento o sus receptores, por mutaciones del gen de la neurofibromatosis tipo 1 (regula negativamente Ras) o por otras vías (13,17).

El punto de chequeo del ciclo celular G1/S que es controlado por el supresor tumoral RB, por quinasas dependientes de ciclinas (CDK: CDK4 y 6) y por inhibidores de quinasas de ciclinas (CKI: como INK4) se encuentra alterado en astrocitomas de alto grado de malignidad, pero no en tumores de bajo grado, y representa una vía de progresión tumoral (18). Tales alteraciones se presentan como mutaciones del inhibidor de ciclina D y de CDK4-6, INK4 (codificado por el gen CDKN2A), en 40%-57% de GBM, como amplificación de CDK4 en 12%-14% de GBM o como pérdida de RB en 14%-33% de GBM (18,19). Estas alteraciones genéticas permiten la progresión descontrolada del ciclo celular y son mutuamente excluyentes. Esto implica que las alteraciones de la vía INK4A-CDK4-RB pueden generar efectos equivalentes. En total, hasta el 80% de GBM y el 50% de astrocitomas anaplásicos poseen alteraciones en la vía INK4A-CDK4-RB (2). Su rol en progresión, mas no en iniciación, tumoral ha sido sustentado subsecuentemente por estudios efectuados en ratones transgénicos INK4 *-/-* (20), mediante inactivación de RB (21) o por sobreexpresión de CDK4 (22), los cuales no desarrollan astrocitomas.

Diferencias moleculares entre GBM primario y secundario

Los GBM primarios, aunque comparten características clínicas, histológicas y moleculares con los GBM secundarios, poseen una cinética de desarrollo tumoral diferente (tabla 1).

Las mutaciones en INK4 son comunes en GBM primario (40%) y raros en GBM secundario (4%) (23), mientras que mutaciones en TP53 son frecuentes en GBM secundario (60%) e infrecuentes en GBM primario (10%) (24). Un hecho importante es que las mutaciones en TP53 e INK4 son mutuamente excluyentes en GBM (25).

Desde el punto de vista funcional, en los GBM primarios la función de TP53 parece estar alterada debido a pérdida de ARF (segundo transcrito del gen CDKN2A), que estabiliza P53, o por sobreactivación de MDM2, mientras que en los GBM secundarios TP53 se encuentra mutado directamente (26,27).

La amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha reportado en 40% de los GBM primarios, pero es raro en los GBM secundarios (24,28). Además, la mayoría (77%) de los tumores que presentan amplificación de EGFR también presentan otras alteraciones genéticas intrínsecas del EGFR que lo activan constitutivamente (29). Sin embargo, sólo la presencia de alteraciones genéticas adicionales a las del EGFR, como alteraciones en la vía INK4A-ARF, conducen a la formación de tumores en modelos transgénicos murinos (22).

La pérdida del brazo largo del cromosoma 10 es la alteración cromosómica más común en GBM (30). Dentro de los genes asociados a esta alteración, la pérdida del gen supresor tumoral PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina) se ha reportado en 30% de los GBM primarios, pero es raro en GBM secundarios (31). El que PTEN regule negativamente la vía de supervivencia neuronal mediada por PI3K/Akt parece indicar que esta vía es vital en la formación de GBM (2), como se discutirá en detalle más adelante.

La activación de la telomerasa ha sido descrita en los glioblastomas (32). Los gliomas de bajo grado de malignidad muestran un porcentaje bajo (0%-33%) de actividad telomerasa, mientras que en GBM su expresión aumenta y en algunos casos alcanza el 100% (33).

Tabla 1. Características generales, genéticas y moleculares encontradas en GBM primario y GBM secundario (adaptado con autorización de Zhu y Parada, 2002).

Características	GBM primario	GBM secundario
Edad promedio (biopsia)	55 ± 12 años	39 ± 12 años
Relación hombres:mujeres	1,37:1	1:0,76
Amplificación EGFR	60%	10%
Mutaciones P53	10%	> 65%
Expresión MDM2	50%	10%
Expresión PDGFR	<10%	60%
Pérdida PTEN	30%	4%
Mutaciones INK4	40%	4%
Telomerasa	100%	100%

La vía PI3K/Akt-PTEN y su potencial regulador de la iniciación y progresión de GBM

Las neuronas requieren señales mediadas por factores de crecimiento para su supervivencia y proliferación. Muchas de las vías de señalización asociadas a factores de crecimiento están mediadas por receptores transmembrana que poseen un dominio tirosina quinasa intracelular: los receptores tirosina quinasa (RTK) (34). Luego de la unión de factores de crecimiento a RTK, se activan señales corriente abajo asociadas a activación de las vías de señalización celular MAPK y PI3K/Akt (35,36). Estas vías son una de las más comprometidas en diversos cánceres, ya que su alteración libera a las células de la necesidad de factores de crecimiento externos para su proliferación y supervivencia.

Descripción de la vía PTEN-PI3K/Akt

Las vías PI3K/Akt y MAPK (Raf/MEK/ERK) son un punto crucial en el cual convergen diversas señales de supervivencia celular (37,38). En las neuronas, la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y su mediador corriente abajo proteína quinasa B o Akt (PKB/Akt) median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (39,40).

La activación de PI3K por RTK puede ocurrir por medio de proteínas adaptadoras, como el sustrato del receptor de insulina (IRS) (41), o directamente, por medio de la vía Ras (42). Esto parece indicar una alta interrelación entre Ras y PI3K (43,44).

PI3K es un complejo heterodimérico que consiste de una subunidad reguladora de 85kDa y una catalítica de 100kDa que se encarga de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3). Éstos se unen a un dominio homólogo a plekstrina presente en una gran variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (45). La regulación de la supervivencia por PI3K, en particular, está mediada por la activación de Akt (46,47). Recientemente se ha demostrado que la activación de Akt requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473) (48,49). La fosforilación de Thr308 por acción de PI3K está mediada por la activación de la quinasa-1, dependiente de fosfoinositol (PDK1) (50). La quinasa que fosforila Ser473, denominada PDK2, también depende de PI3K pero no se ha identificado todavía. Los posibles candidatos abarcan la proteína Akt misma (por autofosforilación) (51), la quinasa-2 activada por la quinasa activada por mitógenos (MAPKAPK-2) (52) y la quinasa ligada a integrinas (ILK) (53).

Los blancos corriente abajo de Akt son diversos y se han asociado a repuestas metabólicas y de supervivencia celular (54,55). Los sustratos de Akt incluyen la inactivación de mediadores proapoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53) y la activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (47,56-58), que en conjunto determinan las diversas funciones de la vía PI3K/Akt. Recientemente, la activación del blanco mamífero de rapamicina (mTOR) se ha asociado a la regulación del metabolismo y a la proliferación celular mediante la regulación de la proteína ribosomal p70 quinasa S6 (P70S6K) (58) y a la resistencia a quimioterapia (59). La inhibición de mTOR mediante rapamicina o sus análogos sintéticos ha demostrado efectividad contra diversos cánceres (59). Sin embargo, la función de mTOR y su regulación por la vía PI3K/Akt es tumor-específica y poco conocida en gliomas (60).

El gen supresor tumoral PTEN es esencial en la supresión tumoral de un buen número de cánceres (61,62). La identificación de PIP3, producto PI3K, como sustrato de PTEN indica que la principal función de PTEN es ser regulador negativo de la vía PI3K/Akt (63). Esto se ha comprobado al establecer un aumento de la función de Akt en casos de deficiencias en PTEN (64).

Regulación del metabolismo celular mediado por PI3K/Akt y su importancia en cáncer

Además de su función en supresión de la muerte celular, los factores de crecimiento vía PI3K/Akt también regulan el metabolismo celular al modular la captación celular de glucosa (65,66), pero poco se conoce acerca de su función en la regulación del metabolismo de la glucosa (glucólisis) y de cómo esta función contribuye a las decisiones de supervivencia/muerte celular (67,68).

Las hexoquinasas (tipo I y II), principales enzimas reguladoras de la glucólisis, se asocian al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) del poro de permeabilidad transicional mitocondrial y utilizan el ATP derivado de la mitocondria para catalizar el primer paso de la glucólisis (69), que alimenta la mitocondria con NAD (P)H y FADH2 requeridos para la producción de ATP (70). Con lo que, aunque la glucólisis y la fosforilación oxidativa son dos mecanismos moleculares altamente compartimentalizados, están asociados de tal forma que alteraciones de la generación de sustratos mitocondriales derivados de la glucólisis causan alteración de la homeostasis mitocondrial (71,72). En modelos de ausencia de factores de crecimiento y de glucosa, la disminución de la glucólisis se ha asociado de forma consistente a estadios iniciales en apoptosis como reducción de ATP, translocación mitocondrial de Bax, activación de JNK, disminución ((m y liberación de citocromo c al citoplasma (73,74).

La sobreexpresión de Akt previene las alteraciones asociadas a ausencia de factores de crecimiento y mantiene la supervivencia celular al estabilizar la bioenergética celular vía incremento del transporte y el metabolismo de glucosa (75). Se ha demostrado que Akt incrementa, o puede redistribuir, la actividad hexoquinasa, de tal forma que la hexoquinasa permanece asociada a la mitocondria y la muerte celular disminuye (76).

Estos estudios indican que el acoplamiento entre la glucólisis y la función mitocondrial es un prerrequisito para que los factores de crecimiento y en particular Akt medien sus efectos en supervivencia, particularmente asociada a actividad hexoquinasa (76). De tal forma que, a diferencia de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que mantienen la homeostasis mitocondrial y la supervivencia celular aún en presencia de metabolismo celular disminuido (77,78), la supervivencia celular mediada por PI3K/Akt requiere un suplemento continuo de sustratos metabólicos derivados de la glucosa y por lo tanto depende del metabolismo ce-

lular (75,79). La inhibición de la vía glicolítica a través de la inhibición de la vía PI3K/Akt podría determinar eventos que llevan las neuronas a su muerte celular y constituyen un blanco terapéutico poco explorado en cáncer y en GBM en particular.

En conjunto, estos estudios demuestran la importancia del metabolismo de la glucosa en las neuronas como un regulador clave de eventos tempranos que modulan las decisiones de muerte/supervivencia celular.

La alta tasa glicolítica del cáncer (conocida como el «enigma metabólico» del cáncer), que constituye la base molecular de los estudios actuales de imagenología en neoplasias (80), es uno de los principales fenotipos asociados con la transformación maligna y ha sido reconocido por más de setenta años (81). Estudios recientes han demostrado que tal fenotipo se basa en un aumento de la expresión y actividad de hexoquinasa (81,82). Esto ocurre por mecanismos de amplificación génica (83), por sobreactivación del promotor de hexoquinasa (84) y por modificaciones epigenéticas (85). Los avances en el conocimiento de las vías moleculares involucradas en el fenotipo altamente glicolítico del cáncer, en particular el rol pivote de la hexoquinasa y su regulación por la vía PI3K/Akt, convierten de nuevo el perfil bioenergético del cáncer en un área importante de investigación y en un blanco terapéutico que merece un análisis profundo (86).

Por consiguiente, el desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos de la vía PI3K/Akt y sus blancos corriente abajo es, en la actualidad, una de las principales opciones para el control de los GBM, así como para disminuir su resistencia a las terapias actuales (87,88).

La telomerasa en cáncer y su correlación con la vía PI3K/Akt

Los telómeros son las estructuras que se encuentran en los extremos de los cromosomas, constituidas por secuencias repetitivas de ADN (TTAGGG)_n, y que contribuyen al mantenimiento y la estabilidad cromosómica, a la viabilidad y al control del ciclo celular (89). La telomerasa es una ribonucleoproteína compuesta por una subunidad catalítica (hTERT) y una subunidad de RNA (hTER), que se encarga de la síntesis de los telómeros por medio de adición de repeticiones teloméricas (90). Las células germinales poseen niveles altos de telomerasa, mientras que las células somáticas son de-

ficientes en telomerasa y sus telómeros se acortan con cada división celular hasta alcanzar una longitud crítica, lo que lleva a muerte o senescencia celular (91). La expresión de la telomerasa y el mantenimiento telomérico se han asociado con proliferación ilimitada e inmortalidad celular, y se ha determinado reactivación de telomerasa en una gran variedad de cánceres (92), de tal forma que aquélla podría constituir un paso esencial de la tumorigénesis (33,93).

Pocos estudios han analizado el potencial de la vía PI3K/Akt de regular la actividad telomerasa. Se ha demostrado que Akt regula positivamente la actividad telomerasa por regulación de la expresión a nivel transcripcional y postranscripcional de su subunidad catalítica (94,95), pero tales análisis en GBM no se han explorado.

Debido a que recientemente se demostró que la subunidad catalítica de la telomerasa, mas no la inactivación de P53 o P53/RB, es el único cambio capaz de iniciar tumorigénesis (96), se sugiere que la expresión de telomerasa se asocia con la progresión de gliomas no malignos a malignos (96). Con base en estos hallazgos y en la alta expresión de telomerasa en GBM, la regulación de la actividad telomerasa mediada por PI3K/Akt en GBM merece ser analizada en detalle. Tales análisis podrían contribuir a definir terapia antitelomerasa en GBM.

Conclusiones

Se considera que la vía de supervivencia neuronal mediada por RTK, PI3K/Akt y sus blancos corriente abajo es de primordial importancia en la iniciación y progresión del proceso neoplásico a nivel del SNC. Sin embargo, poco se conoce acerca del papel que cumple tal vía en la regulación de la alta tasa metabólica tumoral y en la regulación de la telomerasa.

La hipótesis de trabajo que manejamos se basa en que la vía PI3K/Akt está alterada en los GBM, debido a amplificación de EGFR, mutaciones en PTEN o mutaciones propias de PI3K, y su sobreactivación cumple un papel clave en la regulación de la alta tasa glicolítica por medio de la regulación de la expresión y/o la función de la hexoquinasa, en la proliferación celular por regulación de mTOR y en la malignización por regulación de la expresión de telomerasa. Todas estas alteraciones actúan de forma conjunta para determinar la elevada tasa de resistencia a la terapia observada en GBM.

Nos hemos planteado un proyecto de investigación in vivo e in vitro con el cual buscamos realizar una correlación clínica/histológica/molecular de vía PI3K/Akt y sus blancos corriente abajo (hexoquinasa, mTOR

y telomerasa), para contribuir al conocimiento de su papel en la iniciación y progresión tumoral, y como posibles blancos de inhibición farmacológica.

REFERENCIAS

1. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11(3):162-167.
2. Zhu Y, Parada LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):616-626.
3. Brandes AA. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Semin Oncol* 2003;30(6 Suppl19):4-9.
4. Collins VP. Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett* 2002;188(1-2):1-7.
5. Andratschke N, Grosu AL, Molls M, Nieder C. Perspectives in the treatment of malignant gliomas in adults. *Anticancer Res* 2001;21(5):3541-3550.
6. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-310.
7. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, Von Ammon K, Ogata N et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997;3(4):523-530.
8. Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990;20-27;348(6303):747-749.
9. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr., Nelson CE, Kim DH et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250(4985):1233-1238.
10. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr., Butel JS et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356(6366):215-221.
11. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994;4(1):1-7.
12. Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD. Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer* 1995;60(2):168-173.
13. Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 2001;15(15):1913-1925.
14. Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H et al. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 1999;126(3):457-467.
15. Ding H, Roncari L, Shannon P, Wu X, Lau N, Karaskova J et al. Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* 2001;61(9):3826-3836.
16. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-4689.
17. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 1997;15(23):2755-2765.
18. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57(2):122-130.
19. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. Human glioblastomas with no alterations of the

- CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 1996;13(5):1065-1072.
20. Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001;413(6851):86-91.
 21. Marino S, Vooijs M, Van der GH, Jonkers J, Berns A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 2000;14(8):994-1004.
 22. Holland EC, Hively WP, DePinho RA, Varmus HE. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* 1998;12(23):3675-3685.
 23. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;94(4):303-309.
 24. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 1994;81(3):427-436.
 25. Fulci G, Labuhn M, Maier D, Lachat Y, Hausmann O, Hegi ME *et al.* p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene* 2000;9(33):3816-3822.
 26. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(10):731-737.
 27. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56(2):180-185.
 28. Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N et al. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer* 1994;56(1):72-77.
 29. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000;60(5):1383-1387.
 30. Fults D, Pedone C. Deletion mapping of the long arm of chromosome 10 in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;7(3):173-177.
 31. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y *et al.* PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57(7):684-689.
 32. Morii K, Tanaka R, Onda K, Tsumanuma I, Yoshimura J. Expression of telomerase RNA, telomerase activity, and telomere length in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239(3):830-834.
 33. DeMasters BK, Markham N, Lillehei KO, Shroyer KR. Differential telomerase expression in human primary intracranial tumors. *Am J Clin Pathol* 1997;107(5):548-554.
 34. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* 2002;8(1):17-23.
 35. Huang EJ, Reichardt LF. TRK Receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-642.
 36. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10(3):381-391.
 37. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999;253(1):210-229.
 38. Kaplan DR, Cooper E. PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic Nat Neurosci 2001;4(1):5-7.
 39. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273(26):16568-16575.

40. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:677-736.
41. Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, Dieterich R, Wong AJ. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(23):12419-12424.
42. Marte BM, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol* 1997;7(1):63-70.
43. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994;370(6490):527-532.
44. Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 1999;19(22):9716-9727.
45. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):219-225.
46. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88(4):435-437.
47. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM *et al.* Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997;275(5300):661-665.
48. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15(23):6541-6551.
49. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* 2002;22(17):6247-6260.
50. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol* 1997;7(4):261-269.
51. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000;275(12):8271-8274.
52. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346(Pt 3):561-576.
53. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. 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 USA* 1998;95(19): 11211-11216.
54. Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffey PJ, Van Obberghen E, Marchand-Brustel Y. Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 1997;138(5):2005-2010.
55. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997;22(9):355-358.
56. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91(2):231-241.
57. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(3):297-305.
58. Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signalling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(4):1124-1132.
59. Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62(21):6141-6145.

60. Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol* 2004;24(4):893-900.
61. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(17):9052-9057.
62. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280(5369):1614-1617.
63. Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(26):15587-15591.
64. Stambolic V, Suzuki A, De la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998;95(1):29-39.
65. Van der Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001;21(17):5899-5912.
66. Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 1998;47(7):1006-1013.
67. Hajdуч E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)_a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001;492(3):199-203.
68. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 1998;335 (Pt 1):1-13.
69. Beltran del Rio H, Wilson JE. Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP. *Arch Biochem Biophys* 1992;296(2): 667-677.
70. Van den Heuvel L, Smeitink J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *Bioessays* 2001;23(6): 518-525.
71. Plas DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(2):75-78.
72. Van der Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001;21(17): 5899-5912.
73. Rathmell JC, Van der Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* 2000;6(3):683-692.
74. Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 2000;5(2) 99-105.
75. Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J Biol Chem* 2001;276 (15):12041-12048.
76. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 2001;15(11):1406-1418.
77. Van der Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(9):4666-4671.
78. Van der Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 1999;3(2):159-167.
79. Van der Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can

- influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001;21(17):5899-5912.
80. Spence AM, Muzi M, Graham MM, O'Sullivan F, Krohn KA, Link JM et al. Glucose metabolism in human malignant gliomas measured quantitatively with PET, 1-[C-11]glucose and FDG: analysis of the FDG lumped constant. *J Nucl Med* 1998;39(3):440-448.
81. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29(4):339-343.
82. Smith TA. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* 2000;57(2):170-178.
83. Rempel A, Mathupala SP, Griffin CA, Hawkins AL, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Res* 1996;56(11):2468-2471.
84. Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 1997;272(36):22776-22780.
85. Goel A, Mathupala SP, Pedersen PL. Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J Biol Chem* 2003;278(17):15333-15340.
86. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochem Biophys Acta* 2002;1555(1-3):14-20.
87. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003;17(3):590-603.
88. Fresno Vara JA, Casado E, De Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30(2):193-204.
89. Blackburn EH. Telomeres: no end in sight. *Cell* 1994;77(5):621-623.
90. Greider CW. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation, shortening, and stabilization. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(2):203-211.
91. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992;11(5):1921-1929.
92. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC Jr., Shay JW. Telomerase activity in human brain tumours. *Lancet* 1995;346(8985):1267-1268.
93. Komata T, Kanzawa T, Kondo Y, Kondo S. Telomerase as a therapeutic target for malignant gliomas. *Oncogene* 2002;21(4):656-663.
94. Kimura A, Ohmichi M, Kawagoe J, Kyo S, Mabuchi S, Takahashi T et al. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23(26):4505-15.
95. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 1999;274(19):13085-13090.
96. Sonoda Y, Ozawa T, Hirose Y, Aldape KD, McMahon M, Berger MS et al. Formation of intracranial tumors by genetically modified human astrocytes defines four pathways critical in the development of human anaplastic astrocytoma. *Cancer Res* 2001;61(13):4956-4960.