

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización estructural y funcional del complejo  
mTORC2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María Elena Aranda Serrano**

DIRECTORA

**Begoña García Álvarez**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL  
COMPLEJO mTORC2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Elena Aranda Serrano

DIRECTOR

Begoña García Álvarez

Madrid, 2019





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña. María Elena Aranda Serrano, estudiante en el Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: Caracterización estructural y funcional del complejo mTORC2 y dirigida por: Begoña García Álvarez.

### DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 8 de Julio de 2019



La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la doctora Begoña García Álvarez.



## **Agradecimientos**

*A punto de terminar esta etapa quisiera dar las gracias en primer lugar a mi directora de Tesis Begoña García. GRACIAS por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. GRACIAS por la experiencia que he adquirido. GRACIAS por apoyarme en cada decisión que he tomado. GRACIAS por ayudarme a conseguir cada objetivo académico y profesional que me he propuesto. GRACIAS por no dejarme tirar la toalla. GRACIAS por trabajar codo con codo conmigo. GRACIAS por confiar en mí.*

*También me gustaría agradecer al grupo de BIOMIL, en especial a Jesús Pérez Gil por aceptarme en este maravilloso grupo de investigación, a pesar de ser una oveja descarriada cuyo trabajo de investigación nada tenía que ver con el surfactante pulmonar. Gracias a Mer, Antonio y Bárbara por contar conmigo como si fuera una más del grupo.*

*Han sido cinco años de trabajo por lo que han sido muchas personas las que me he encontrado. Personas que estaban cuando yo llegué: Alex, Elena, Virginia, Sonia...Personas que me han acompañado durante este tiempo: Alberto, Raquel, Nuria y Marta. Sin embargo, estoy enormemente agradecida a tres personas que siempre han estado dispuestas a echarme una mano: Nuria, Raquel y Marta, muchísimas gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado por hacer más fácil este camino, y sobre todo gracias por animarme a seguir adelante. Gracias a Nuria P, siempre sonriente. Alicia, no me olvido, gracias por "cuidar" de las células mientras yo estaba ausente.*

*Fuera del grupo BIOMIL me gustaría dar las gracias a Carlos y Rodrigo por aportar su granito de arena en este trabajo de investigación.*

*Finalmente agradezco a mi familia, en especial a mis padres el apoyo durante este tiempo. Vosotros habéis sido la razón por la que no he tirado la toalla. Y por último, gracias a Rafa por aguantar mi mal carácter.*

*Posiblemente me olvidé de alguien, si es así GRACIAS para ti también. GRACIAS a todos vosotros.*



# INDICE

LISTA DE ABREVIACIONES .....	15
RESUMEN .....	21
SUMMARY .....	27
1. INTRODUCCIÓN .....	33
1.1. mTOR, receptor de rapamicina en mamíferos.....	33
1.2. mTORC1.....	34
1.2.1. Componentes .....	34
1.2.2. Vías de activación de mTORC1 .....	36
1.2.3. Funciones y sustratos del complejo mTORC1 .....	37
1.2.3.1. Síntesis de proteínas.....	38
1.2.3.2. Síntesis de lípidos. ....	39
1.2.3.3. Síntesis de nucleótidos.....	39
1.2.3.4. Metabolismo de la glucosa.....	40
1.2.3.5. Catabolismo de proteínas.....	40
1.2.4. Caracterización estructural del complejo mTORC1 .....	41
1.3. mTORC2.....	42
1.3.1. Componentes de mTORC2 .....	42
1.3.1.1. mLST8. ....	43
1.3.1.2. mSIN1. ....	43
1.3.1.3. Rictor. ....	45
1.3.1.4. Protor.....	45
1.3.2. Vías de activación de mTORC2. ....	45
1.3.3. Funciones y sustratos del complejo mTORC2. ....	46
1.3.3.1. Reorganización del citoesqueleto de actina y migración celular .....	47
1.3.3.2. Transporte de iones.....	47
1.3.3.3. Síntesis de proteínas.....	47
1.3.3.4. Supervivencia celular.....	47
1.3.3.5. Metabolismo.....	48
1.3.4. Caracterización estructural del complejo mTORC2 .....	48
1.4. Implicación del complejo mTORC2 en enfermedades. ....	51
1.4.1. Cáncer.....	51
1.4.2. Diabetes mellitus tipo 2. ....	52
1.4.3. Envejecimiento.....	52
1.5. Microscopia electrónica y reconstrucción tridimensional de macromoléculas.....	53
2. OBJETIVOS.....	57

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
3.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante mSIN1.....	61
3.1.1. Expresión de mSIN1 en células de mamífero.....	61
3.1.2. Purificación del complejo mTORC2.....	62
3.2. Caracterización bioquímica del complejo purificado.....	63
3.2.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	63
3.2.2. Fijación en gradiente (GraFix).....	63
3.3. Caracterización electroforética.....	64
3.3.1. Electroforesis en gradiente.....	64
3.3.2. Blue Native-PAGE.....	64
3.3.3. Tinción con plata.....	65
3.3.4. Tinción con azul de Coomassie.....	65
3.3.5. Inmunodetección de los componentes del complejo mTORC2.....	65
3.4. Caracterización estructural del complejo purificado.....	66
3.4.1. Preparación de muestras.....	66
3.4.1.1. Preparación de muestras mediante tinción negativa.....	66
3.4.1.2. Preparación de muestras vitrificadas.....	66
3.4.2. Procesamiento de imágenes.....	67
3.4.2.1. Procesamiento digital de imágenes.....	67
3.4.2.2. Alineamiento y clasificación bidimensional de partículas individuales.....	67
3.4.2.3. Reconstrucción tridimensional y generación de volúmenes iniciales.....	67
3.4.2.4. Refinamiento angular.....	67
3.5. Ensayos de caracterización funcional del complejo purificado.....	67
3.5.1. Inclusión del complejo mTORC2 en el interior de células de mamífero.....	67
3.5.1.1. Inmunodetección mediante Western blot.....	68
3.5.1.2. Inmunodetección mediante microscopía confocal.....	69
3.5.1.3. Inmunodetección mediante citometría de flujo.....	69
3.5.1.4. Ensayo viabilidad celular.....	70
3.5.2. Ensayo funcionalidad <i>in vitro</i> .....	70
4. CAPÍTULO 1: PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO mTORC2.....	73
4.1. INTRODUCCIÓN.....	73
4.2. RESULTADOS.....	73
4.2.1. Clonación y expresión de la proteína mSIN1.....	73
4.2.3. Purificación del complejo mTORC2.....	74
4.2.4. Organización supramolecular del complejo mTORC2.....	75
4.2.5. Estabilización del complejo mediante el método GraFix.....	77

4.3. DISCUSIÓN.....	79
5. INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL COMPLEJO mTORC2.....	83
5.1. INTRODUCCIÓN .....	83
5.2. RESULTADOS .....	83
5.2.1. Actividad quinasa del complejo purificado mTORC2. ....	83
5.2.2. Niveles de fosforilación de Akt en células HEK293T y U87. ....	84
5.2.3. Niveles de expresión del componente del complejo mTORC2: mTOR. ....	85
5.2.4. Viabilidad celular. ....	86
5.2.5. Autofagia y apoptosis. ....	87
5.3. DISCUSIÓN.....	88
6. APROXIMACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO mTORC2.....	97
6.1. INTRODUCCIÓN.....	97
6.2. RESULTADOS. ....	97
6.2.1. Microscopía electrónica de transmisión. ....	97
6.2.3. Crio-microscopía electrónica del complejo mTORC2.....	98
6.3. DISCUSIÓN.....	99
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	103
8. CONCLUSIONES .....	109
9. BIBLIOGRAFÍA.....	113



## ABREVIACIONES



## LISTA DE ABREVIACIONES

**4EBP:** del inglés Eif4e-binding protein

**AMPK:** del inglés, AMP-activated protein kinase)

**AMPK $\beta$ :** subunidad  $\beta$  de AMPK

**AVO1:** del inglés, Adheres Voracionsly to TOR2,1

**AVO3:** del inglés, Adheres Voracionsly to TOR2,3

**ATF4:** factor de transcripción activador 4

**ATG101:** del inglés, autophagy-related protein 101

**ATG13:** del inglés, autophagy-related protein 13

**BCL-2:** del inglés, B-cell lymphome 2.

**BN-PAGE:** del inglés, blue native polyacrylamide gel electrophoresis

**CAD:** del inglés, Carbamoyl phosphate synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase

**CaM:** Calmodulina.

**CCC:** carcinoma de células claras

**CRIM:** del inglés, conserved region in the middle

**DMEM:** medio esencial mínimo de Eagle

**DEP:** acrónimo de Dishevelled, Egl-10 y Pleckstrina.

**Deptor:** del inglés, DEP (domain-containing mTOR-interacting protein).

**ECL:** del inglés, enhanced chemiluminescence

**ECMV:** virus encefalomiocarditis

**EGFP:** del inglés, enhancer Green Fluorescence Protein

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento

**eIF4e:** del inglés, eukaryotic (translation) initiation factor 4E.

**Erk5:** del inglés, Extracellular-signal-regulated kinase 5

**FasL:** del inglés, Fas Ligand on CD95L

**FAT:** siglas de Frap, ATM, TRAAP.

**FIP2000:** del inglés, fusion-inhibiting peptide 2000

**FKBP12:** del inglés, FK506-binding protein.

**FLNA:** filamina A

**GBM:** glioblastoma multiforme

**GK:** glucoquinasa

**G $\beta$ L:** del inglés, G Protein  $\beta$  subunit like

**HEAT:** del inglés, huntingtin, elongation factor 3a subunit of protein phosphatase 2A and TOR1.

**HIF1 $\alpha$ :** del inglés, hipoxia-inducible factor 1-alpha

**HM:** motivo hidrofóbico

**HR:** región helicoidal

**HRS:** del inglés, horseradisch peroxidase

**hVps34:** del inglés, human vacuolar protein sorting-34.

**IRES:** del inglés, internal ribosome entry site

**MCS:** del inglés, multiple cloning site

**LC3:** proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3.

**mLST8:** Proteína letal 8 de mamífero con SEC13.

**mSIN1:** del inglés, mammalian SAPK interacting protein 1

**mTHF:** tetrahidrolato mitocondrial

**MTHFD2:** del inglés, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase

**mTOR:** del inglés, mechanistic target of rapamycin.

**mTORC1:** del inglés, mechanistic target of rapamycin complex 1.

**mTORC2:** del inglés, mechanistic target of rapamycin complex 2.

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difeniltetrazol

**NLS:** señalización de localización nuclear

**PD:** del inglés, Protein delivery

**PDCD4:** del inglés, programmed cell death protein 4

**PK1:** piruvato deshidrogenasa quinasa 1

**PDZ:** acrónimo de PSD95 (proteína de densidad postsináptica), DlgA (supresora de tumores en *Drosophila*) y zo-1 (proteína zonula occludens-1).

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa.

**PI3P:** fosfatidilinositol-3fosfato.

**PIKK:** del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase.

**PKA:** quinasa G

**PKC:** quinasa C

**PKG:** quinasa G

**PPP:** pentosa fosfato.

**PRAS40:** del inglés, proline-rich Akt substrate of 40 KDa.

**Protector:** del inglés, protein observed with Rictor

**PRPP:** fosforribosil pirofosfato

**PRPS:** 5-fosforribosil sintetasa

**PRPS2:** del inglés, ribose-phosphate pyrophosphokinase

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno

**Raptor:** Proteína reguladora asociada a mTOR.

**REDD:** del inglés, regulated in development and DNA damage responses 1

**Rictor:** del inglés, rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin

**RIP3:** del inglés, Ras-interacting protein 3

**RNC:** del inglés, Raptor N-terminal conserved.

**ROS:** especies de oxígeno reactivo

**S6K1:** p70S6 quinasa 1

**SAPK:** del inglés, stress-activated protein kinase

**SAC:** adenocarcinoma seroso

**SDS-PAGE:** del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SGK1:** del inglés, serum-and glucocorticoid-induced kinases

**SKAR:** del inglés, S6K1 Aly/REF-like substrate

**SREBPs:** elementos reguladores de esteroides.

**STE20:** (del inglés, protein: Serine/Threonine-protein kinase STE20)

**TFEB:** del inglés, transcription factor EB

**TM:** motivo de giro

**TNFR:** del inglés, tumor necrosis factor receptor.

**TOS:** del inglés, conserved TOR signalling.

**TPR:** Tetratricopéptido (TPR).

**TRAIL:** del inglés, Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand.

**TSC:** Complejo de esclerosis tuberosa.

**ULK1:** del inglés, unc-51 like autophagy activating kinase.

**UPS:** sistema ubiquitina proteosoma

**WD40:** 40 aminoácidos de triptófano y ácido aspártico.



**RESUMEN**



## RESUMEN

El receptor de rapamicina (del inglés, Mechanistic Target of Rapamycin) mTOR es una serina/treonina quinasa que constituye la subunidad catalítica de dos complejos diferentes tanto a nivel funcional como estructural: mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1, además de la subunidad mTOR, está formado por las proteínas mLST8 y Raptor además de dos subunidades inhibitorias: las proteínas Deptor y PRAS40. Entre las principales funciones del complejo mTORC1 se encuentra la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, así como la inhibición de rutas catabólicas como la autofagia. De este modo, mTORC1 juega un papel importante en la regulación del balance entre el anabolismo y catabolismo en respuesta a condiciones ambientales. Por otro lado, el complejo mTORC2 también presenta, junto a mTOR, las subunidades proteicas mLST8, Rictor, mSIN1, Deptor y Protor. Mientras que mTORC1 regula el crecimiento celular y el metabolismo, mTORC2 controla la proliferación y supervivencia celular mediante la fosforilación y activación de las proteínas Akt, PKC y SGK1. Entre las funciones del complejo mTORC2 se encuentra la regulación de la apoptosis, la reorganización del citoesqueleto así como de la síntesis de proteínas dependiente del complejo mTORC1.

Por lo tanto, ambos complejos, mTORC1 y mTORC2, se encuentran en el nódulo central de la vía de señalización del crecimiento y proliferación celular. Existen múltiples estudios que revelan tanto el papel funcional como la caracterización estructural del complejo mTORC1; por el contrario, sobre el complejo mTORC2 aún quedan muchas incógnitas por resolver en cuanto a su papel funcional, y hasta hace relativamente poco su estructura no era conocida. Dada la importancia clínica del complejo mTORC2, conocer la estructura del mismo serviría como pilar para el diseño de inhibidores específicos del complejo mTORC2. Sin embargo, el gran peso molecular del complejo mTORC2 superior a 1 MDa dificulta la purificación y la obtención de una muestra homogénea e íntegra que pueda ser caracterizada funcional y estructuralmente.

Por lo tanto, considerando estos antecedentes, el presente trabajo de investigación está basado en el estudio funcional y estructural del complejo mTORC2. Para ello, se divide en tres objetivos:

- Optimización de la purificación del complejo mTORC2 a partir de la sobreexpresión de la subunidad mSIN1 en células de mamífero HEK293T.
- Estudio de la integridad funcional del complejo mTORC2 a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* en células HEK293T y células U87.
- Aproximación estructural del complejo mTORC2 por técnicas de Microscopía Electrónica (ME).

La purificación del complejo mTORC2, se consiguió gracias a la obtención de una línea estable de células HEK293T que sobreexpresaban la subunidad específica del complejo mTORC2, mSIN1. El complejo fue purificado siguiendo varios pasos de purificación que incluyen principalmente cromatografías de afinidad y exclusión molecular. Además, los resultados obtenidos tras la cromatografía de exclusión molecular nos hicieron sospechar que el complejo podría encontrarse en forma dimérica. Por otro lado, las primeras imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica por tinción negativa revelaban la presencia de agregados indicando que el complejo no era estable. Por este motivo se llevó a cabo una ultracentrifugación en gradiente de densidad con un agente entrecruzador (GraFix). Los resultados obtenidos confirmaron que el complejo mTORC2 se podría encontrar formando dímeros. De este modo, está técnica permitió obtener un complejo más estable y homogéneo que serviría para la caracterización estructural del mismo.

Tras la purificación del complejo mTORC2 se llevaron a cabo ensayos *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de determinar si el complejo aún mantenía su integridad funcional. Los ensayos *in vitro* consistieron en una incubación del complejo mTORC2 purificado junto con la proteína recombinante Akt. Los resultados de estos mostraban un aumento en los niveles de Akt fosforilada, sugiriendo que el complejo mTORC2 mantenía íntegra su actividad quinasa tras el proceso de purificación. Por otro lado, los ensayos *in vivo* consistían en introducir el complejo mTORC2 en el interior de dos líneas celulares: HEK293T y U87. Posteriormente, el estudio de los niveles de Akt fosforilada mostraban un aumento de la fosforilación de Akt solo para las células HEK293T, mientras que las células U87 no presentaban una variación significativa.

Debido al importante papel que juega el complejo en el proceso de supervivencia celular, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular en ambas líneas celulares tras introducir el complejo mTORC2 en el interior celular. Se observó una disminución de la viabilidad en el caso de la línea celular HEK293T. En ninguna de las dos líneas celulares se detectó la presencia de la caspasa 3. Sin embargo, los niveles de LC3-II sí se vieron aumentados significativamente tras introducir el complejo mTORC2 en el interior de las células HEK293T.

Finalmente, el complejo mTORC2 se sometió al estudio estructural mediante microscopía de transmisión y crio-microscopía.

Tras los resultados obtenidos se podría concluir que:

- A pesar de su elevado peso molecular e inestabilidad, el proceso de purificación del complejo mTORC2 ha sido satisfactoriamente optimizado obteniendo muestras del mismo íntegras y homogéneas.
- La caracterización bioquímica y estructural del complejo mTORC2 demuestra que este se encuentra formando dímeros.
- Los ensayos de fosforilación de Akt, como principal sustrato del complejo mTORC2, *in vitro* e *in vivo* indican que el complejo mTORC2 mantiene su actividad quinasa fosforilando el residuo S473 de Akt tras el proceso de purificación.
- La línea celular HEK293T, ante la inclusión del complejo mTORC2 exógeno en su interior, responde con un aumento significativo de la actividad quinasa del complejo; mientras que este aumento de la actividad quinasa del complejo mTORC2 para la línea celular U87, células tumorales del glioblastoma multiforme, es imperceptible.
- La viabilidad de la línea celular HEK293T se ve comprometida tras la inclusión del complejo mTORC2; mientras que en las U87 no se ve afectada la viabilidad de las células.
- La viabilidad celular de la línea celular HEK293T se ve afectada debido a que el proceso de autofagia podría presentarse como un posible mecanismo de defensa frente a ese aumento en los niveles del complejo mTORC2.
- La aproximación estructural del complejo mTORC2 muestra la existencia de una cavidad central como consecuencia de la unión de los dos heterodímeros alrededor del cual se disponen las subunidades del complejo mTORC2.

- La aproximación tridimensional del complejo mTORC2 muestra una cavidad estrecha debido a la unión de Rictor y mSIN1 y; por lo tanto, como ha sido confirmado anteriormente, la región FRB de mTOR no queda accesible para la rapamicina.



## SUMMARY



## SUMMARY

The rapamycin receptor (Mechanistic Target of rapamycin) mTOR is a serine / threonine kinase that forms the catalytic subunit of two structural and functional different complexes: mTORC1 and mTORC2. The mTORC1 complex, in addition to the mTOR subunit, consists of mLST8, Raptor proteins and two inhibitory subunits: Deptor and PRAS40 proteins. Among the main functions of the mTORC1 complex are the synthesis of proteins, lipids and nucleotides, together with the inhibition of catabolic pathways such as autophagy. Therefore, mTORC1 plays an important role in regulation the equilibrium between anabolism and catabolism in response to environmental conditions. Instead, the mTORC2 complex also contains, in addition to mTOR, the protein subunits mLST8, Rictor, mSIN1, Deptor and Protor. While mTORC1 regulates cell growth and metabolism, mTORC2 controls cell proliferation and survival by phosphorylation and activation of Akt, PKC and SGK1 substrates. Amongst the functions of the mTORC2 complex are the regulation of apoptosis and the reorganization of the cytoskeleton as well as the protein synthesis dependent on the mTORC1 complex.

Therefore, both complexes, mTORC1 and mTORC2, are located in the central node of the signalling pathway for cell growth and proliferation. There are multiple studies that reveal both the functional role and the structural characterization of the mTORC1 complex. However, regarding the mTORC2 complex, there are still many unknowns to solve in terms of their functional role and, its structure was not known until recently. Given the clinical implication of the mTORC2 complex, the knowledge of its structure would serve as a mainstay for the design of specific inhibitors of the mTORC2 complex. However, the high molecular weight of the mTORC2 complex, higher than 1 MDa, makes it difficult to purify it in order to obtain a homogenous and integrated sample which could be structurally studied at high resolution by techniques such as electron microscopy.

On the other hand, the three-dimensional approach of the structure of the complex shows a narrow and inaccessible cavity. Rictor and mSIN1 are responsible for this narrowing that prevents rapamycin from accessing the mTOR FRB domain.

Taking into account this background, the present research deals with the functional and structural study of the mTORC2 complex. To achieve this goal, our proposal is based in:

- Optimization of mTORC2 complex purification from overexpression of the mSIN1 subunit in mammalian HEK293T cells.
- Study of the functional integrity of the mTORC2 complex through *in vitro* and *in vivo* assays in HEK293T cells and U87 cells.
- Structural approach of the mTORC2 complex using Electron Microscopy (EM) techniques.

The purification of the mTORC2 complex was achieved thanks to perform a stable line of HEK293T cells was established that overexpressed the specific subunit of the mTORC2 complex. mTORC2 was purified following several purification steps mainly including both affinity and size exclusion chromatography. Furthermore, the results obtained after the size exclusion chromatography make suspected that the oligomerization state of the complex should be a dimer. On the other hand, the first negative stain Electron Microscopy images revealed the presence of aggregates indicating that the complex was not stable. For this reason, a density gradient ultracentrifugation with crosslinking agent (GraFix) was carried out. The results obtained

confirmed that mTORC2 could be forming dimers. In addition, this technique allowed to obtain a more stable and homogeneous sample of mTORC2 complex for the subsequent structural characterization.

After purification of the mTORC2 complex, *in vitro* and *in vivo* assays were carried out to determine the functional integrity of the complex. To reach this goal, the *in vitro* assay consisted in incubation of mTORC2 complex with the recombinant Akt protein was induced. The results showed an increase in phosphorylated Akt levels indicating that the mTORC2 complex kept its kinase activity intact after the purification process. On the other hand, the *in vivo* assays consisted in the incorporation of mTORC2 complex into two cell lines: HEK293T and U87. Subsequently, the study of phosphorylated Akt levels showed an increase in Akt phosphorylation just in the case of HEK293T cells, whereas U87 cells showed no significant variation.

Due to the important role of the complex in cell survival process, a cell viability assay was carried out both, HEK293T and U87, cell lines after of the mTORC2 complex incorporation. A decrease in their viability was observed in the HEK293T cell line. Consequently, the apoptosis and autophagy activity processes were studied measuring the expression levels of caspase 3 and LC3-II, respectively. The caspase 3 expression level were not detected; however the LC3-II expression levels were significantly increased after incorporation of mTORC2 complex into HEK293T cells.

Finally, the mTORC2 complex was subjected to structural study by Electron Microscopy. The cryo-EM structural studies revealed a 3D model where a central core around which the different subunits of the heterodimers of mTORC2 complex are arranged.

Taking the results obtained into consideration we may conclude that:

- Despite having a high molecular weight and instability, the purification process of mTORC2 complex has been satisfactorily optimized, obtaining stable and homogeneous samples.
- The biochemical and structural characterization of mTORC2 complex shows a dimer as the oligomerization state of the complex.
- Regarding the phosphorylation of Akt, as the main substrate of mTORC2 complex, *in vitro* and *in vivo* assays indicate that mTORC2 complex keeps its kinase activity to phosphorylate the S473 residue during the purification process.
- The HEK293T cell line, before the insertion of the exogenous mTORC2 complex, responds with a significant increase in the kinase activity of the complex, while this increase in kinase activity of the mTORC2 complex for the U87 cell line, glioblastoma derived tumor cells, is unrevealed.
- The viability of the HEK293T cell line is compromised after the insertion of the purified mTORC2 complex while in U87 cells the viability of the cells is not affected.
- The decrease viability of the HEK293T cell line observed during the process of autophagy could be a defence mechanism against the increase in mTORC2 levels.
- The structural approach of the mTORC2 complex shows the existence of a central cavity as a consequence of the assembling of the two heterodimers where the subunits of mTORC2 complex are located.

- The 3D approach of the mTORC2 complex shows a narrow cavity due to Rictor and mSIN1 binding, corroborating the structure results of mTORC2 complex obtained recently, therefore the FRB region of mTOR is not accessible to rapamycin.



# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. mTOR, receptor de rapamicina en mamíferos.

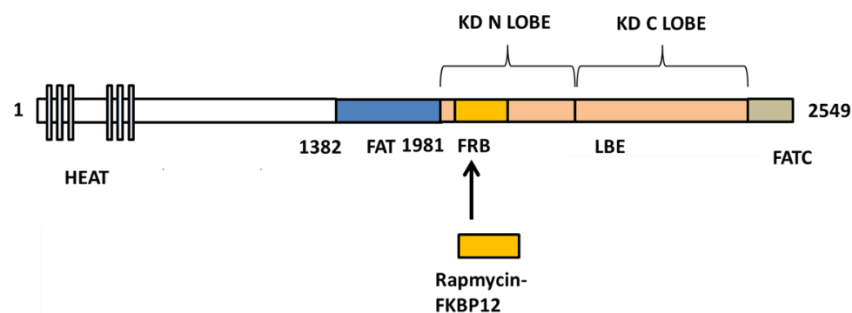
En 1964, una expedición canadiense hacia la isla de Rapa Nui en el sur del Pacífico, colectó muestras del suelo con el objetivo de identificar un agente antimicrobiano. En la purificación de bacterias de una de estas muestras, Sehgaland y colegas descubrieron un compuesto con características antifúngicas, inmunosupresivas y propiedades antitumorales [1-3]. Estudios posteriores de este compuesto, al que denominaron rapamicina, revelaron que su actividad se basaba en la formación de un complejo con la isomerasa FKBP12 (del inglés, FK506-binding protein) para inhibir la traducción para la ruta de señalización de la proliferación y crecimiento celular [4].

A pesar de estos avances, el mecanismo de acción de la rapamicina no fue descrito hasta 1994, cuando estudios bioquímicos identificaron a mTOR (del inglés, mechanistic target of rapamycin) como el receptor directo del complejo formado por la rapamicina y FKBP12 en mamíferos [5-7].

Durante más de dos décadas desde su descubrimiento, decenas de laboratorios en todo el mundo situaron al receptor de la rapamicina en el núcleo de la señalización en eucariotas coordinando el crecimiento celular con las condiciones ambientales jugando un papel fisiológico fundamental a nivel celular y de organismo.

mTOR es una serina treonina quinasa de la familia de las quinasas PIKK (del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) y constituye la subunidad catalítica de dos complejos diferentes conocidos como mTORC1 y mTORC2 (del inglés, mechanism target of rapamycin complex 1 and complex 2).

Como miembro de la familia de las quinasas PIKK, mTOR presenta una elaborada organización de dominios. En primer lugar, el dominio quinasa se encuentra situado en el extremo C-terminal, seguido de las primeras repeticiones HEAT (del inglés, huntingtin, elongation factor 3a subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) y repeticiones tetratricopeptídicas (TPR). El estudio cristalográfico del fragmento C-terminal de mTOR, demuestra también la presencia de dominios FAT (Frap, ATM, TRRAP) (Figura 1.1) [8, 9].



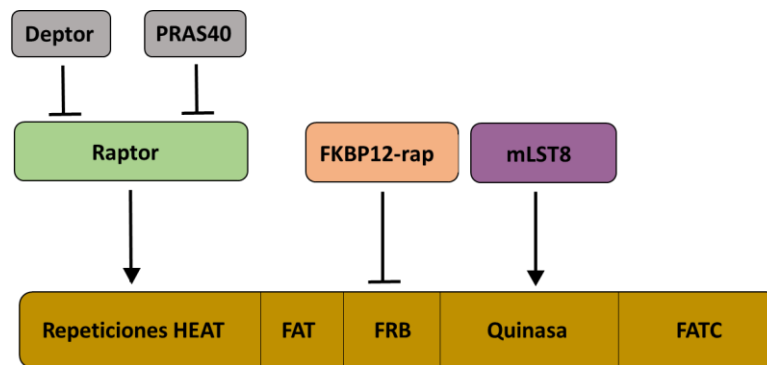
**Figura 1.1.** Organización de los dominios presentes en la proteína mTOR.

La inhibición de mTOR por la rapamicina es dependiente de la formación de un complejo con un receptor intracelular, la proteína de unión FK506 (FKBP) [10, 11]. Este complejo FKBP-rapamicina será el que se unirá después al dominio quinasa de mTOR. FKBP interacciona con mTOR a través de la molécula hidrofóbica, rapamicina. Estructuralmente, la región N-terminal del dominio quinasa forma el dominio de unión del complejo FKBP-rapamicina (FRB) que sobresale del lóbulo N. La unión del complejo FKBP-rapamicina al dominio FRB hace que la hendidura del sitio activo sea más estrecha, sugiriendo una inhibición debido a un impedimento estérico [12].

## 1.2. mTORC1

### 1.2.1. Componentes

El complejo de mamífero mTORC1 (del inglés, mechanistic target of rapamycin complex 1) está constituido por tres componentes principales: mTOR, proteína reguladora asociada a mTOR (Raptor) y la proteína letal 8 de mamíferos con SEC13 (mLST8) también conocida como GβL (del inglés, G Protein β subunit like) (Figura 1.2) [13, 14].



**Figura 1.2.** Subunidades del complejo mTORC1 y su correspondiente sitio de unión a mTOR.

Raptor, proteína de 150 kDa, constituye una de las subunidades específicas del complejo mTORC1. Ésta contiene una región altamente conservada en el extremo N-terminal (RNC, del inglés, Raptor N-terminal conserved) seguida por tres repeticiones HEAT y siete repeticiones WD40 (pequeño motivo estructural de aproximadamente 40 aminoácidos frecuentemente terminado en un dipéptido formado por triptófano (W) y ácido aspártico (D)) en el extremo C-terminal (Figura 1.3A). La interacción mTOR-Raptor es muy dinámica y tiene lugar a través de las repeticiones HEAT de mTOR y múltiples sitios de unión de Raptor [13]. Raptor es indispensable para que mTOR fosforile los sustratos S6K1 y 4E-BP1 [15], facilitando su reclutamiento hacia mTORC1 a través de su unión a la región TOS (del inglés, TOR signaling) identificada en varios sustratos del complejo [16]. Además, Raptor es imprescindible para una correcta localización subcelular del complejo [17].

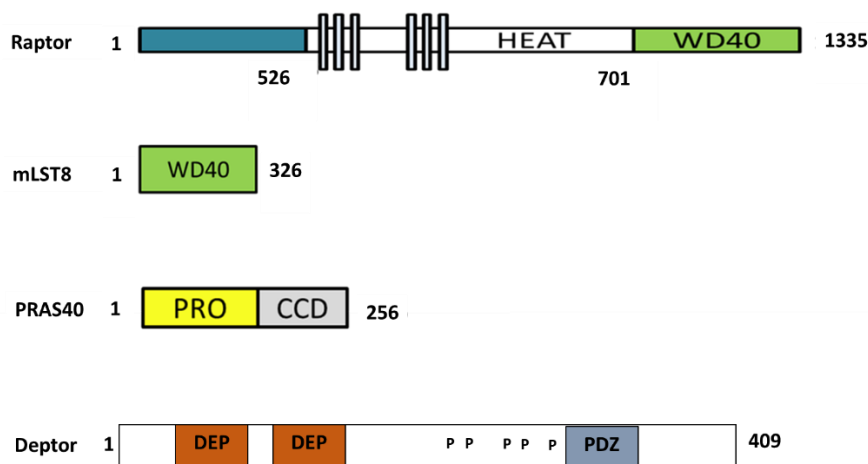
La proteína de mamífero mLST8 fue identificada como un componente estable de ambos complejos, mTORC1 y mTORC2 [14]. Está formada por siete repeticiones WD40 (Figura 1.3B). mLST8 se asocia al dominio catalítico de ambos complejos, mTORC1 y mTORC2 estabilizando el bucle de activación quinasa del mismo [12]. Estudios genéticos determinan que mLST8 es indispensable para una correcta funcionalidad del complejo mTORC1 [18].

Por último, el complejo mTORC1 también contiene dos subunidades inhibitorias PRAS40 (del inglés, proline-rich Akt substrate of 40 kDa) [19-21] y Deptor (del inglés, DEP ( domain-containing

mTOR-interacting protein)[22]. La activación del complejo mTORC1 ocurre en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento, resultando en la fosforilación de PRAS40 y Deptor por parte de mTORC1. Esto permite la disociación de ambos componentes del complejo y la liberación del mismo de la actividad inhibitoria [17, 23].

PRAS40 ha sido definido como un regulador negativo de mTORC1 [19]. El gen que codifica para la proteína PRAS40 se encuentra en el cromosoma 19q13.33, el cual genera 3 variaciones transcripcionales [24, 25]. El extremo N-terminal contiene dos regiones enriquecidas con prolina seguidas de dos motivos cortos implicados en la unión al complejo mTORC1 (figura 1.3C) [21, 26, 27]. PRAS40 interactúa con el complejo mTORC1 a través del sitio de unión a sustratos de Raptor [26]. Esta interacción se debilita mediante insulina y en una menor medida mediante amino ácidos permitiendo su disociación del complejo mTORC1 [19-21, 26, 28]. La principal quinasa que participa en la fosforilación de PRAS40 es Akt, esta fosforila el residuo T246 a través de la vía de señalización activada por la insulina [29]. Por otro lado, el propio complejo mTORC1 está implicado en la fosforilación de múltiples sitios de PRAS40, (S183, S202, S203, S212, S221) promovido por insulina y aminoácidos [27, 30]. Una hiperfosforilación de PRAS40 inducida por glucosa está implicada en la aparición de una diabetes nefropática [31].

Por otro lado, Deptor es una proteína monomérica de 46 kDa codificada por el gen Deptor localizado en el cromosoma 8 [32]. Esta proteína de 409 aminoácidos contiene tres dominios altamente conservados: dos dominios DEP (acrónimo de Dishevelled, Egl-10 y Pleckstrina) en tándem en la región N-terminal con una función importante en cuanto a su asociación a membrana, y el dominio PDZ (dominio de 80-90 aminoácidos cuyo nombre es el acrónimo de las primeras letras de tres proteínas donde primero se descubrió el dominio: proteína de densidad postsináptica (PSD95), supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA) y la proteína zonula occludens-1 (zo-1)) situado en la región C-terminal cuya función se relaciona con la interacción proteína-proteína [22, 33]. Entre ambas regiones existen múltiples sitios de fosforilación relacionados con la regulación funcional de la proteína (Figura 3D)[22, 34]. Deptor se encuentra en ambos complejos, mTORC1 y mTORC2, y desempeña un importante papel inhibitorio de la actividad quinasa de mTOR. Varios estudios han demostrado que la expresión de Deptor está sujeta a una regulación estricta ejercida por varios mecanismos en los que ambos complejos mTORC1 y mTORC2, están implicados regulando negativamente la expresión del ARNm de Deptor [22].



**Figura 1.3.** Representación esquemática de la organización de las diferentes subunidades del complejo mTORC1: Raptor, mLST8, PRAS40 y Deptor.

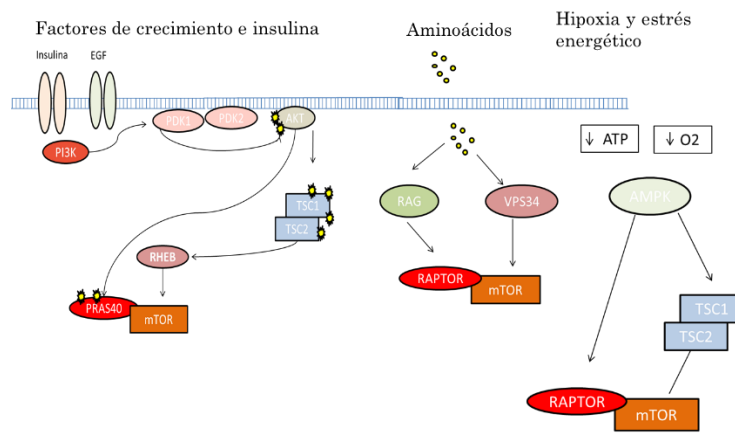
### 1.2.2. Vías de activación de mTORC1

Los estudios de la rapamicina en 1990 situaron a mTORC1 como mediador en la ruta de señalización de varios factores de crecimiento, donde el complejo TSC (Complejo de Esclerosis Tuberosa) es el modulador inhibitorio de la ruta. Este complejo está compuesto por dos proteínas diferentes (TSC1/TSC2) cuyo único dominio funcional conocido se encuentra en la región C-terminal de TSC2 siendo la proteína Rheb el sustrato del mismo. El complejo TSC acelera la hidrólisis de Rheb, generando un cambio de su forma activa (GTP) a su forma inactiva (GDP). Bajo óptimas condiciones de crecimiento, donde los factores de crecimiento y la insulina activan e inactivan al complejo TSC1/2, Rheb-GTP activa al complejo mTORC1 [35, 36].

Por otro lado, en respuesta a insulina y factores de crecimiento, el sustrato Akt es fosforilado (pAkt) y activado, a través de la ruta de señalización de la proteína fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). Muchos estudios han demostrado que pAkt promueve la señalización de mTORC1 mediante la fosforilación en múltiples sitios de TSC2 produciendo su inactivación [37]. Además, pAkt fosforila a la subunidad inhibitoria del complejo mTORC1, PRAS40, en el residuo T246. Esta fosforilación permite la disociación de PRAS40 del complejo mTORC1 reduciendo su capacidad inhibitoria del mismo [20].

mTORC1 también puede ser activado por aminoácidos mediante varios mecanismos moleculares propuestos como la respuesta a aminoácidos de las proteínas Rag. Los mamíferos expresan cuatro proteínas Rag: RagA, RagB, RagC y RagD que interactúan con el complejo trimérico Ragulator, situándose en la superficie lisosomal. Cuando se da el nivel suficiente de aminoácidos, el heterodímero RagA/B GTPasa se activa acercando al complejo mTORC1 a la membrana lisosomal a través de Raptor. Una vez allí, el complejo mTORC1 está lo suficientemente próximo a su activador Rheb [38]. Por otro lado, se ha demostrado que el calcio también participa en la vía de activación del complejo mTORC1 mediante aminoácidos. Ante la presencia de un nivel de aminoácidos adecuado, se genera un flujo de calcio que activa a hVps34 (del inglés, human vacuolar protein sorting-34) a través de la calmodulina (CaM) generando fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). Este PI3P promueve la activación de mTORC1 [39].

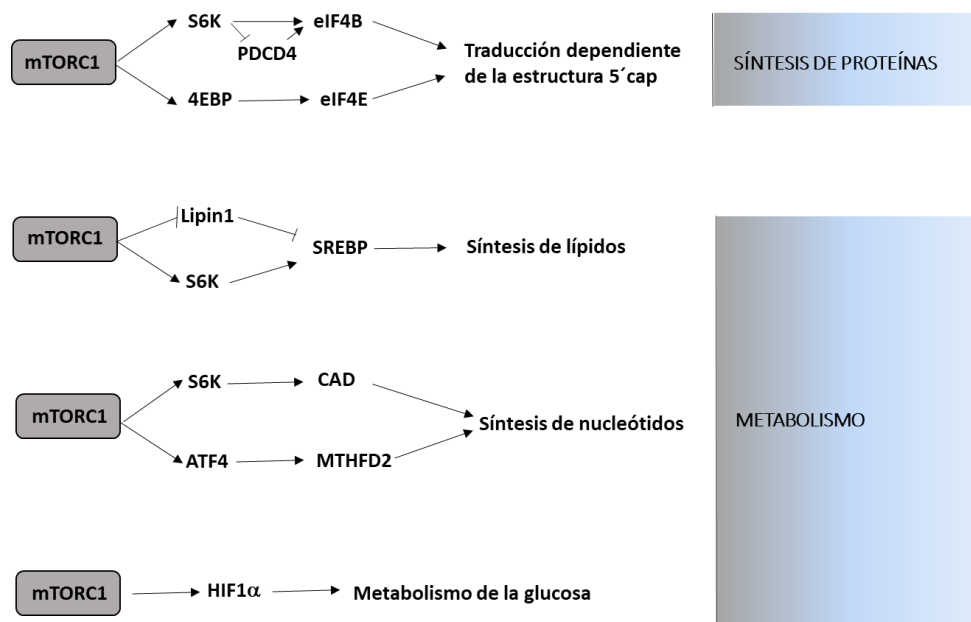
mTORC1 también responde a señales intracelulares y ambientales que son incompatibles con el crecimiento celular como bajos niveles de ATP, hipoxia o daños en el ADN. Una reducción de la energía celular activa el regulador metabólico AMPK (del inglés, AMP-activated protein kinase). AMPK funciona como una serina/treonina quinasa que directamente fosforila a la subunidad TSC2 del complejo TSC. Por consiguiente, este complejo se activa con la consecuente activación del complejo mTORC1 [40-42]. La hipoxia también inhibe al complejo mTORC1 en parte por la activación de AMPK, y también mediante la inducción de la expresión de la proteína altamente conservada REDD1 (del inglés, regulated in development and DNA damage responses 1) el cual activa al complejo TSC [43]. Finalmente, en respuesta al daño en el ADN se induce la expresión de p53, proteína supresora de tumores que a su vez actúa promoviendo la expresión de AMPK $\beta$  (subunidad  $\beta$  de AMPK), TSC2 y PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa). PTEN también se trata de una proteína supresora de tumores que antagoniza la ruta de señalización PI3K, inhibiendo la activación de Akt. Por lo tanto, la inducción de expresión de estas proteínas, promueven la activación del complejo TSC, lo que resulta en una inhibición del complejo mTORC1 [44].



**Figura 1.4.** Representación esquemática de las vías de activación del complejo mTORC1.

### 1.2.3. Funciones y sustratos del complejo mTORC1

Para crecer y dividirse, las células deben incrementar la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos mientras que al mismo tiempo se suprimen rutas catalíticas como la autofagia. mTORC1 juega un papel importante en la regulación de estos procesos y por lo tanto controla el balance entre el anabolismo y el catabolismo celular en respuesta a condiciones ambientales (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Principales vías de señalización del complejo mTORC1: traducción del ARNm, síntesis de lípidos, síntesis de nucleótidos y metabolismo de la glucosa.

### 1.2.3.1. Síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas es uno de los procesos que demandan más energía en la célula, por lo tanto, es esencial que este proceso ocurra solamente en condiciones energéticas favorables. mTORC1 promueve la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de dos efectores, p70S6 quinasa 1 (S6K1) y la proteína 4EBP (del inglés, eIF4E-binding protein).

4EBP es un importante inhibidor de la síntesis de proteínas mediante su unión a eIF4E (del inglés, (eukaryotic (translation) initiation factor 4E). Esta unión es regulada directamente por mTORC1, ya que al fosforilar a 4EBPs permite la liberación de eIF4E [45, 46]. En células quiescentes, el factor 4E-BP1 sin fosforilar se une firmemente a eIF4E. Como 4E-BP1 compite con eIF4G por el mismo sitio de unión con eIF4E, 4E-BP1 previene que eIF4G interactúe con eIF4E. Cuando mTORC1 se activa y fosforila a 4E-BP1 se produce su disociación de eIF4E favoreciendo el reclutamiento de eIF4A y eIF4G al extremo 5' del ARNm. Finalmente, eIF3, la subunidad pequeña del ribosoma y el complejo terciario (eIF2, Met-ARNT y GTP), son recluidos hacia la estructura cap, resultando en el ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la traducción 48S, ribosoma e iniciación de la traducción [45, 46]. Sirviendo como un apoyo en el ensamblaje del complejo de iniciación de la traducción, el factor eIF4G es también fosforilado en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento en diferentes sitios, alguno de ellos dependientes de mTORC1. Estos sitios están agrupados en una región bisagra de eIF4G que une dos dominios estructurales, de tal modo que la modificación podría inducir cambios conformacionales en la proteína que afectan en su actividad [45].

Otro importante sustrato de mTORC1 relacionado con la síntesis de proteínas son las proteínas S6Ks que incluye S6K1 y S6K2. Aunque la activación de S6K requiere de múltiples fosforilaciones inducidas por factores de crecimiento, se han identificado dos fosforilaciones esenciales. La primera de ellas es en el residuo T229, el cual está localizado en el bucle de la activación catalítica, y el segundo se trata del residuo T389, localizado en el motivo hidrofóbico del dominio quinasa. La activación de S6K es mediada por la fosforilación en el residuo T389 llevada a cabo por mTORC1, dando lugar a la formación del sitio de acoplamiento para la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), la cual fosforila el residuo T229 para activar SK6 [47]. El complejo de pre-iniciación de la traducción es recluido al extremo 5' del ARNm, para ello es necesario que la estructura se linealice para poder acceder al primer codón de iniciación. El factor de iniciación eIF4A, con actividad helicasa, lleva a cabo esta linealización estimulado por el cofactor eIF4B que a su vez se encuentra regulado por el sustrato de mTORC1, S6K1. De acuerdo con el papel estimulador de síntesis de proteínas del complejo mTORC1, S6K1 fosforila eIF4A en el residuo S422, el cual es localizado en la región de unión al ARN y es necesario para promover la actividad helicasa de eIF4A [48]. PDCD4 (del inglés, Programmed cell Death Protein 4) es una proteína que en humanos se une a eIF4A inhibiendo la actividad helicasa de este factor de crecimiento [49]. Ambos, PDCD4 y eIF4G, contienen un motivo conservado que media en la unión con el factor eIF4A. PDCD4 también podría prevenir la incorporación de eIF4A en el complejo EIF4F mediante la competición con eIF4G por la unión a eIF4A [50]. Bajo estimulación por factores de crecimiento, PDCD4 puede rápidamente fosforilar el residuo S67 mediante S6K1 y subsecuentemente degradado por la ubiquitina ligasa  $\beta$ -TrCP. Por lo tanto, la fosforilación de PDCD4 dependiente de S6K1 previene el efecto inhibitorio de PDCD4 en la actividad helicasa de eIF4A [51]. Por otro lado, varios estudios han demostrado que SKAR (del inglés, S6K1 Aly/REF-like substrate), sustrato de S6K1, también está implicado en el control del crecimiento celular aumentando la eficiencia del splicing de la traducción de los ARNm [52, 53].

### 1.2.3.2. Síntesis de lípidos.

El crecimiento celular requiere de la síntesis de lípidos para la formación de una membrana nueva y su expansión. La lipogénesis es un proceso celular a través del cual la acetil-CoA, molécula intermedia clave en el metabolismo, es convertida en ácidos grasos. Para ello, mTORC1 juega un papel central promoviendo la biogénesis de lípidos mediante la regulación de la expresión de varios genes lipogénicos [54]. Una importante familia de factores de transcripción que están implicados en la síntesis de lípidos está compuesta por las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs). Estas proteínas controlan la homeostasis lipídica mediante el control de la expresión de varios genes lipogénicos [55]. Dicha familia está compuesta por tres isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c, y SREBP-2. mTORC1 estimula la actividad de SREBP-1 induciendo su expresión, procesamiento y acumulación en el núcleo [56]. Porstmann y colaboradores observaron que la rapamicina bloqueaba la expresión y acumulación en el núcleo de SREBP-1 en células epiteliales, evidenciando la existencia de la regulación de estas proteínas por parte del complejo mTORC1 [57]. Otro mecanismo importante por el cual mTORC1 regula la activación de las proteínas SREBPs es a través de lipin-1. Lipin-1 es una fosfatasa requerida para la biosíntesis de glicerolípidos. Esta proteína también sirve como un coactivador transcripcional que regula la expresión de los genes lipogénicos. Cuando está activo el complejo mTORC1 promueve la activación de SREBPs induciendo su acumulación en el núcleo a través de un mecanismo en el que está implicado lipin-1. En el caso de inhibición de mTORC1, lipin-1 se acumula en el núcleo, esta acumulación promueve la asociación de SREBPs a la matriz nuclear y perjudica su capacidad de unión a los genes lipogénicos inhibiendo la síntesis de lípidos [58].

### 1.2.3.3. Síntesis de nucleótidos.

Además de la síntesis de proteínas y lípidos, la síntesis de los ácidos nucleicos también es necesaria para el crecimiento celular. Estudios recientes han establecido que mTORC1 también promueve la síntesis *de novo* de las bases pirimidínicas y purícas requeridas para la replicación del ADN y la biogénesis del ribosoma en células en crecimiento y proliferación, a través de una variedad de mecanismos durante la transcripción o post-transcripción. La activación de mTORC1 permite la estimulación de la síntesis *de novo* de pirimidinas a través de la fosforilación en la enzima multifuncional llamada CAD (del inglés, Carbamoyl phosphate synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase) mediante el sustrato S6K1. Dicha enzima cataliza los primeros tres pasos de la síntesis de pirimidínicas [59-61]. Sin embargo, la activación de CAD mediante S6K1 no es necesaria para una actividad basal de esta ruta metabólica, pero si es responsable del aumento de la actividad de la misma en respuesta a factores de crecimiento que estimulan la señalización de mTORC1. La activación del complejo mTORC1 también estimula la síntesis de purinas a través de efectos transcripcionales en múltiples enzimas que alimentan la ruta de señalización de su síntesis, incluidas la ruta de la pentosa fosfato (PPP), así como la ruta de síntesis de glicina y serina y la ruta mitocondrial del tetrahidrofolato (mTHF). La enzima MTHFD2 (del inglés, methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 2) es particularmente sensible a la activación de mTORC1 y proporciona el carbono necesario para la síntesis de purinas. La señalización de mTORC1 eleva la expresión de MTHFD2 mediante el incremento de la traducción del ARNm que codifica para el factor de transcripción activador 4 (ATF4) [62]. Curiosamente, un estudio sugiere que mTOR promueve el ensamblaje del complejo de enzimas responsables de la síntesis de purinas [63]. Dos factores de transcripción más, Myc y SREBP, han sido relacionados con un aumento en la síntesis de purinas al activarse el complejo mTORC1. Se ha establecido que Myc induce la expresión de varias enzimas implicadas tanto en la síntesis de purinas como

de pirimidinas [64]. Esto, junto con la inducción de la biogénesis del ribosoma, mTORC1 promueve la producción de *novó* de nucleótidos para sustentar la síntesis de ARNr y la síntesis de DNA en células en crecimiento. La principal ruta metabólica para la síntesis de ambas bases de nucleótidos es la de PPP, ya que es la única fuente de ribosa derivada de la glucosa. Para la síntesis de nucleótidos, la ribosa 5-fosfato es convertida en fosforribosil pirofosfato (PRPP) por la acción de la enzima 5-fosforribosil sintetasa (PRPS). Un estudio reciente ha demostrado que la sobre-expresión de Myc aumenta la traducción de PRPS2 (del inglés, ribose-phosphate pyrophosphokinase) para promover la síntesis de nucleótidos [62]. Además, la activación de SREBP mediante mTORC1 permite el incremento del flujo oxidativo de la ruta de las pentosas, el cual utiliza carbonos de la glucosa para generar NADPH, favoreciendo las rutas anabólicas de nucleótidos y lípidos [65].

#### **1.2.3.4. Metabolismo de la glucosa.**

mTORC1 también facilita el crecimiento celular promoviendo un desplazamiento en el metabolismo de la glucosa de la fosforilación oxidativa hacia la glicolisis. mTORC1 incrementa la traducción del factor de transcripción HIF1 $\alpha$  (del inglés, hypoxia-inducible factor 1-alpha) el cual dirige la expresión de varias enzimas glicolíticas como la fosfofructoquinasa [66]. Además, la activación de SREBP dependiente del complejo mTORC1 permite incrementar el flujo de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, la cual utiliza los carbonos de la glucosa para generar GAPDH y otros metabolitos necesarios para la proliferación y crecimiento celular [67].

#### **1.2.3.5. Catabolismo de proteínas.**

En respuesta a la limitación de nutrientes o condiciones estresantes para la célula, está induce una serie de respuestas para permitir su supervivencia frente a condiciones adversas. El punto de convergencia entre los procesos anabólicos y catabólicos de la célula es el receptor de la rapamicina mTOR, componente principal del complejo mTORC1.

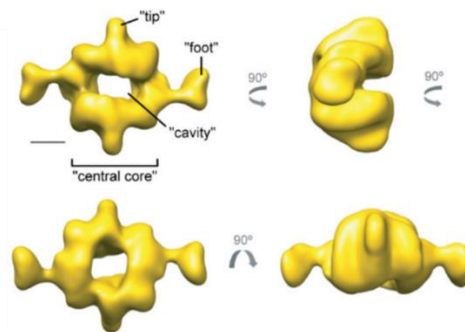
El proceso de la autofagia es una de las principales respuestas de supervivencia y en la que el complejo mTORC1 está implicado junto con ULK1 (del inglés, unc-51 like autophagy activating kinase). La autofagia es un proceso conservado evolutivamente a través del cual los componentes citoplasmáticos, como macromoléculas u orgánulos, son capturados mediante una doble membrana denominada fagoforos que maduran en autofagosomas y posteriormente se degradan en lisosomas. Un paso importante en el comienzo de la autofagia es la activación de ULK1, una quinasa que forma un complejo con las proteínas ATG13 (del inglés, Autophagy-related protein 13), FIP2000 (del inglés, Fusion-inhibiting peptide 2000) y ATG101 (del inglés, Autophagy-related protein 101) y conduce hacia la formación del autofagosoma. En condiciones de altos niveles de nutrientes, mTORC1 fosforila ULK1, previniendo su activación mediante AMPK, activador clave de la autofagia [68]. Por lo tanto, la actividad relativa de mTORC1 y AMPK en diferente contexto celular, mayormente determina el grado de inducción de la autofagia. mTORC1 también regula el proceso de la autofagia fosforilando e inhibiendo la translocación nuclear del factor TFEB (del inglés, transcription factor EB), el cual promueve la expresión de los genes de la biogénesis lisosomal y la maquinaria de la autofagia [69-71].

Otra respuesta importante de supervivencia celular es el proceso implicado en el reciclado de proteínas llevado a cabo por el sistema ubiquitina proteosoma (UPS), a través del cual las proteínas son selectivamente marcadas para su degradación por el proteosoma 20S seguido de una modificación covalente llevada a cabo por ubiquitina. Estudios recientes han demostrado

que la inhibición de mTORC1 incrementa la proteólisis dependiente del proteosoma a través de un incremento de la ubiquitinización de las proteínas o un incremento de las chaperonas proteosomales mediante la inhibición de Erk5 (del inglés, Extracellular-signal-regulated kinase 5) [72, 73]. Sin embargo, se ha descrito que una hiperactivación genética de mTORC1 también incrementa la actividad del proteosoma [74].

#### 1.2.4. Caracterización estructural del complejo mTORC1

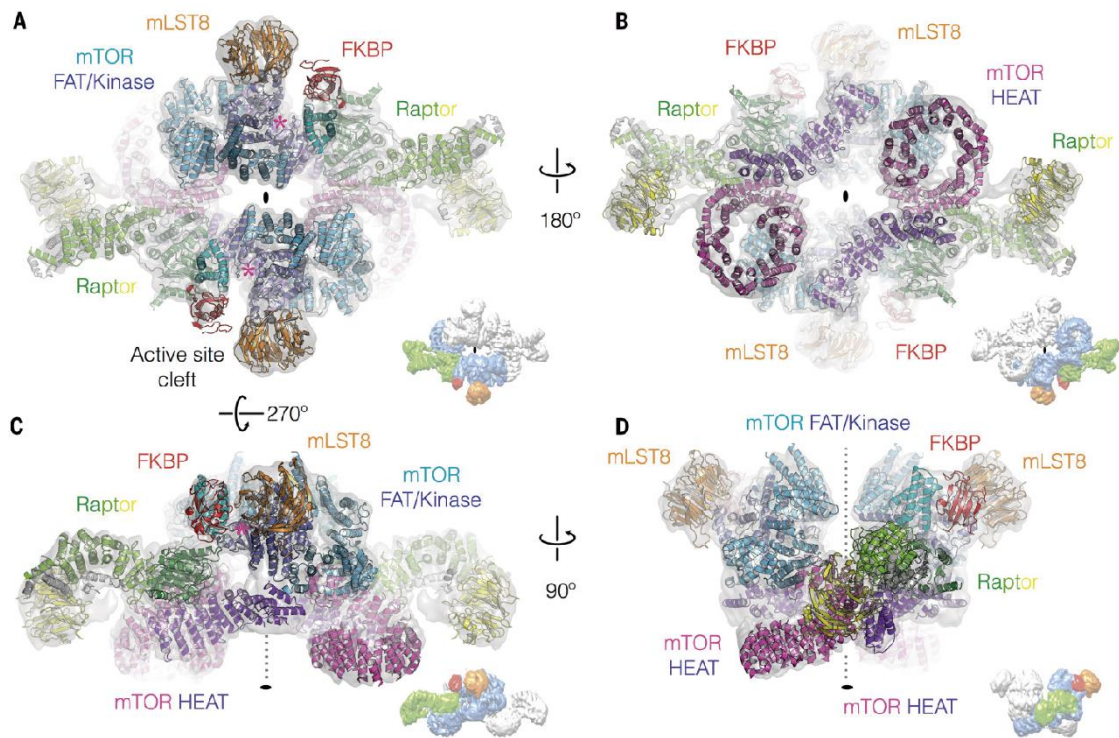
La estructura del complejo de mamíferos mTORC1 ha sido ampliamente estudiada. Este complejo tiene unas dimensiones totales de aproximadamente  $29.0 \text{ \AA} \times 21.0 \text{ \AA} \times 13.5 \text{ \AA}$  y un volumen estimado de  $1.4 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ . Su estructura se resolvió mediante crio-microscopía. Las vistas laterales revelan la existencia de una cavidad central con forma ovalada y las vistas frontales dejan ver una cavidad con forma rectangular. Contiene dos canales que unen dicha cavidad con las estructuras “feet-like” (Figura 1.6)[75]. Se ha demostrado que los complejos mTORC1 y mTORC2 forman estructuras diméricas.



**Figura 1.6.** Reconstrucción 3D del complejo mTORC1 [74].

Posteriormente, se reveló la arquitectura del complejo de nuevo mediante crio-microscopía y cristalografía de rayos X, pero esta vez a una resolución de  $5.9 \text{ \AA}$  y  $4.3 \text{ \AA}$  respectivamente. Los dominios quinasas de mTOR están localizados cerca del centro de ensamblaje, uno cerca del otro, pero sin tener contacto. Raptor y mLST8 forman parte de las estructuras periféricas dando lugar a un eje corto y otro largo. Si observamos la estructura desde un ángulo perpendicular al eje de simetría, una de las caras es caracterizada por el dominio quinasa de mTOR y la subunidad mLST8 con las dos hendiduras del sitio activo que se abren hacia afuera desde este lado del complejo (Figura 1.7 A y C). La cara opuesta está representada por el extremo N-terminal con dominios de repeticiones HEAT de mTOR, el cual forma estructuras super helicoidales  $\alpha$ -solenoides (Figura 1.7 B y D). Raptor fue propuesto como mediador para llevar a cabo la dimerización del complejo. Sin embargo, estos estudios revelaron que es mTOR es el responsable de la dimerización. Las primeras repeticiones HEAT de una copia de mTOR están enterradas en la base del dominio FAT de la proteína mTOR adyacente, completando la interacción entre las dos subunidades. La subunidad Raptor es necesaria en la formación del complejo mTORC1. La principal interacción entre Raptor y mTOR consiste en el apilamiento de estructuras  $\alpha$ -solenoides formadas entre los dominios “asta” y “puente” de mTOR y el dominio “armadillo” de Raptor. Esta interacción estabiliza los dominios HEAT de mTOR. Por lo tanto,

Raptor podría favorecer la dimerización de las moléculas de mTOR, sin ser el responsable directo de la dimerización del complejo [76].



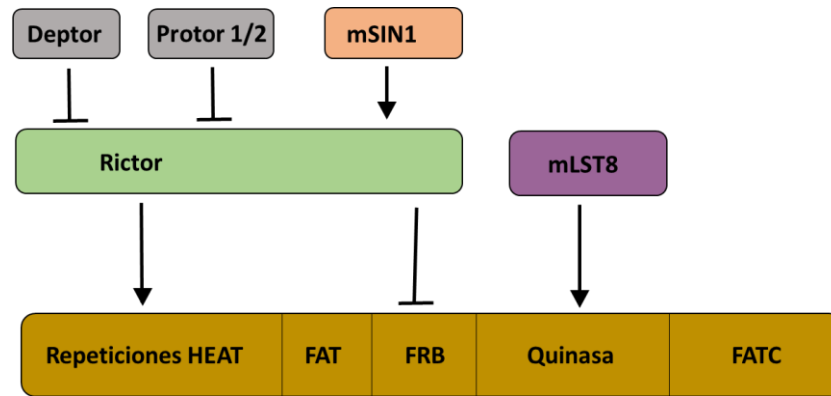
**Figura 1.7.** Estructura en 3D de mTORC1 resuelta por crio-microscopía [75].

### 1.3. mTORC2

Mientras que el complejo mTORC1 es inhibido directamente por la rapamicina unida a FKBP12, el complejo mTORC2 (del inglés, mechanistic target of rapamycin complex 2) se caracteriza por ser insensible al tratamiento con rapamicina [77]. Aunque el complejo rapamicina-FKBP12 no se une directamente ni inhibe al complejo mTORC2, exposiciones prolongadas a la rapamicina puede anular la señalización de mTORC2, aparentemente impidiendo que mTOR se una al complejo en formación [78, 79].

#### 1.3.1. Componentes de mTORC2

Los principales componentes de mTORC2, los cuales están altamente conservados entre especies, incluye las subunidades mTOR, Rictor (del inglés, Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin), mSIN1 (del inglés, mammalian SAPK (del inglés, stress-activated protein kinase) interacting protein 1) y mLST8. Otras subunidades menos conservadas se han encontrado formando parte del complejo, como es Protor (del inglés, protein observed with Rictor) y Deptor (Figura 1.8) [22, 80-82].



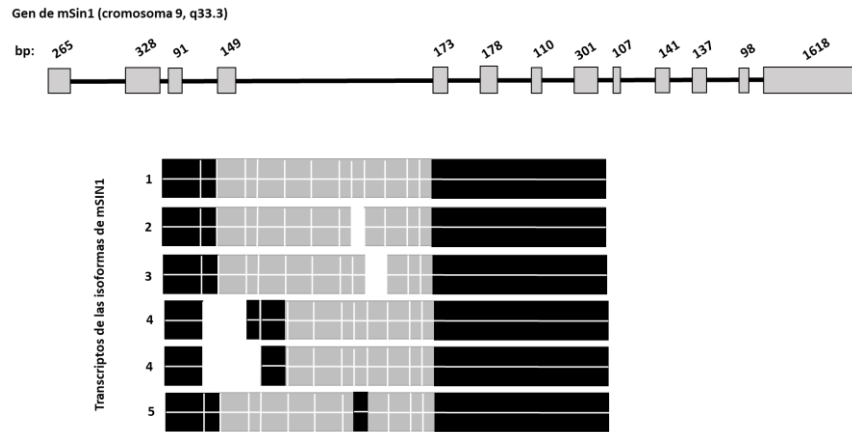
**Figura 1.8.** Esquema de las subunidades del complejo mTORC2 y su correspondiente sitio de unión.

### 1.3.1.1. mLST8

La subunidad mLST8, aunque se encuentra presente tanto en el complejo mTORC1 como en el complejo mTORC2, parece que regula de manera diferente la actividad quinasa de los dos complejos. Mientras que la delección de mLST8 no tiene claros efectos en la actividad e integridad del complejo mTORC1, su ausencia provoca la total eliminación de la actividad del complejo mTORC2, indicando que mLST8 es esencial para el complejo mTORC2 y no para el complejo mTORC1 [18]. La actividad del complejo mTORC2 está regulada por la ubiquitinización de mLST8. La poli-ubiquitinación de mLST8 mediada por el residuo K63 de la ubiquitina interrumpe la formación del complejo mTORC2 y, por lo tanto, reduce la actividad del mismo complejo. Sin embargo, la desubiquitinización de mLST8 promueve su interacción con mSIN1, facilitando la formación del complejo mTORC2 y potenciando su actividad [83].

### 1.3.1.2. mSIN1

mSIN1, también conocida como proteína 1 asociada a proteína quinasa activada por mitógenos, (MAPKAP1), fue originalmente identificada gracias a su habilidad para suprimir los fenotipos generados en *S.cerevisiae* mediante la expresión constitutiva del mutante Ha-Ras [84]. mSIN1 pertenece a una familia poco conservada que incluye Sin1 en *S.pombe*, AVO1 (del inglés, Adheres Voracionsly (to TOR2)) en *S. cerevisiae*, y RIP3 (del inglés, Ras-interacting protein 3) en *D. discoideum*. La región conservada de esta familia de proteínas se limita a una pequeña región correspondientes a los residuos 225-267 de la isoforma de mSIN1 con mayor número de nucleótidos. Al contrario que el resto de especies donde SIN1 ha sido estudiada, solo mSIN1 presenta cinco isoformas diferentes en humanos, como resultados de un splicing alternativo [85]. Algunos estudios han sugerido que existen, al menos, tres complejos mTORC2 diferentes, cada uno de ellos definido por una isoforma de mSIN1 específica. Solo las isoformas mSIN1.1, mSIN1.2 y mSIN1.5 se han encontrado formando parte del complejo. Se llevaron a cabo estudios de las secuencias de las isoformas de mSIN1 (Figura 1.9) y estos revelaron que había una diferencia importante entre la isoforma 4 y las isoformas que forman parte del complejo. Esta diferencia se centra en los primeros 192 aminoácidos, sugiriendo que en estos se encontraban los dominios responsables de la unión al complejo mTORC2 [86].



**Figura 1.9.** Representación esquemática del gen humano de *SIN1* (*mSIN1*), variantes en la traducción y sus isoformas. Seis variantes traduccionales, generadas mediante splicing alternativo, que codifican para cinco isoformas diferentes de *mSIN1*. Dos variantes traduccionales codifican para la isoforma 4.

*mSIN1* contiene cuatro dominios. La región TORC, situada en el extremo N-terminal, es la responsable de las interacciones con Rictor. En la región C-terminal posee dominios con homología a la Pleckstrina (PH), los cuales parecen necesarios para la localización del complejo en la membrana [87]. Además, el dominio PH de *mSIN1* inhibe la actividad del complejo *mTORC2*, esta autoinhibición ocurre en presencia de fosfatidilinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) [88]. La región central es la más conservada denominándose región conservada del medio, CRIM (del inglés, conserved region in the middle). Dicha región está unida al dominio de unión RB, (del inglés, RAS-binding) de las proteínas Ras las cuales impiden la hidrólisis de GTP, siendo el principal responsable del reclutamiento de los sustratos del complejo *mTORC2* (Figura 1.10) [89].



**Figura 1.10.** Representación esquemática de los dominios estructurales de la subunidad *mSIN1*.

La subunidad del complejo *mTORC2*, *mSIN1*, tiene un papel muy importante tanto en la integridad del complejo como en la actividad quinasa del mismo. Por un lado, siendo Akt el principal sustrato efector del complejo, se demostró que en ausencia de *mSIN1*, no tiene lugar la fosforilación del residuo S473 de Akt. Por otro lado, en este mismo trabajo se mostró que *mSIN1* es esencial para la integridad del complejo *mTORC2*, ya que la interacción entre Rictor y *mTOR* se ve alterada en células *SIN1*<sup>-/-</sup> [90]. Además, *mSIN1* es un componente fundamental en la retroalimentación negativa que existe entre ambos complejos, *mTORC1* y *mTORC2*. Bajo condiciones de hiperactivación del complejo *mTORC2*, *mSIN1* es fosforilado mediante S6K1, sustrato de *mTORC1*. Esta fosforilación es responsable de la alteración de la integridad del complejo *mTORC2* perdiendo su actividad catalítica [91].

### 1.3.1.3. Rictor

Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) comparte regiones de homología con varias proteínas poco caracterizadas, incluyendo pianissimo de *D. discoideum* [92], STE20 (del inglés, protein: Serine/Threonine-protein kinase STE20) de *S. pombe* [93] y AVO3p (del inglés, Adheres Voracionsly to TOR2,3) de *S. cerevisiae* [77, 94]. Estas proteínas comparten una región de 200 aminoácido aproximadamente de longitud con una similitud del 44%, así como varias regiones conservadas que incluyen repeticiones de 20 aminoácidos. A pesar de su grande tamaño, no se han podido identificar diferentes dominios o regiones en su estructura, a excepción de repeticiones de 42 aminoácidos cuya secuencia presenta homología a la proteína armadillo (dominios armadillo) en su extremo N-terminal. Estos dominios están implicados en la interacción con mTOR, con papel importante en el ensamblaje del complejo mTORC2 [95].

La asociación de Rictor a mTOR es crítica para la actividad quinasa del complejo, la cual también requiere de la presencia de mLST8 y mSIN1, indicando que Rictor y mSIN1 son esenciales para la funcionalidad del complejo mTORC2 [86, 90, 96-98]. Por lo tanto, la estabilidad y la integridad del complejo está determinada por la presencia del núcleo del complejo, constituida por Rictor y mSIN1. Además, Rictor y mSIN1 se encuentran asociadas a un mTOR hiperfosforilado, sugiriendo que esta hiperfosforilación podría modular su interacción [97, 99]. En muchos tipos de cáncer, se ha observado una sobre-expresión de Rictor en células tumorales que permite un incremento de la proliferación y la supervivencia, así como una disminución de la apoptosis de las mismas. Por lo tanto, Rictor está comenzando a ser un importante factor a tener en cuenta para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

### 1.3.1.4. Protor

Protor1 (protein observed with Rictor-1) y Protor2 (protein observed with Rictor-2), ambas proteínas están codificadas por genes diferentes y forman parte del complejo mTORC2. Ambas isoformas interactúan con Rictor a través de la región N-terminal. Su expresión podría estar regulada por Rictor, siendo los niveles de su ARNm elevados en algún tipo de cáncer [80, 100]. Protor 1 es requerido para una activación eficiente del sustrato de mTORC2, SGK1 en riñón [101].

## 1.3.2. Vías de activación de mTORC2.

El mecanismo de regulación de la actividad de mTORC1 es bien conocido, sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos de activación del complejo mTORC2. Ensayos *in vitro* han demostrado que la fosforilación de Akt en su motivo hidrofóbico denota que el complejo mTORC2 es activado por factores de crecimiento [97]. Frias y colaboradores llevaron a cabo ensayos *in vitro* para determinar qué isoformas de mSIN1 estaban implicadas en la fosforilación de Akt. Para ello estimularon el complejo mTORC2 con insulina y obtuvieron que solo en el caso donde las isoformas 1 y 2 de mSIN1 formaban parte del complejo mTORC2 se producía fosforilación en la S473 de Akt [86]. Más tarde, los experimentos desarrollados por Gan y colaboradores sugieren que el fosfolípido fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3P) regula la fosforilación de Akt mediada por el complejo mTORC2 a través de tres mecanismos diferentes: interviniendo en el reclutamiento de Akt en la membrana plasmática, facilitando la fosforilación de Akt o activando directamente el complejo mTORC2 [102]. Por otro lado, mTORC2 también

participa en la fosforilación de Akt en el residuo T450, el cual no es inducido por la ruta de señalización de la insulina-PI3K, sino que dicha fosforilación ocurre durante la traducción de Akt y es mediada por mTORC2 gracias a la unión de este con el ribosoma [103].

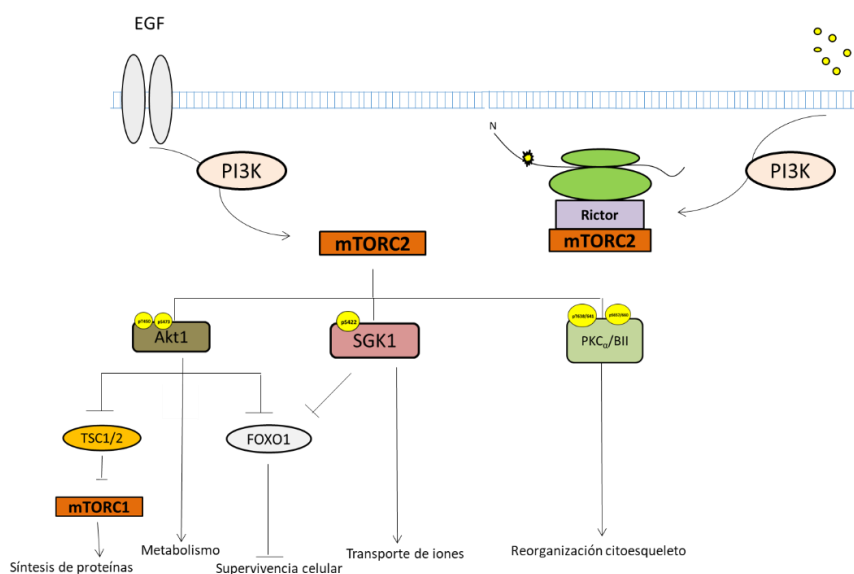
El complejo TSC1-TSC2, el cual regula al complejo mTORC1, es requerido también para una apropiada activación de mTORC2. Este supresor tumoral se asocia al complejo mediante Rictor, pero esta regulación parece ser independiente de su actividad GTPasa hacia Rheb. Además, la alteración de la actividad en células TSC2 deficientes no puede ser recuperada mediante la regulación de mTORC1, sugiriendo que, además de la regulación de IRS-1 mediada por la retroalimentación de mTORC1, mTORC2 puede ser regulado directamente por TSC1-TSC2 [104, 105].

La enzima GTPasa Rac1 puede regular ambos mTORC1 y mTORC2 en respuesta a la estimulación de factores de crecimiento permitiendo la translocación de Rac1 a la membrana plasmática, y secuestrando a mTORC2 y de este modo permitiendo la activación local de Rac1 [106].

Dependiendo del contexto celular, ya sea a través de S6K1 o Akt, mSIN1 es fosforilado directamente en los residuos T86 y T398, provocando su disociación del complejo mTORC2 bloqueando la actividad del mismo [107]. Del mismo modo, Rictor es fosforilado directamente por S6K1, reduciendo la fosforilación de Akt por parte del complejo [108-111].

### 1.3.3. Funciones y sustratos del complejo mTORC2.

Mientras que mTORC1 regula el crecimiento celular y el metabolismo, mTORC2 controla la proliferación y la supervivencia celular principalmente por la fosforilación de varios miembros de la familia de las quinasas AGC (proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa G (PKG) y proteína quinasa C (PKC)). Entre los sustratos del complejo mTORC2 se encuentran la proteína quinasa Akt, la proteína quinasa PKC y la proteína SGK1 (del inglés, serum- and glucocorticoid-induced kinases 1). Una vez activado el complejo mTORC2, este actúa sobre varias moléculas quinasas que regulan el crecimiento celular y el metabolismo (Figura 1.11) [67].



**Figura 1.11.** Vías de señalización del complejo mTORC2.

### 1.3.3.1. Reorganización del citoesqueleto de actina y migración celular

El primer sustrato de mTORC2 que fue identificado fue PKC $\alpha$ , un regulador del citoesqueleto de actina [96, 112]. Más recientemente, se ha demostrado que mTORC2 también fosforila otros miembros de la familia como PKC $\delta$ , PKC $\zeta$ , así como PKC $\gamma$  y PKC $\epsilon$  [113-115]. La mayoría de las proteínas pertenecientes a la familia PKC son fosforiladas en tres sitios conservados, llamados el bucle de activación (A-loop), el motivo de giro (TM) y la región hidrofóbica (HM), excepto la proteína PKC $\zeta$  que solo presenta las regiones A-loop y TM disponibles para la fosforilación [116]. La familia PKC es fosforilada por el complejo mTORC2, siendo los componentes del mismo requeridos para la fosforilación en las regiones HM (S657/660) y TM (T638/641 de PKC $\alpha$ /BII). La fosforilación en la región TM permite la maduración y estabilización de las quinasas [117, 118].

Aunque el mecanismo de cómo mTORC2 controla el citoesqueleto de actina aún no está claro, la familia de las proteínas PKC está implicada en este proceso [96]. En células de glioblastoma donde existe una sobre-expresión de Rictor y un aumento en la actividad de mTORC2, hay un aumento de la movilidad junto con un aumento en la expresión de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3. Esta sobre-expresión de Rictor está correlacionada con una elevada actividad de PCK $\alpha$  [119].

### 1.3.3.2. Transporte de iones.

La serina/treonina quinasa SGK1, también conocida como la quinasa inducida por suero y glucocorticoides, es estimulada por factores de crecimiento y es regulada en respuesta al estrés osmótico [120]. mTORC2 es requerido para la activación de SGK1 mediante la fosforilación en su residuo S422 de la región hidrofóbica [121]. mSIN1 parece tener un papel importante en esta fosforilación mediando la interacción entre mTORC2 y SGK1 [122]. Esta fosforilación de SGK1 permite su participación en la regulación de una gran variedad de proteínas transportadoras incluyendo Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, varios canales de iones y transportadores [123]. De hecho, se ha demostrado que mTORC2 participa en la activación de los canales de sodio en células epiteliales renales [124].

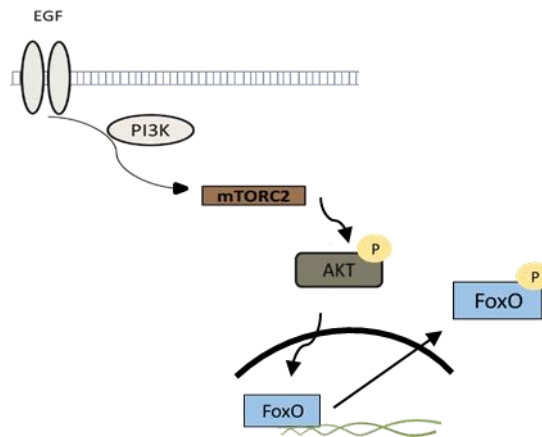
### 1.3.3.3. Síntesis de proteínas.

En la síntesis de proteínas, mTORC1 es el complejo que más implicación presenta [125, 126]. Sin embargo, múltiples evidencias apuntan a que mTORC2 también participa en el proceso. mTORC2 ha sido localizado en la membrana de orgánulos como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lo que podría indicar que mTORC2 está interaccionando con los ribosomas unidos a membranas [127, 128]. En especial, Rictor forma una asociación estable con las proteínas del ribosoma L23a y L26. La naturaleza de este enlace podría sugerir que mTORC2 podría jugar un papel en el procesamiento cotranslacional o maduración de proteínas como es el caso de Akt [87].

### 1.3.3.4. Supervivencia celular.

La activación de Akt mediante el complejo mTORC2 promueve la fosforilación de los factores de transcripción FoxO, entre los que se incluyen FoxO1, 3, 4 y 6 [129]. Los factores de transcripción FoxO tiene unos sitios de fosforilación por Akt altamente conservado entre especies. La fosforilación de estos factores en el núcleo crea los sitios de unión 14-3-3, estos enmascaran la

señalización de localización nuclear (NLS) y previene su translocación nuclear inhibiendo la actividad de FoxO (Figura 1.12) [130]. Entre los genes cuya expresión se encuentra regulada por los factores de transcripción FoxO, se encuentran los múltiples genes que intervienen en el proceso de la apoptosis [131]. Convencionalmente, el proceso de apoptosis puede ocurrir mediante dos vías: la vía intrínseca mediada por la mitocondria y resultando en la activación de la caspasa 9; y la vía extrínseca está mediada por los receptores FasL (del inglés, Fas Ligand on CD95L) y TNFR (del inglés, tumor necrosis factor receptor) que están implicados en la activación de la caspasa 8 [132, 133]. La familia de proteínas BCL-2 (del inglés, B-cell lymphome 2) son bien conocidas como reguladoras de la apoptosis y están agrupadas en tres subfamilias de proteínas pro-apoptóticas basándose en el número de dominios BH [134]. Diferentes estudios indican que la expresión constitutiva de factores de transcripción FoxO promueven la muerte celular mediante ambas vías; la vía intrínseca mediada por las proteínas BCL-2 y la vía extrínseca, donde los factores de transcripción FoxO promueven la expresión de factores pro-apoptóticos como FasL y TRAIL (del inglés, Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) [135].



**Figura 1.12.** Translocación del núcleo al citoplasma de FoxO y su consecuente inactivación es dependiente de la fosforilación del mismo mediante Akt.

### 1.3.3.5. Metabolismo

mTORC2 juega un papel importante en el metabolismo y homeostasis de la glucosa afectando a diferentes aspectos como la ingesta de glucosa, la glicolisis, gluconeogénesis y la fosforilación oxidativa [136-141]. Una deficiencia de Rictor en tejidos como hepático, adiposos y músculo compromete la ingesta de glucosa. También en tejido hepático, una deficiencia de Rictor implica una deficiencia de la glicolisis debido al impedimento de expresión de genes implicados como el de la enzima glucoquinasa (GK), piruvato quinasa y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) [140].

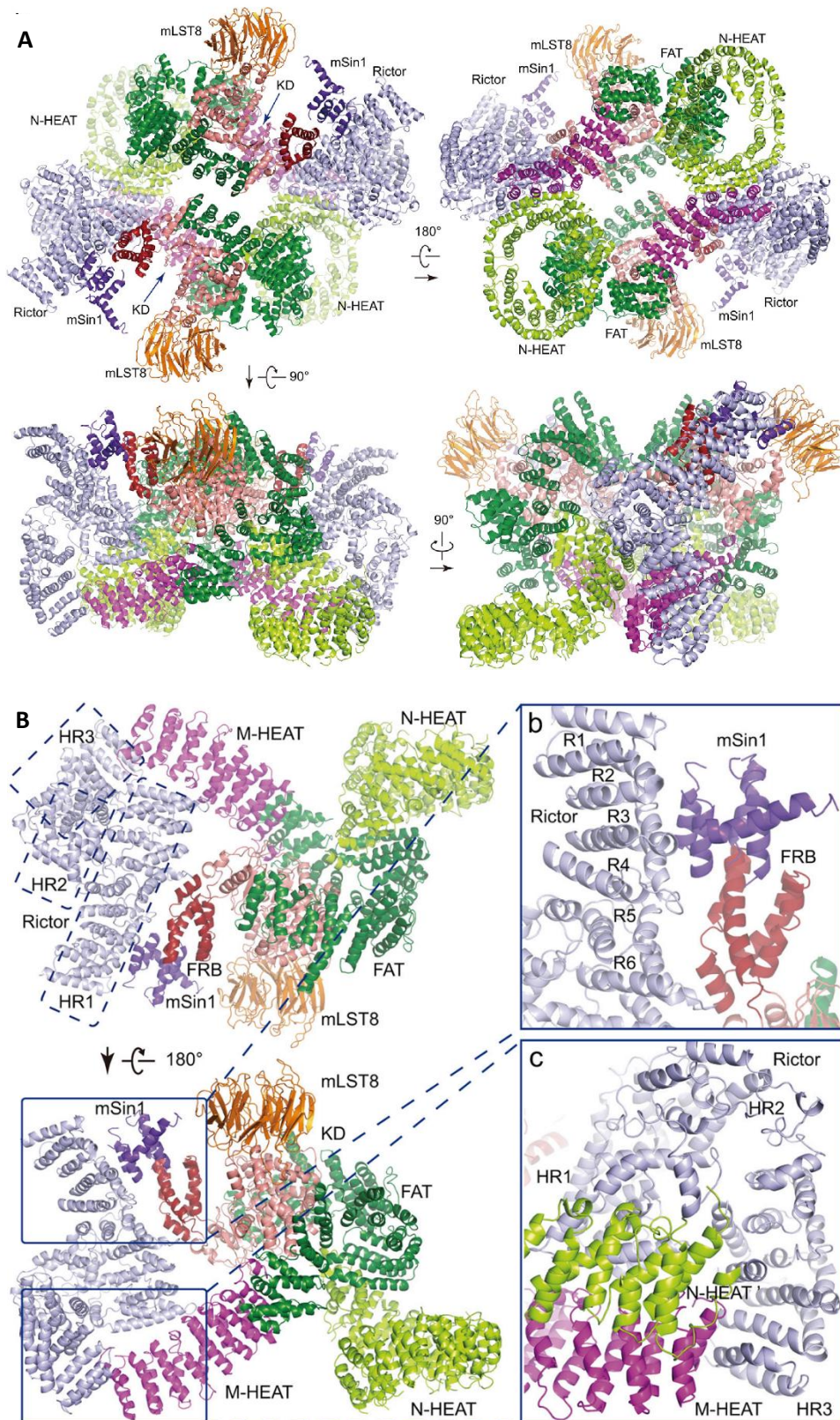
### 1.3.4. Caracterización estructural del complejo mTORC2

La caracterización estructural del complejo mTORC1 ha sido ampliamente estudiada durante varios años. Sin embargo, la estructura del complejo mTORC2 ha sido resuelta recientemente a alta resolución (4.9 Å) por Chen y colaboradores mediante crio-microscopía [142]. La estructura del complejo mTORC2 revela la presencia de un hueco romboidal con unas dimensiones

aproximadas de  $220 \times 200 \times 130 \text{ \AA}^3$  (Figura 12A). El complejo se dispone de forma simétrica con dos partes bien diferenciadas, cada una de ellas conteniendo una copia de mTOR, mSIN1, Rictor y mLST8. Como se observa en el complejo mTORC1, en el complejo mTORC2, los dos monómeros de mTOR se sitúan uno frente a otro y forman una estructura central con superficies de unión para el resto de componentes. Las dos copias de cada subunidad del complejo mTORC2 (mLST8, mSIN1 o Rictor) se unen de manera simétrica al dímero mTOR. Acorde con estudios previos, mLST8 establece una unión con el dominio quinasa de mTOR flanqueando el núcleo del complejo [142, 143].

Rictor presenta tres regiones contiguas de repeticiones helicoidales diferentes (HR1, HR2, HR3). La región HR1 está compuesta por nueve repeticiones helicoidales paralelas que adoptan una conformación extendida. Unido a las repeticiones 5-9 se encuentra la región HR2 la cual está definida por ocho regiones  $\alpha$ -hélice. Por último, HR3, al igual que HR1 presenta una conformación extendida conteniendo seis repeticiones helicoidales. Esta última región no presenta contacto directo con las regiones anteriores, HR1 y HR2 y su conformación está estabilizada mediante su interacción con la subunidad mTOR. Chen y colaboradores observaron tres principales puntos de contacto intermoleculares entre Rictor y mTOR. En el primer punto de contacto intervienen seis de las repeticiones helicoidales de la región HR1 (R1-R6), las cuales interactúan con mSIN1 y el dominio FRB de mTOR. También a través de la región HR1, más concretamente a través las tres últimas hélices de HR1, Rictor interactúa con la región intermedia de repeticiones HEAT de mTOR (M-HEAT, del inglés middle HEAT repeat) y la región terminal de las repeticiones HEAT de la otra molécula de mTOR (N-HEAT'). El tercer punto de unión entre Rictor y mTOR se produce a través de la tercera región HR3 con la región M-HEAT de mTOR (Figura 12B)[142].

Acorde con la predicción de estructura secundaria y los análisis bioquímicos, Chen y colaboradores propusieron un modelo estructural para mSIN1 que muestra un conjunto de cuatro hélices y un puente de  $\alpha$ -hélice entre mLST8 y Rictor/mSIN1 [142]. Estas hélices podrían proceder principalmente de la región N-terminal de mSIN1 y otras regiones de la proteína. Dos de las estructuras  $\alpha$ -hélice se encuentran enfrentadas a las cuatro repeticiones helicoidales de Rictor (R1-R4). La parte baja del conjunto de las cuatro hélices de mSIN1 junto con la repetición helicoidal R6 de Rictor se encuentran muy cerca de la estructura FRB de mTOR. La existencia de las cinco  $\alpha$ -hélice de mSIN1 podrían ser las responsables de la resistencia del complejo a la rapamicina generando un impedimento estérico. De hecho, una vez que se ha formado el complejo mTORC2, la región FRB de mTOR no quedaría accesible para el complejo inhibidor FKBP12-Rapamicina [142].



**Figura 1.13)** Estructura tridimensional del complejo mTORC2 desde cuatro perspectivas distintas. **B)** Representación de las interacciones entre Rictor, mTOR y mSIN1.

La comparación estructural de ambos complejos, mTORC1 y mTORC2, muestra diferentes características estructurales, a pesar de que tienen una conformación similar. En primer lugar, los componentes específicos de cada componente, Raptor y Rictor, adoptan diferentes conformaciones ya que ambas proteínas no presentan una secuencia homóloga. Tanto Rictor como Raptor poseen repeticiones HEAT que se unen a las regiones M-HEAT y N-HEAT de mTOR. Sin embargo, no tiene contactos equivalentes a los correspondientes sitios de unión 1 y 2 que ocurren entre mTOR y Rictor. Esta comparación estructural muestra claramente que las uniones de Rictor y Raptor con mTOR son mutuamente excluyentes.

En cuanto a la organización de dímeros, en ambos complejos, ambas moléculas de mTOR están unidas simétricamente a través de interacciones intermoleculares entre las regiones M-HEAT y N-HEAT, dejando ver un patrón de dimerización similar en ambos complejos. Sin embargo, el hueco central del complejo mTORC2 ( $\sim 11 \text{ \AA}$ ) es más estrecho que el que presenta mTORC1 ( $23 \text{ \AA}$  aproximadamente) debido a la presencia de dos residuos simétricos R1966 en ambos dominios FAT. Comparado con mTORC1, la presencia de Rictor y mSIN1 empuja al dominio FRB hacia la otra molécula de mTOR del dímero, y consecuentemente los dominios FAT y KD se mueven en la misma dirección [142].

#### **1.4. Implicación del complejo mTORC2 en enfermedades.**

La señalización de mTORC2 integra una variedad de señales ambientales e intracelulares que coordinan un gran número de procesos celulares. La relevancia fisiológica de la señalización de mTORC2 queda intensamente demostrada por varias alteraciones que ocurren por su desregulación, como en el cáncer, la diabetes mellitus tipo 2 o el envejecimiento.

##### **1.4.1. Cáncer**

Alteraciones en la vía de señalización del complejo mTORC2, especialmente su hiperactivación, han sido observadas en varios tipos de cáncer humano. Ciertas mutaciones y amplificaciones anormales de los componentes principales del complejo son los principales factores que contribuyen a su hiperactivación. Por ejemplo, mutaciones en el dominio FAT de mTOR implica un impedimento para la unión de su inhibidor Deptor, lo que lleva a un aumento de la actividad de ambos complejos [144]. Por otro lado, Rictor presenta una alta tasa de mutación y es anormalmente sobre-expresado a través de regulaciones genéticas y epigenéticas [145] en varios tipos de cáncer.

El glioblastoma multiforme (GBM) está clasificado en el tipo grado IV por tratarse del glioma más agresivo acorde con el sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [146]. Se trata de uno de los tumores más letales por la baja tasa de supervivencia tras su diagnóstico y su resistencia, tanto a terapias químicas como radioterapias [147]. El receptor del factor del crecimiento (EGFR) es uno de los contribuyentes clave en el desarrollo del GBM, siendo las mutaciones del tipo variante III responsables de una señal constitutiva que afecta principalmente a la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR [148-152]. En células cerebrales, el complejo mTORC2 es uno de los principales reguladores. Una alteración en la vía de señalización de este complejo se relaciona con la aparición del glioma maligno [153-156]. El complejo mTORC2 ha sido relacionado con la reprogramación metabólica del glioblastoma incluyendo el metabolismo glicolítico, la glutaminólisis, lipogénesis y el metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS) y de nucleótidos [157]. La activación de estas diferentes rutas mediante mTORC2 podrían ser la causa de la resistencia a las señales de los inhibidores [158]. Además, se ha evidenciado que el complejo mTORC2 tiene un papel importante en el control del daño del ADN así como en el control de la estabilidad del genoma [159]. Estudios llevados a cabo por

Chantaravisoot y colaboradores sugieren que el eje protagonizado por mTORC2 y FLNA (Filamina A) es crítico para el citoesqueleto de actina, la movilidad y la invasión de las células del glioblastoma [160]. Por otro lado, se ha demostrado que en gliomas existe un aumento en el nivel de expresión de Rictor que está correlacionado con los niveles de fosforilación de Akt en el residuo S473 [119, 149]. Además, una hiperactivación del complejo mTORC2 con una sobre-expresión de Rictor han sido evidenciados en varios tipos de cáncer cerebrales. Masri y colaboradores mostraron evidencias de que una elevada actividad del complejo promueve la formación de tumores, su crecimiento y su proliferación [119].

A pesar de los avances en cirugías y tratamientos, el cáncer de ovario presenta un alto nivel de recurrencia. Un estudio ha demostrado que Rictor, componente esencial del complejo mTORC2, es frecuentemente sobre-expresado en el cáncer ovárico [161]. Además, se encontró que el complejo mTORC2 se encuentra con un mayor nivel de activación en el carcinoma de células claras (CCC) que en el adenocarcinoma seroso (SAC) en ovario, 71,2% frente a 45,7% respectivamente [161].

#### **1.4.2. Diabetes mellitus tipo 2.**

La diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) se trata de una alteración metabólica, caracterizada por la desregulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado del daño en la secreción de insulina, de la resistencia a la insulina o ambas combinadas [162]. La resistencia a la insulina es debida a una alteración en la homeostasis de la glucosa con un incremento de la producción de glucosa en el hígado además de un descenso del metabolismo de la misma por parte del músculo y el tejido adiposo. Como punto convergente en la ruta de señalización de la insulina, así como importante regulador de la homeostasis, desregulaciones en mTORC2 altera la cascada de señales implicadas en la ruta de señalización de la insulina y sus acciones biológicas, dando lugar a alteraciones y enfermedades tales como la diabetes mellitus tipo 2. Esto ha sido claramente mostrado en estudios de ratones donde había una ausencia de Rictor en órganos como el hígado, músculo o tejido adiposo y presentan una severa resistencia a la insulina [136, 138, 140, 163]. Por lo tanto, alteraciones en la señalización de mTORC2 podrían ser las responsables de la ingesta anormal de la glucosa que ocurre en la T2DM, resultando en una hiperglucemia. Por otro lado, el complejo mTORC2 podría contribuir a la aparición de T2DM a través de su acción en las células pancreáticas  $\beta$  mediante sus efectores Akt, PKC $\alpha$  y FoxO1/3, efectores esenciales para la supervivencia de las células  $\beta$  y la producción de la insulina [164]. De hecho, se ha demostrado que pacientes con T2DM presentan un importante descenso en los niveles de actividad del complejo mTORC2 [165]. Además del metabolismo de la glucosa, el tejido adiposo también se encuentra alterado en la diabetes mellitus tipo 2. Otros estudios sugieren que la ausencia de Rictor en el tejido adiposo lleva a una disminución de la lipogénesis y un aumento de la lipólisis, los cuales parecen dar lugar a la resistencia hepática de la insulina [136, 137, 166]. La desregulación del metabolismo de lípidos en el tejido adiposos también ha sido asociada a la resistencia a la insulina en humanos [167].

#### **1.4.3. Envejecimiento**

El envejecimiento es un proceso natural, comúnmente acompañado por un proceso progresivo de pérdida de funciones fisiológicas y un incremento de la susceptibilidad a alteraciones asociadas a la edad, incluyendo alteraciones cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, etc [168]. La velocidad del envejecimiento depende de un gran número de factores ambientales o genéticos, como el daño del ADN, el mantenimiento de células madres y el metabolismo oxidativo [169]. Estudios genéticos o farmacológicos situaron a mTOR como regulador de la esperanza de vida en ratones, donde inhibiciones de mTOR mediante la rapamicina dio lugar a

un incremento del 9-14% de la esperanza de vida tanto en machos como en hembras [170], indicando la importancia de mTOR en la señalización de la longevidad. Otro estudio, donde había una ausencia o disminución de los niveles de expresión de Rictor en ratones, mostraron una reducción significativa de la esperanza de vida en los ratones macho, pero no en los ratones hembra [171]. Estos resultados sugieren que la señalización del complejo mTORC2 tiene importantes funciones en la regulación del envejecimiento y sus alteraciones asociadas; sin embargo, su papel aún no queda claro.

### **1.5. Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de macromoléculas**

Una de las técnicas más potentes a la hora de resolver estructuras a alta resolución de proteínas y especialmente complejos macromoleculares es la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). El avance tecnológico que ha tenido lugar en los últimos años en cuanto al desarrollo de los microscopios electrónicos, cámaras de detección, paquetes informáticos y algoritmos han hecho posible que la resolución de las estructuras alcance valores cercanos a resolución atómica, comparables con los resultados obtenidos mediante técnicas como la cristalografía de rayos-x o la resonancia magnética nuclear (RMN). Además, hay que tener en cuenta las ventajas que presenta esta técnica frente a estas otras técnicas como son la cantidad y la concentración de la muestra, aunque presente la limitación del tamaño y la posible heterogeneidad de la misma.

En el procesamiento de imágenes de proteínas recogidas mediante microscopía electrónica, las imágenes producidas por la incisión del haz de electrones dan lugar a proyecciones bidimensionales de las moléculas. Estas imágenes en dos dimensiones (2D) contienen toda la información en tres dimensiones (3D) de la muestra. La combinación de estas imágenes en 2D puede generar de forma adecuada una reconstrucción en 3D de la estructura original.

En un microscopio electrónico hay que tener en cuenta algunos aspectos como son el daño causado por radiación de electrones, que hacen imprescindible la protección de la muestra. En este sentido, para observar las muestras a través de esta técnica, éstas pueden ser preparadas de distintas maneras: tinción negativa [172], crio-microscopía (vitrificación) [173], o crio-tinción negativa [174]. Cuando las muestras son preparadas mediante tinción negativa son recubiertas con sales de metales pesados, como son el acetato de uranilo o el formiato de uranilo, permitiendo un mayor contraste que hace posible estudiar proteínas de menor tamaño. La desventaja que presenta la técnica es que observamos directamente la capa de agente de tinción que recubre la molécula no la molécula en si limitando la resolución debido al tamaño del grano del agente.

La crio-microscopía electrónica presenta la ventaja de observar la muestra en su estado nativo ya que se encuentra en su propio tampón utilizando la técnica de la vitrificación a temperaturas de nitrógeno líquido. La desventaja que presenta la técnica es que al haber muy poco contraste se requiere moléculas de peso molecular por encima de 450 kDa. En la actualidad la utilización de esta técnica permite alcanzar en algunos casos, resoluciones atómicas (3.5-4 Å) [175]. Por otro lado, la criotinción negativa podría ser considerada la combinación de ambas técnicas. En este caso la muestra es vitrificada utilizando un tampón que contiene el agente de tinción, de tal manera que se consigue mayor contraste conservando la estructura nativa de la molécula, pero perdiendo resolución al estar presente el agente de tinción.

Una vez preparadas las rejillas con las muestras utilizando alguna de las técnicas mencionadas anteriormente, son observadas en el microscopio electrónico. En la toma de imágenes hay que tener en cuenta que para no dañar las moléculas y conservar la mayor información estructural, la dosis de electrones tiene que ser baja (mínima dosis) por lo que relación señal-ruido es

también muy baja. Hay que considerar la orientación en la que se adhieren cada molécula individual en el soporte, ya que caen en él de manera aleatoria. El procesamiento conlleva la selección de imágenes de moléculas individuales, el alineamiento y la clasificación. Para ello suelen ser necesarias miles de partículas individuales para obtener un promedio con aquellas moléculas que tengan la misma orientación y de esta manera conseguir aumentar la relación señal-ruido de las imágenes generalmente sin tener en cuenta información estructural, es decir, sin referencia (medias libres de referencia).

Para reconstruir la estructura en 3D de la molécula es necesario determinar la orientación de cada una de las partículas encontrando la relación angular de cada una de las imágenes. Es necesario que las moléculas abarquen todas las orientaciones para envolver toda la superficie angular en el espacio. Pueden llevarse a cabo varias estrategias que requieren un modelo inicial para asignar estos los ángulos de orientación (ángulos de Euler). Para refinar el modelo inicial es necesario un modelo interactivo que va mejorando la asignación de los ángulos de orientación hasta obtener una estructura análoga a los datos experimentales. El modelo final en 3D debe ser interpretado y verificado. Todo dependerá de la existencia de estructuras atómicas de la molécula (completa o de dominios aislados) que puedan facilitar la interpretación del mapa de microscopía obtenido. Esto será más fácil, cuanto más alta sea la resolución de la estructural final obtenida.

**OBJETIVOS**





## 2. OBJETIVOS

El complejo mTORC2, junto con el complejo mTORC1, se encuentra en el nódulo central de la vía de señalización para el crecimiento y proliferación celular. Ambos complejos presentan una organización estructural y funciones diferentes. Existen múltiples estudios que revelan tanto el papel funcional como la caracterización estructural del complejo mTORC1; por el contrario, sobre el complejo mTORC2 aún quedan muchas incógnitas por resolver en cuanto a su papel funcional.

El complejo mTORC2 está constituido por cuatro subunidades principalmente: mTOR y mLST8, estos componentes son el núcleo de ambos complejos a los que confiere la capacidad catalítica; y las subunidades Rictor y mSIN1 específicas del complejo mTORC2 [14, 86, 96]. El complejo mTORC2 juega un importante papel en la proliferación y supervivencia celular a través de la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de las quinasas AGC: Akt, SGK1 y PKC [67]. Dado su fundamental papel funcional, la desregulación del complejo mTORC2 es responsable de la aparición de importantes enfermedades como el glioblastoma multiforme, la diabetes mellitus o incluso, está implicado en el proceso de envejecimiento [136, 154]. Dada la importancia clínica del complejo mTORC2, conocer la estructura del mismo supondría una pieza clave para el diseño de inhibidores específicos del complejo mTORC2. Sin embargo, el gran tamaño molecular del complejo mTORC2 superior a 1 MDa, dificulta el proceso de obtención del mismo de modo homogéneo y estable para conseguir caracterizarlo a nivel funcional y estructural.

Por lo tanto, considerando estos antecedentes y tomando como referencia el trabajo llevado a cabo con el complejo mTORC1 [75], el presente trabajo de investigación abordará el estudio funcional y estructural del complejo mTORC2. Para tal fin, se propone alcanzar tres objetivos principalmente:

- Purificación del complejo mTORC2 formado por mLST8, mTOR, mSIN1 y Rictor a partir de la sobreexpresión de la subunidad mSIN1 en células de mamífero HEK293T.
- Estudio de la integridad funcional del complejo mTORC2 purificado a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* en células HEK293T y células U87.
- Aproximación estructural del complejo mTORC2 mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) utilizando la técnica de crio-microscopía.



## MATERIALES Y MÉTODOS



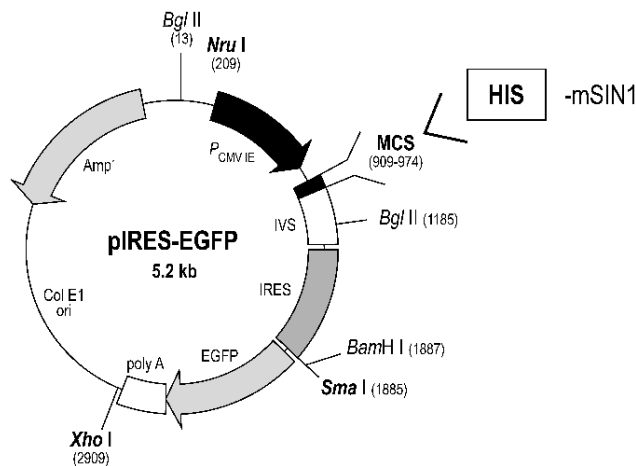


### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante mSIN1

##### 3.1.1. Expresión de mSIN1 en células de mamífero.

El gen de la proteína mSIN1 fue insertado, previamente, en el plásmido pIRES-EGFP (Figura 3.1). Este plásmido contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, internal ribosome entry site) del virus encefalomiocarditis (ECMV). Este sitio de unión del ribosoma se encuentra entre el sitio de clonación múltiple (MCS, multiple cloning site) y la región codificante de la proteína fluorescente verde (EGFP, enhacer green fluorescence protein). Esto permite que ambos genes, el de interés y el de EGFP, sean traducidos en un único ARN mensajero bicistrónico. El gen de la proteína mSIN1 se clonó con una cola de histidinas unida a su extremo amino terminal.



**Figura 3.1.** Representación del plásmido pIRES-EGFP donde se indica el lugar de inserción de la secuencia génica para mSIN1.

Se sembró un pre-inóculo de la cepa TOP10, bacterias químicamente competentes de *E. coli*, que contenían este plásmido con el gen de mSIN1. El pre-inóculo en medio de cultivo LB (Luria Bertani) más 0,1 mg/ml de ampicilina, se incubó durante una noche a 37°C con una agitación de 200 rpm. Tras la incubación, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C y los precipitados celulares se guardaron a -20°C.

Se purificó el plásmido pIRES-EGFP (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega) para transfectar células HEK293T. Las células HEK293 son células embrionarias de riñón humano transformadas con ADN de adenovirus. En este caso, utilizamos la variante 293T. Esta variante contiene el antígeno T de SV40 que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados. La transfección de las células HEK293T se llevó a cabo tras 24 horas de haber sembrado 1.800.000 células en placa con medio esencial mínimo de Eagle (DMEM), 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% estreptomycin/penicilina. La placa, confluyente al 80%, se incubó durante 4-6 horas con OptiMEM (Life Technologies). A este se le añadió previamente 12 µg de ADN plasmídico y 30 µl del reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tras la incubación, se retiró el medio, y se incubó con DMEM, 10% FBS y 1% estreptomycin/penicilina. Pasados 48-72 horas las células HEK293T transfectadas se levantaron y fueron centrifugadas a 1200 rpm

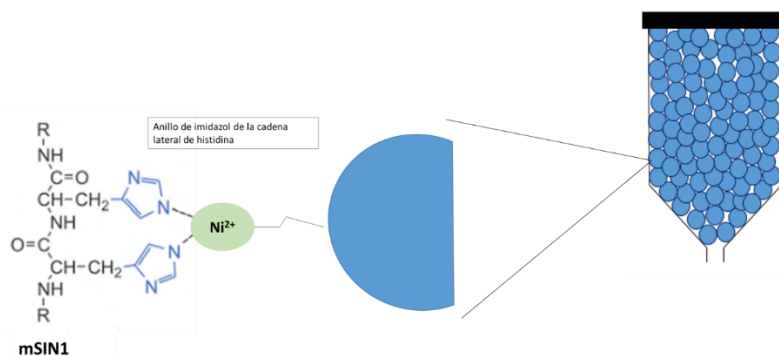
durante cinco minutos. Los precipitados se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente purificar el complejo mTORC2.

### 3.1.2. Purificación del complejo mTORC2

Para llevar a cabo la purificación del complejo mTORC2, los precipitados de células HEK293T transfectadas fueron descongelados y resuspendidos en tampón de lisis: HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,3%, PMSF 1 mM, cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma) 1%. Este tampón de lisis fue determinado experimentalmente hasta que se obtuvo la composición óptima para la purificación del complejo y preservar la integridad del complejo mTORC2.

Una vez resuspendido el precipitado en tampón de lisis, se agitó durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras esto, el lisado de células se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La purificación del complejo se llevó a cabo, en primer lugar, mediante una cromatografía de afinidad utilizando columnas HisTrap de 1 ml (GE Healthcare). Dicha columna consta de una resina a la que se encuentran unidos de manera covalente metales de transición como el  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Ni}^{2+}$  o el  $\text{Co}^{2+}$ . Teniendo en cuenta que la proteína mSIN1 tiene en su extremo amino fusionada una cola de histidinas, estas quedarán unidos covalentemente a estos metales de transición (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Representación de la composición de una columna de afinidad de Níquel.

La columna se equilibró con el tampón A que contenía HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,3%. A continuación, se hicieron lavados con el mismo tampón con el que la columna se equilibró: HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,3%. Finalmente, para eluir la proteína mSIN1, se pasó por la columna el tampón de elución el cual contenía HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,3% y 500 mM de imidazol. De esta manera, el imidazol compite por los sitios de unión metálicos de la matriz y la proteína unida se libera. Por último, las eluciones en las que se encontraba el complejo mTORC2 se juntaron y dializaron para eliminar el imidazol del tampón. Para ello se utilizó Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10,000 MWCO (Thermo Scientific) en el tampón B: HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,1%.

### 3.2. Caracterización bioquímica del complejo purificado

#### 3.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

Una vez dializadas las fracciones donde se encontraba el complejo, se pasó la muestra por una columna de exclusión molecular con el objetivo de caracterizar el complejo mTORC2 purificado según su tamaño. Se utilizó una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare Life Science) de 4ml y otra columna Superdex 200 GL 10/300 DE 24ML. Ambas se calibraron previamente con el siguiente tampón filtrado y desgasificado: HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,1%.

Parte de la muestra proveniente de la diálisis se incubó durante diez minutos con partículas de oro recubiertas de níquel, las cuales se unirían a la cola de histidinas de la proteína mSIN1 corroborando que al menos mSIN1 estaba presente en ese complejo macromolecular. Tras la incubación se pasó por la columna de exclusión molecular, para confirmar que el máximo de absorbancia a 280nm podría ser el complejo mTORC2 purificado.

Posteriormente, las muestras de las diferentes fracciones se cargaron en geles SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) para ser caracterizadas tiñendo con Azul de Coomassie, plata e inmunodetección mediante Western blot.

#### 3.2.2. Fijación en gradiente (GraFix)

Parte de las muestras procedentes de la diálisis se sometieron a una fijación en gradiente (GraFix) con el objetivo de estabilizar la integridad del complejo.

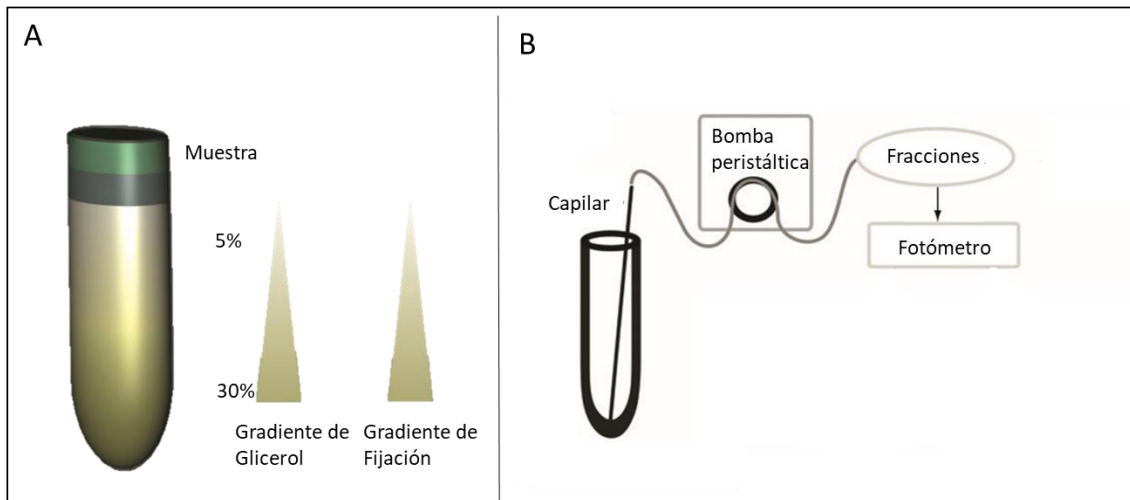
La técnica del GraFix combina en la purificación una ultracentrifugación en gradiente de densidad con una exposición a un agente fijador. Este protocolo se diseñó con el fin de evitar los problemas de heterogeneidad en la purificación de complejos macromoleculares para su posterior caracterización estructural mediante microscopía electrónica. Durante el proceso, el complejo macromolecular es expuesto a bajas concentraciones de un agente fijador, como el glutaraldehído, durante su sedimentación mediante ultracentrifugación a través de un gradiente de densidad [176]. El agente fijador facilita la formación de enlaces covalentes entre sus grupos funcionales incrementando la rigidez del complejo. Por otro lado, la centrifugación en gradiente es una técnica para separar complejos en función del tamaño.

El gradiente se forma al mezclar dos soluciones, cada una de ellas conteniendo el mismo tampón en el que se encontraba la muestra (HEPES 40 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, pirofosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, glicerolfosfato 10 mM, NaF 50 mM, CHAPS 0,1%). Además, cada una de ellas contenía un 5% y un 30% de glicerol respectivamente. En este caso se utilizó el glutaraldehído como agente fijador a una concentración de 0,0015% (Figura 3.3). Una vez depositada 100  $\mu$ l de muestra, los tubos fueron centrifugados en un rotor SW65 a una velocidad de 47000 rpm durante 18 horas a 4°C.

Tras la centrifugación, el gradiente se recogió desde el final del tubo en fracciones de 175  $\mu$ l utilizando una bomba peristáltica (GE Healthcare). Posteriormente, se midió la absorbancia de cada fracción a 280nm en un espectrofotómetro para identificar las fracciones que contenían proteínas.

Con el fin de confirmar la presencia del complejo en las diferentes fracciones, se llevaron a cabo electroforesis en condiciones nativas que fueron analizados mediante tinciones con azul de

Coomassie, plata e inmunodetección. Gracias a esta técnica, obtenemos muestras íntegras y más homogéneas del complejo, lo que nos permitió el posterior estudio de la estructura del complejo mTORC2 mediante Microscopía Electrónica.



**Figura 3.3. Representación del método GraFix.** A) Esquema del gradiente de glicerol y glutaraldehído en el tubo de centrifugación. B) Esquema de la recogida de las muestras tras la centrifugación [170].

### 3.3. Caracterización electroforética

#### 3.3.1. Electroforesis en gradiente

Las muestras procedentes de las eluciones y fracciones obtenidas en los pasos de purificación anteriormente comentados se sometieron a geles de electroforesis SDS-PAGE de gradiente, 4-20% (Bio-Rad). Previamente, las muestras fueron concentradas con una resina (StrataClean Resin). Para ello, se añadió 1µl de resina por muestra, se agitó y se incubó durante 5 minutos en hielo. Estos pasos se repitieron tres veces. Por último, se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante.

A continuación, se añadió tampón de carga 5X, con SDS y β-mercaptoetanol para asegurar la desnaturalización y condiciones reductoras de las muestras. Finalmente, las muestras se cargaron en los pocillos correspondientes un volumen entre 10-15 µl.

#### 3.3.2. Blue Native-PAGE

La técnica Blue Native-PAGE (BN-PAGE) ha sido desarrollada, entre otras aplicaciones, para determinar el estado de oligomerización de complejos macromoleculares o la masa molecular en condiciones nativas de las mismas.

Esta técnica se basa en el uso de moléculas aniónicas, como el azul de Coomassie G-250. Estas moléculas se unen a las proteínas haciendo que estas cambien de carga y que migren solo en función de su peso molecular hacia el ánodo a pH 7.5 a través del BN-PAGE [177]. Por lo tanto, las proteínas no se separan según la relación carga/masa, si no que migran según su tamaño en un gel en gradiente de poliacrilamida. La migración de dichas proteínas se ve ralentizada gradualmente según se va haciendo más pequeño el poro del gel al aumentar la concentración de poliacrilamida en condiciones nativas sin SDS.

En nuestro caso de estudio, se utilizó esta técnica para analizar las muestras procedentes del GraFix. Para la electroforesis se utilizaron dos tampones distintos. El tampón del cátodo con composición 15 mM BisTris, 50 mM Tricina pH 7.0 y azul de Coomassie G-250 0.02%; y otro del ánodo compuesto por BisTris 50 mM pH 7.0. En este caso, como marcadores de pesos moleculares se utilizaron NativeMark™ Unstained Protein Standard (Life Technologies™).

### **3.3.3. Tinción con plata**

La tinción con plata fue introducida por Karenyi y Gallyas en 1973 como una técnica para detectar pequeñas cantidades de proteínas en diferentes soportes [178] que posteriormente, se adaptó para su uso en geles SDS-PAGE [179-181].

En primer lugar, el gel fue incubado durante 30 minutos en un tampón de fijación que contenía: etanol 40% y ácido acético 10%. Posteriormente, para mejorar la unión de los iones de plata a las proteínas, el gel se sumergió en un tampón de sensibilización con etanol 30%, glutaraldehído 0,5%, tiosulfato sódico 12.6 mM, y acetato sódico 0.8 M, durante 30 minutos.

Tras estas incubaciones, el gel se lavó en agua durante cinco minutos. Este paso se repitió tres veces. Después, se incubó en el tampón de plata que contenía nitrato de plata 0.6 mM y formaldehído 0,04% durante 20 minutos. Durante esta incubación, los iones de plata se unen a las cargas negativas de las proteínas.

Para la visualización de las bandas, el gel se incubó en una solución de revelado que contenía carbonato sódico 0.2 M y formaldehído 0.02%. Previa a esta incubación, se realizó un lavado rápido con agua. Una vez que aparecieron las bandas, se retiró la solución de revelado y se incubó durante 10 minutos en un tampón con EDTA 50 mM (pH 8.0) con el objetivo de detener la reacción de revelado.

### **3.3.4. Tinción con azul de Coomassie**

Para llevar a cabo la tinción con azul de Coomassie, los geles fueron sumergidos en una solución con 1mg/ml Coomassie Brilliant Blue R-250, metanol 50% y ácido acético 10%. Posteriormente se utilizó una solución de desteñido para conseguir visualizar solo las bandas de proteínas. Esta solución contenía ácido acético 10% y metanol 45%.

### **3.3.5. Inmunodetección de los componentes del complejo mTORC2**

Tras la electroforesis, se llevó a cabo la inmunodetección de los componentes del complejo mTORC2. La transferencia de las proteínas a las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se llevó a cabo con un tampón que contenía Tris-glicina pH 8.3 con 10% de metanol a 400 mA durante 90 minutos a una temperatura de 4°C.

Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon las membranas durante una hora con una solución de bloqueo blotto-tween que contenía leche en polvo (Milk Powder, Sigma) 3% y Tween 1%. Después, se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente y sus respectivas diluciones: anti-histidinas 1:1000 (Sigma), anti-mTOR 1:2000 (Millipore), anti-mLST8 1:500 (Abcam), anti-Rictor 1:2000 (Abcam) y anti-mSIN1 1:2500 (Millipore). A continuación, y tras tres lavados de 15 minutos con tampón fosfato salino (PBS) más Tween 2.5%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-mouse 1:2500 (Cell Signaling) y anti-rabbit 1:10000 (Dako). Ambos anticuerpos conjugados a la enzima HRP (Horseradisch Peroxidase), la cual catalizara la reacción

enzimática quimioluminiscente. De nuevo se hicieron otros tres lavados con PBS-Tween de 15 minutos.

Posteriormente, las membranas se revelaron con ECL (Enhanced Chemiluminescence, Millipore). Las imágenes fueron adquiridas utilizando el equipo ImageQuant LAS 500 imager (GE Healthcare Life Sciences).

### **3.4. Caracterización estructural del complejo purificado**

Las muestras del complejo mTORC2 procedentes de la centrifugación en gradiente de densidad (GraFix) se utilizaron para llevar a cabo la caracterización estructural del mismo a través de microscopía electrónica. La obtención de las imágenes, así como el procesamiento previo de las mismas se llevaron a cabo en el laboratorio de la Prof. Eva Nogales en la Universidad de California, Berkeley.

#### **3.4.1. Preparación de muestras**

##### **3.4.1.1. Preparación de muestras mediante tinción negativa**

En la preparación de las muestras mediante tinción negativa se utilizaron rejillas de cobre cubiertas con carbón (CF-400 Cu 50/pk Carbon Film On 400 Square Mesh Copper Grids, Electron Microscopy Sciences). Las rejillas se sometieron a una descarga iónica durante 1m con el objetivo de generar una superficie hidrofílica que favorezca la adsorción del espécimen. A continuación, se depositó la muestra sobre las rejillas activadas (4-8  $\mu$ l a una concentración entre 0,05 y 0,1 mg/ml) y se dejó adherir a la superficie aproximadamente 2 min. A continuación, se retiró el exceso de muestra ligeramente utilizando papel de filtro (Whatman) de manera que sólo quedara una película de muestra sobre la rejilla y se lavó dos veces con agua mili-Q durante 30 s. Se eliminó el exceso de solución con papel de filtro, se tiñeron con acetato de uranilo al 1-2% (p/v) durante 1 min. Por último, se retiró el exceso del agente de tinción y se dejaron secar las rejillas al aire.

Las rejillas de tinción negativa se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 estabilizado a 100 kV. Las imágenes se tomaron con una cámara TemCam-F416 a una magnificación de 40,000 aumentos. En todos los casos, las imágenes se obtuvieron utilizando mínima dosis en la cual los electrones indiquen sobre la muestra una sólo vez con una dosis igual o menor a  $10 e^-/\text{\AA}^2$  de tal manera que se consigue preservar la mayor cantidad de información estructural posible sin dañar la muestra.

##### **3.4.1.2. Preparación de muestras vitrificadas**

La preparación de muestras vitrificadas para su estudio mediante crio-microscopía se realizó en el laboratorio de la Prof. Eva Nogales en la Universidad de Berkeley (San Francisco, CA). Las muestras de proteína se depositaron sobre rejillas de cobre con recubrimiento de carbón (QUANTIFOIL 300 mesh R2/1 holey carbon copper grids, Quantifoil Micro Tools GmbH), previamente ionizadas y en condiciones de 4°C y 100% de humedad. A continuación, fueron vitrificadas utilizando un sistema automatizado (Vitrobot Mark III, FEI Inc), mediante inmersión en etano líquido.

Las primeras rejillas de crio-microscopía de las muestras de mTORC2 se observaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai F20 estabilizado a 200 kV. Las imágenes se

tomaron con una cámara 4K Gatan Utrascan 4000. Las imágenes obtenidas con este microscopio se procesaron y se utilizaron como modelo para la toma de imágenes con el microscopio FEI Titan 80-300 que contaba con una cámara con detector directo Summit K2 de Gatan. El procesamiento de imagen se llevó a cabo con las imágenes tomadas con este microscopio.

### **3.4.2. Procesamiento de imágenes**

#### **3.4.2.1. Procesamiento digital de imágenes**

En cada imagen se estimó la función de transferencia de contraste (Contrast Transfer Function, CTF) utilizando el programa CTFFIND3b [182] y corregida con el programa BSOFT [183]. Una vez corregida la CTF de las imágenes se procedió a la selección y extracción de partículas individuales utilizando o el comando e2boxer.py del paquete EMAN2 [184] o el programa micrograph\_mark del paquete XMIPP [185], alternativamente. Antes de llevar a cabo el procesamiento bidimensional, las partículas se sometieron a un preprocesamiento que consistió en escalar, recortar y centrar según los requerimientos de cada muestra. A continuación, se normalizaron con el objetivo de obtener niveles de grises equivalente entre las distintas imágenes utilizando el comando proc2d, EMAN [186].

#### **3.4.2.2. Alineamiento y clasificación bidimensional de partículas individuales**

La obtención de medias libres de referencia se realizó utilizando los programas e2r2d.py (EMAN2 [184]), ML2D (XMIPP [185]) y CL2D (XMIPP [187]). A partir de estas medias libres de referencia, se procedió a seleccionar de forma manual las partículas de mejor calidad, obteniéndose un nuevo set de datos. Este nuevo set se utilizó en el posterior proceso de refinamiento angular.

#### **3.4.2.3. Reconstrucción tridimensional y generación de volúmenes iniciales**

Se utilizaron distintas aproximaciones para la obtención de los volúmenes iniciales. Se identificaron las posibles vistas frontales y laterales en las medias libres de referencia y a partir de estas se generaron volúmenes iniciales utilizando el programa Initial model (EMAN2 [184])

#### **3.4.2.4. Refinamiento angular**

Tomando los volúmenes iniciales como partida, se realizó un proceso de refinamiento angular iterativo utilizando los comandos refine de EMAN [186] y con XMIPP el comando projection\_matching [185]. Durante el procesamiento se refinaron de forma paralela distintos modelos iniciales.

### **3.5. Ensayos de caracterización funcional del complejo purificado.**

#### **3.5.1. Inclusión del complejo mTORC2 purificado en el interior de células de mamífero**

Una vez purificado el complejo, se procedió a estudiar su funcionalidad. Uno de los experimentos que se llevó a cabo consistió en interiorizar el complejo mTORC2 en el interior de células de mamífero. Para lograr este objetivo se utilizó un kit comercial llamado Protein Delivery, PULSin (Polyplus transfection®). Este experimento es muy útil para estudios de interacciones entre proteínas, tráfico intracelular de proteínas o funcionalidad de péptidos y

proteínas en el interior de células de mamífero. El experimento consiste en incluir el complejo mTORC2 dentro de la célula atravesando la membrana plasmática siendo liberado eficientemente en el citoplasma de las células. Esto se ha conseguido gracias al reactivo PULSin que consiste, principalmente, en una molécula anfipática catiónica.

Para llevar a cabo el experimento, en primer lugar, se sembraron células de dos líneas celulares distintas: HEK293T y U87 (línea celular primaria de glioblastoma multiforme humano), con el objetivo de conseguir en 24 horas una confluencia del 70-80%. El experimento consistió en incubar las células con el reactivo PULSin junto con 1 µg del complejo purificado, siguiendo el protocolo del fabricante.

Finalmente, se recogió el experimento para su posterior caracterización funcional mediante inmunodetección por Western blot, microscopía confocal, citometría de flujo y ensayos de viabilidad celular.

### **3.5.1.1. Inmunodetección mediante Western blot**

La inmunodetección de proteínas mediante la técnica de Western blot permite cuantificar la cantidad de las mismas a través del densitometrado de las bandas. Esta técnica se llevó a cabo con el objetivo de evaluar los niveles de las diferentes subunidades que forman el complejo mTORC2 en células en las que no se había introducido el complejo mTORC2 (células no tratadas) y células en las que sí se había introducido el complejo purificado (células tratadas). También se estudiaron los niveles de fosforilación de Akt en el residuo S473, como principal sustrato de la actividad quinasa del complejo mTORC2. Y, por último, se evaluaron los niveles de LC3-I y LC3-II, proteínas implicadas en la formación de autofagosomas.

Para llevar a cabo este experimento, transcurridas las 72 horas, se recogió el cultivo, se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 1.200 rpm, se retiró el sobrenadante y se congelaron los precipitados celulares a -80°C para su análisis posterior.

Posteriormente, para su análisis, las muestras una vez descongeladas se lisaron con 50 µl del tampón: HEPES 10 mM, MgCl 1.5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, Tritón X-100 0.2%, cocktail de inhibidores de proteasas 1x, cocktail fosfatasa 1x, ortovanadato 2 mM, PMSF 1 mM. Una vez resuspendido el precipitado, se incubó en agitación durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000rpm, tras lo cual se desechó el precipitado y el sobrenadante se utilizó para continuar con el análisis.

Estas muestras fueron cargadas en geles de 10% de acrilamida para posteriormente llevar a cabo la inmunodetección de proteínas mediante la técnica de Western blot, transfiriendo las proteínas a membranas de PVDF (BioRad). Posteriormente, una vez bloqueadas las membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en blotto-tween 1.25%: anti-pAkt S473 1:2000 (Cell Signaling Technology®), anti-GAPDH 1:10.000 (Cell Signaling), anti-LC3 1: 1000 (Sigma-Aldrich) y anti-mTOR 1:2000 (Millipore). Tras tres lavados de PBS-Tween de 15 minutos, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios diluidos en blotto-tween 1.25%: anti-mouse 1:2500 (Cell Signaling) y anti-rabbit 1:10000 (Dako). Seguidamente, las membranas se volvieron a lavar tres veces con PBS-Tween durante 15 minutos y finalmente se incubaron con el reactivo ECL (Millipore) para que los anticuerpos secundarios emitan señal debido a la reacción enzimática de quimioluminiscencia.

Las imágenes de las membranas fueron adquiridas con el equipo ImageQuant LAS 500 imager (GE Healthcare Life Sciences). La cuantificación de la intensidad de las bandas se llevó a cabo mediante el software Image Studio Lite (LI-COR). Los datos se procesaron con el software de análisis estadísticos GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla).

### **3.5.1.2. Inmunodetección mediante microscopía confocal**

Los niveles de mTOR, pAkt y LC3 también fueron estudiados mediante su inmunodetección por microscopía confocal. Para ello, las células HEK293T y U87, en las cuales se había llevado a cabo el experimento con Protein Delivery (PD), fueron sometidas a un protocolo de marcaje inmunofluorescente y se analizaron mediante microscopía confocal con el microscopio láser confocal Olympus FV1200 (CAI, Servicio de microscopía UCM).

Tras las 72 horas de incubación después de interiorizar en las células el complejo mTORC2, ambos cultivos celulares fueron incubados con el tampón de fijación que contenía un 4% de paraformaldehído (PFA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con 0.5% de Triton X-100 en solución salina tamponada con T tris(hidroximetil)aminometano (TBS). Después de varios lavados, las células se bloquearon y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, 30 minutos a 37°C: anti-mTOR 1:100 (Millipore), anti-pAkt S473 1:200 (Cell Signaling Technology®) y anti-LC3 1:100 (Sigma-Aldrich). A continuación, se hicieron otros tres lavados con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-ratón ALEXA 488 1:250 (Thermo Fisher) y anti-conejo ALEXA 647 1:250 (Thermo Fisher) durante 20 minutos.

Finalmente, tras tres lavados con PBS se procedió al montaje de los cubres (Thermo Fisher) en los portas (Thermo Fisher). Para ello, cada cubre se sumergió rápidamente en agua destilada para eliminar posibles cristales formados por las sales de los tampones utilizados. Después se añadió poca cantidad de medio de montaje junto con DAPI, para la tinción del núcleo) en el porta y sobre él se colocó el cubre y se dejó secar totalmente.

### **3.5.1.3. Inmunodetección mediante citometría de flujo.**

Por último, se realizó la inmunodetección de pAkt y LC3 por citometría de flujo, tanto en las células a las que se les había introducido el complejo mTORC2 y en las células no tratadas.

Tras las 72 horas de incubación, las células se lavaron con PBS, se trataron con tripsina y se resuspendieron en PBS ajustando la concentración de las mismas a  $10^6$  células/ml. Posteriormente, fueron fijadas añadiendo PFA al 4% (1:1; vol:vol) e incubadas 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Tras lavarlas con PBS, se resuspendieron en PBS-Tween para la permeabilización de las mismas. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente: anti-pAkt S473 1:100 (Cell Signaling Technology®) y anti-LC3 1:100 (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos en hielo. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1200rpm durante cinco minutos. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit ALEXA 647 1:5000 (Thermo Fisher) durante 30 minutos protegiéndose de la luz.

Finalmente, las células resuspendidas en PBS 1X fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo, FACS Calibur (CAI, Servicio de microscopía UCM).

#### 3.5.1.4 Ensayo viabilidad celular.

Tras confirmar que el complejo mTORC2 exógeno se encontraba en el citoplasma celular de las células HEK293T y U87 se llevó a cabo un estudio que consistió en analizar la viabilidad de las mismas utilizando Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo consiste en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol mediante las mitocondrias de las células viables. Esta reducción convierte este compuesto en otro denominado formazan, resultando un viraje de color de amarillo a azul en el visible (540 nm).

Tras 72 horas de incubación de las células sometidas a la inserción del complejo mTORC2, se añade el compuesto MTT (1 mg/ml concentración final) al medio de cultivo incubándose durante dos horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el compuesto MTT y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) llevando 100 µl a una microplaca (Corning) para medir la absorbancia de cada pocillo a 570 nm utilizando el lector de microplacas Rayto RT-6100.

#### 3.5.2. Ensayo funcionalidad *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del complejo mTORC2 se llevó a cabo el estudio del estado de fosforilación de Akt *in vitro*, gracias a la aportación de la proteína Akt recombinante purificada por Alba Orea del grupo del Dr. Guillermo Velasco. Para ello, el complejo mTORC2 se incubó con la proteína Akt recombinante unida a GST, 500 mM de ATP en presencia de 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup>, 50 mM KCl y 25 mM HEPES a pH 7.5. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, las muestras se analizaron mediante un ensayo de inmunodetección analizando la cantidad de Akt fosforilada midiendo también la cantidad de Akt total.

Tras la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF, estas se bloquearon en la solución de bloqueo durante una hora, y después se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios: anti-pAkt S473 1:2000 (Cell Signaling Technology®), anti-Akt total 1: 2000 (Cell Signaling Technology®). Tras los lavados correspondientes, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios: anti-mouse 1:2500 (Cell Signaling) y anti-rabbit 1:10000 (Dako). Finalmente, después de lavar las membranas tres veces con PBS-Tween, se incubaron con el reactivo ECL (Millipore) para la adquisición de la imagen con el LAS 500 imager (GE Healthcare Life Sciences).

CAPÍTULO I:  
PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO  
mTORC2





## **4. CAPÍTULO 1: PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO mTORC2.**

### **4.1. INTRODUCCIÓN.**

El receptor altamente conservado de la rapamicina, mTOR, es un importante regulador central que conecta el metabolismo y crecimiento celular; principalmente promoviendo los procesos anabólicos como la síntesis de lípidos, proteínas y aminoácidos; y suprimiendo procesos catabólicos como la autofagia y apoptosis. Hace más de tres décadas desde el descubrimiento del receptor de la rapamicina, mTOR, y sus subsecuentes estudios llevados a cabo por varios laboratorios han realizado el entendimiento sobre el mismo receptor y ambos complejos de los que forma parte [5-7]. Sin embargo, aún existen muchas cuestiones sin resolver, especialmente sobre el complejo mTORC2.

Hasta la fecha del comienzo del presente trabajo de investigación, tan solo se había conseguido la purificación del complejo mTORC1. El gran tamaño y la inestabilidad de ambos complejos complicaban el proceso de purificación y por tanto la caracterización funcional y estructural. Calvin y colaboradores solventaron estos inconvenientes con el establecimiento de una línea estable de células humanas las cuales expresaban la subunidad del complejo mTORC1, Raptor unido a una secuencia peptídica (cola o etiqueta), Flag; que posteriormente facilitó la purificación del complejo (mTOR, Raptor y mLST8) [75].

La purificación del complejo mTORC2 constituye uno de los principales objetivos del presente trabajo de investigación. Tomando como referencia el trabajo desarrollado por Calvin y colaboradores [75] de la purificación del complejo mTORC1, en este capítulo se presenta el proceso de purificación del complejo mTORC2. En este caso se eligió la subunidad mSIN1 ya que se trata de una subunidad específica del complejo mTORC2. Para ello, la subunidad mSIN1 fusionada a una cola de histidinas en su extremo amino terminal se sobreexpresó en células de mamífero con el objetivo de establecer una línea estable y purificar el complejo íntegro para poder realizar estudios funcionales y estructurales del mismo, objetivos desarrollados en capítulos posteriores.

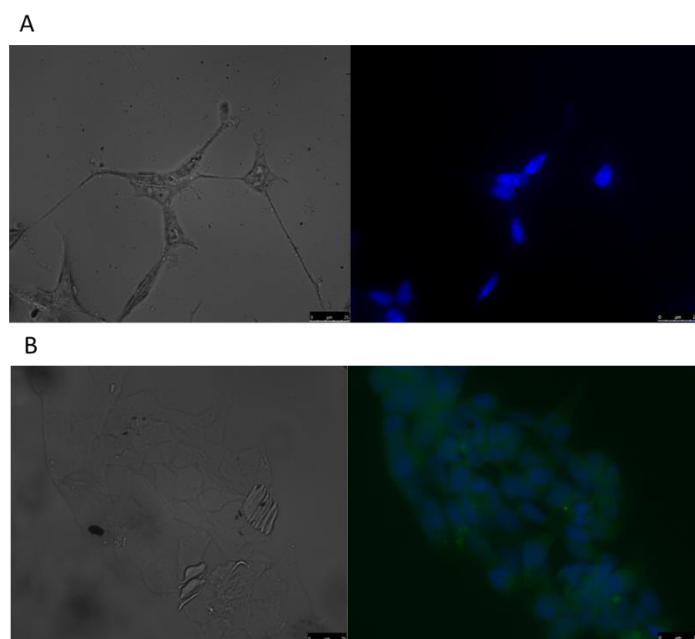
### **4.2. RESULTADOS.**

#### **4.2.1. Clonación y expresión de la proteína mSIN1.**

Con el objetivo de purificar el complejo mTORC2 formado por las subunidades: mTOR, mLST8, Rictor y mSIN1, la isoforma 1 de la proteína mSIN1 se clonó en células bacterianas TOP10. La clonación se diseñó insertando la correspondiente secuencia de la proteína mSIN1 en el sitio de clonación múltiple del plásmido pIRES-EGFP. El sitio de clonación de este plásmido contiene, además, una secuencia codificante para la proteína fluorescente verde, EGFP. La secuencia para la proteína mSIN1 contiene una cola de seis histidinas en el extremo amino terminal que permitirá su posterior purificación.

Las bacterias TOP10 transformadas con el plásmido pIRES-EGFP fueron incubadas en medio LB-ampicilina. Tras la incubación, las bacterias fueron centrifugadas. El precipitado resultante se utilizó para la extracción del plásmido con kits comerciales (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega). Finalmente, se obtuvieron concentraciones de ADN de 300 µg/µl aproximadamente.

Posteriormente, se utilizó este ADN para transfectar con lipofectamina células embrionarias de riñón humano, HEK293T con el objetivo de establecer una línea estable de células que sobreexpresaran la proteína recombinante mSIN1. Para ello, se añadió al medio gentamicina (G418 disulfate salt, SIGMA), antibiótico para el cual el plásmido pIRES-EGFP presenta resistencia. Las muestras de células HEK293T no transfectadas y células procedentes de la línea estable fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica DM4000 B con cámara Hamamatsu Orca R2) tras fijarlas y añadir DAPI (Figura 4.1).



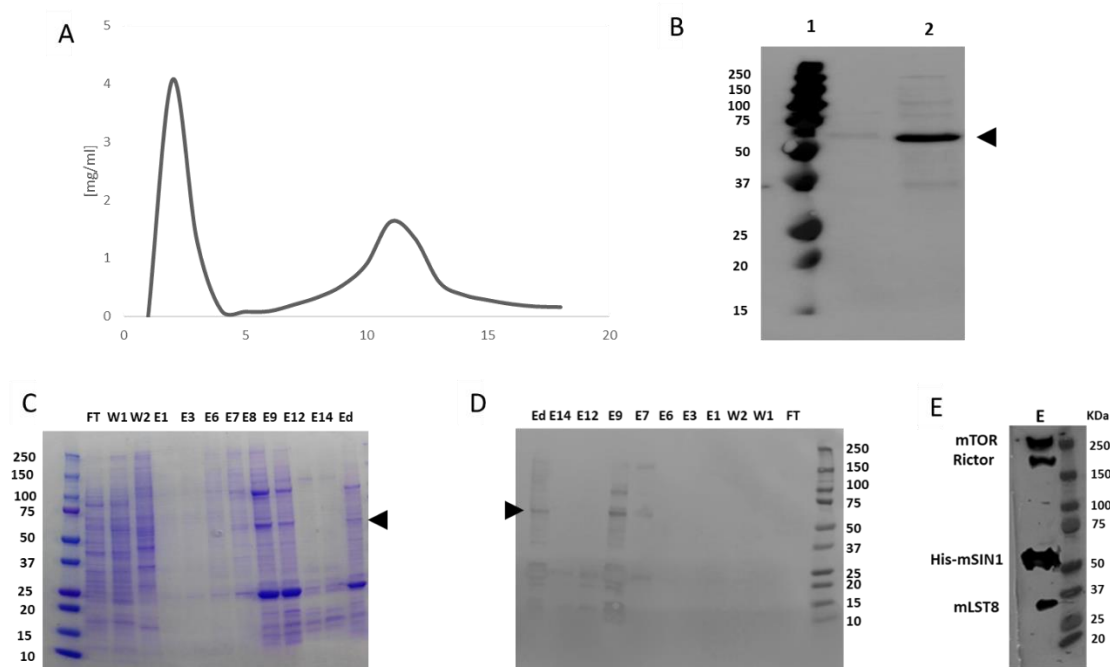
**Figura 4.1. Expresión de la proteína mSIN1.** A) Células HEK293T sin transfectar con el plásmido, fijadas y teñidas con DAPI. B) Células HEK293T transfectadas, fijadas y teñidas con DAPI.

#### 4.2.3. Purificación del complejo mTORC2

Para llevar a cabo la purificación del complejo mTORC2, una vez obtenida la línea estable de células HEK293T que sobreexpresan la proteína mSIN1, estas fueron lisadas para llevar a cabo la purificación del complejo mTORC2. Las condiciones de esta purificación fueron optimizadas con el objetivo de obtener el mayor rendimiento posible y purificar el complejo íntegro conteniendo las cuatro subunidades principales que lo conforman: mTOR, mSIN1, mLST8 y Rictor. La subunidad mSIN1 unida a una cola de histidinas se sobreexpresó en las células de mamífero HEK293T con el objetivo de arrastrar el complejo endógeno a través de ella. En la purificación de mTORC2 se utilizó Triton X-100 y CHAPS. Si el tampón de lisis contenía Triton X-100 el complejo se disociaba en dos heterodímeros Rictor/mSIN1 y mTOR/mLST8. Esto no ocurría si el tampón contenía CHAPS, por este motivo se decidió utilizar CHAPS. Este detergente facilita la ruptura de las membranas celulares y libera el contenido intracelular solubilizado.

En una primera aproximación la purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap (GE Healthcare). Tras la cromatografía de afinidad, el máximo de absorbancia a 280nm se detectó en las eluciones 7-9. Estas fracciones contenían la proteína de interés His-mSIN1 (Figura 4.2A y B). Posteriormente, fueron dializadas para eliminar el imidazol y, a continuación, para comprobar que esta muestra contenía las proteínas que forman parte del complejo mTORC2 se realizó una inmunodetección mediante la técnica de

Western blot donde se obtuvieron bandas correspondientes a las cuatro proteínas que constituyen el complejo: mTOR, Rictor, mSIN1 y mLST8 (Figura 4.2D).



**Figura 4.2. Purificación del complejo mTORC2.** **A)** Representación de las eluciones obtenidas en la cromatografía de afinidad en columna HisTrap (GE Healthcare) de la fracción soluble procedente de la lisis de la línea estable HEK293T estable que sobreexpresa la proteína mSIN1 unida a una cola de histidinas. **B)** SDS-PAGE y Western blot con anticuerpo anti-histidinas de las eluciones procedentes de la purificación mediante la columna HisTrap (GE Healthcare). Carril 1, marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad); carril 2, muestra procedente columna HisTrap (GE Healthcare). **C)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y tinción con azul de Coomassie de las eluciones procedentes de la columna HisTrap (GE Healthcare). Carril 1, marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad); carril 2, fracción no retenida; carril 3 y 4, lavados de la columna; carril 5-10, eluciones mediante gradiente de imidazol de la proteína mSIN1 unida a la columna mediante cola de histidinas (E1, E3, E6, E7, E9 y E14); carril 11, muestra tras la diálisis (Ed). **D)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y Western blot con anticuerpo anti-histidinas de las eluciones procedentes de la columna HisTrap (GE Healthcare). Carril 1, marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad); carril 2, fracción no retenida; carril 3 y 4, lavados de la columna; carril 5-10, eluciones mediante gradiente de imidazol de la proteína His-mSIN1 unida a la columna gracias a la cola de histidinas (E1, E3, E6, E7, E9 y E14); carril 11, muestra tras la diálisis (Ed). **E)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y Western blot con los anticuerpos: anti-mTOR, anti-Rictor, anti-histidinas y anti-mLST8 tras concentración con resina (StrataClean Resin) de las eluciones procedentes de la columna HisTrap (GE Healthcare). Carril 1, elución concentrada; carril 2, marcadores pesos moleculares (Bio-Rad). En todos los casos se indica el peso de los marcadores. La flecha señala la proteína mSIN1 unida a la cola de histidinas.

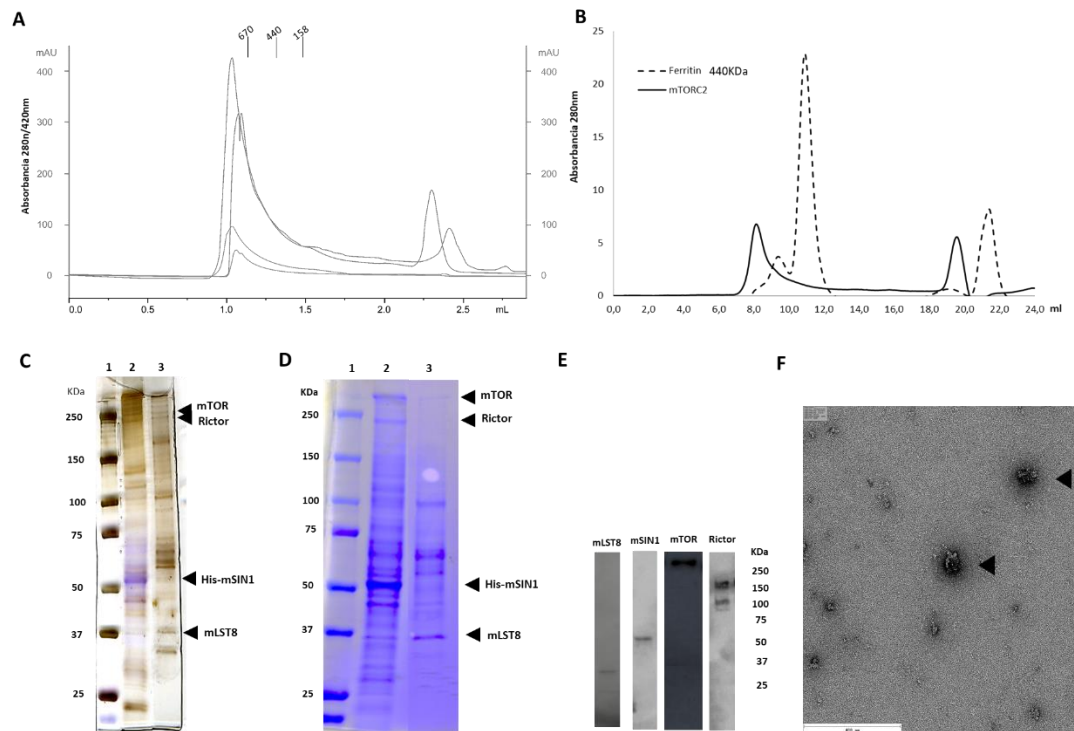
#### 4.2.4. Organización supramolecular del complejo mTORC2

Tras la purificación mediante la columna de afinidad, las eluciones que comprendían el máximo de absorbancia a 280nm se utilizaron para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular a través del uso de una columna de 4 ml Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) y otra columna de 24ml Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare) dependiendo de la concentración de la muestra. Utilizando la columna Superdex 200 PC 3.2/30 de 4 ml, se obtuvo un máximo de absorbancia a 280 nm en torno a 1.03 ml de volumen de elución que se corresponde con moléculas mayores de 670K Da de peso molecular, al compararlo con el perfil cromatográfico de estándares de calibración (GE Healthcare) (Figura 4.3A). Para corroborar que la fracción correspondiente al volumen de elución mencionado contenía al menos la subunidad mSIN1, se incubó dicha muestra con partículas de oro cubiertas de Ni<sup>2+</sup> que se unirían a la cola de histidinas

de dicha proteína. El perfil cromatográfico obtenido muestra un máximo absorbancia desplazado ligeramente hacia volúmenes mayores (1.07 ml), pudiendo resultar de la unión de las partículas de oro a la cola de histidinas de mSIN1 (Figura 4.3A). Una segunda cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Superdex 200 GL 10/300 de 24 ml, muestra un perfil con un máximo absorbancia a 280 nm en las fracciones eluidas en volúmenes menores que los correspondientes al volumen de elución de un marcador cuyo peso molecular es de 440 kDa, indicando que la muestra podría presentar un peso molecular mayor (Figura 4.3B). Por lo tanto, el perfil cromatográfico indica que las partículas contenidas en el pico de mayor absorbancia a 280 nm tienen un peso molecular superior a 670 kDa como se observa en la Figura 4.3A.

Las eluciones recogidas tras la cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular se cargaron en un gel SDS-PAGE en gradiente 4-15% y, posteriormente, se analizaron con tinción de plata y azul de Coomassie (Figura 4.3C y D). La calle del gel correspondiente a las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular, presenta un menor número de bandas que las presentes en las eluciones de la cromatografía de afinidad. En ambos casos, mediante inmunodetección por Western blot, se detectaron las subunidades del complejo: mLST8, mTOR, mSIN1 y Rictor (Figura 4.3E). En los resultados de la cromatografía de exclusión molecular se muestra una purificación más resolutive del complejo mTORC2, separando el complejo de las moléculas que se unían inespecíficamente a la columna de níquel.

Finalmente, las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular donde se identificaron las cuatro subunidades principales del complejo mTORC2 (mLST8, mTOR, Rictor y mSIN1) se utilizaron para la preparación de rejillas por tinción negativa y su posterior visualización por microscopía electrónica (Figura 4.3F). En las imágenes obtenidas se observaron formaciones que podrían corresponder con posibles agregados de proteína.



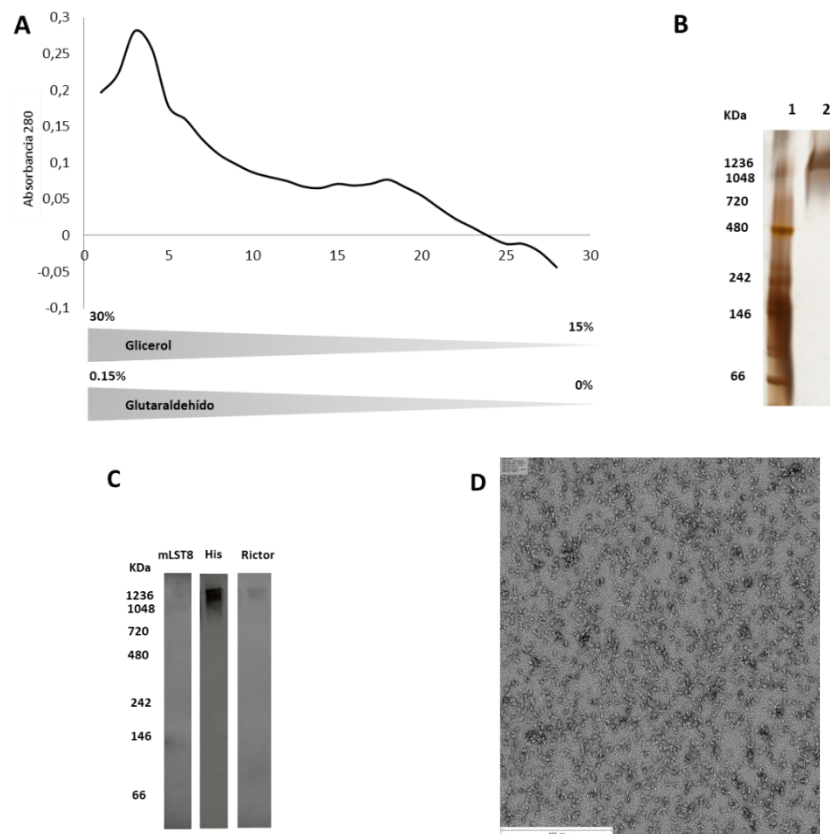
**Figura 4.3. Caracterización supramolecular del complejo mTORC2 purificado.** **A)** Cromatografía de exclusión molecular del complejo mTORC2, antes y después de la incubación con oro, utilizando una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare). En la parte superior se encuentran indicados las proteínas utilizadas como control para calibrar la columna (GE Healthcare). **B)** Cromatografía de exclusión molecular del complejo mTORC2 y Ferritina (440KDa), utilizando una columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare). **C)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y tinción con plata de las fracciones procedentes de la columna HisTrap (GE Healthcare) y Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare). Carril 1, marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad); carril 2, fracción de muestra procedente de la columna HisTrap (GE Healthcare); carril 3, fracción procedente columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare). **D)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y tinción con azul Coomassie de las eluciones procedentes de la columna HisTrap (GE Healthcare) y Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare). Carril 1, marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad); carril 2, fracción de muestra procedente de la columna HisTrap (GE Healthcare); carril 3, fracción procedente de columna Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare). **E)** SDS-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y Western blot con los anticuerpos: anti-mLST8, anti-mTOR, anti-Rictor y anti-mSIN1. **F)** Campo de microscopía representativo obtenido del complejo mTORC2 después de la cromatografía de exclusión molecular. Barra de escala 400nm. Las flechas señalan agregados proteicos.

#### 4.2.5. Estabilización del complejo mediante el método GraFix

Las imágenes recogidas por microscopía revelaron la posible formación de agregados, por lo que se optó por someter a la muestra a un proceso de estabilización del complejo macromolecular mediante el método GraFix [176, 188]. Este consiste en la purificación basada en una ultracentrifugación en gradiente de densidad en presencia de un agente entrecruzador cuyo principal objetivo es estabilizar la estructura y evitar la formación de agregados. El complejo tras la cromatografía de afinidad se sometió a una ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol/glutaraldehído. Las fracciones del gradiente fueron recogidas mediante una bomba peristáltica, y se midió la absorbancia de las mismas a 280 nm en un espectrofotómetro (Figura 4.4A). El perfil de absorbancia a 280 nm muestra un máximo en las fracciones en las cuales el porcentaje del agente entrecruzador, glutaraldehído, es mayor. Las fracciones con estas absorbancias se sometieron a geles Blue Native-PAGE (BN-PAGE) en gradiente 4-15%, para llevar a cabo una electroforesis en condiciones nativas. Tras la tinción con plata de este gel se

obtuvo únicamente una banda que se correspondía con un peso molecular similar a 1236 kDa (Figura 4.4B). Así mismo, en la inmunodetección por Western blot de las subunidades del complejo mTORC2: mLST8, Rictor y mSIN1, se detectaron bandas a la misma altura que aparecía en la tinción de plata (Figura 4.4C). Puesto que la electroforesis se llevó a cabo en condiciones nativas y en función de los resultados de la inmunodetección y la tinción con plata, se podría indicar que esta fracción obtenida tras la ultracentrifugación en gradiente contenía el complejo mTORC2. Además, el peso molecular aproximado que muestra la altura de la banda correspondiente a un peso molecular aproximado de 1236 kDa podría indicar que se trata de un dímero.

Finalmente, dichas fracciones se observaron mediante microscopía electrónica por tinción negativa (Figura 4.4D). En las imágenes obtenidas, se puede apreciar que tras la ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol/glutaraldehído no se forman agregados y se pueden observar una muestra aparentemente homogénea de partículas individuales.



**Figura 4.4. Estabilización del complejo mTORC2 purificado. A)** Perfil de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol en presencia de glutaraldehído (GraFix). **B)** BN-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y tinción con plata de las fracciones correspondientes a las eluciones de mayor absorbancia a 280 nm. Calle 1, marcadores de pesos moleculares (Native Mark Unstained Protein Standard, Invitrogen); calle 2, muestra de la fracción con máximo de absorbancia a 280nm del GraFix. **C)** BN-PAGE en gradiente 4-15% (Bio-Rad) y Western blot utilizando los anticuerpos: anti-mLST8, anti-His y anti-Rictor. A la izquierda se indican los marcadores de pesos moleculares (Native Mark Unstained Protein Standard, Invitrogen) **E)** Campo de microscopía representativo obtenido para el complejo mTORC2 tras la ultracentrifugación en gradiente de glicerol en presencia de glutaraldehído. Barra de escala 400nm.

### 4.3. DISCUSIÓN.

El receptor de la rapamicina es una serina/treonina quinasa altamente conservada en eucariotas, desde levaduras hasta humanos [6, 189]. Este forma parte de dos complejos diferentes a nivel funcional y estructural: mTORC1 y mTORC2. Además, ambos complejos comparten la subunidad mLST8, que junto a mTOR conforman el núcleo de ambos complejos [14]. Por otro lado, Raptor es la subunidad específica del complejo mTORC1; mientras que Rictor y mSIN1 son componentes específicos del complejo mTORC2 [13, 15, 86, 96]. Las funciones del receptor de la rapamicina van dirigidas al control de la proliferación y supervivencia celular, participando en procesos anabólicos como la síntesis de lípidos y proteínas, y catabólicos regulando los procesos de autofagia y apoptosis. Desregulaciones en la vía de señalización de estos complejos son responsables de la aparición de alteraciones como el cáncer. Sin embargo, a pesar del importante papel de mTORC1 y mTORC2 aún quedan muchas preguntas por resolver.

#### **Purificación del complejo mTORC2.**

A pesar del gran tamaño del complejo y su inestabilidad, Calvin y colaboradores lograron purificar el complejo mTORC1 mediante la sobreexpresión de la subunidad específica de este, Raptor, fusionado a una etiqueta de Flag [75]. Puesto que hasta la fecha no se había conseguido, la purificación del complejo mTORC2 constituye uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación. Para ello, tomando como referencia estudios previos, se llevó a cabo la sobreexpresión de la subunidad específica del complejo mTORC2, mSIN1, en células de mamíferos HEK293T. El gen de mSIN1 sobreexpresado contiene una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal facilitando su purificación para retener por afinidad una mayor cantidad de proteína funcional con el menor número de contaminantes. Para llevar a cabo la purificación se utilizó un tampón de lisis que contenía CHAPS como detergente, puesto que en estudios previos de inmunoprecipitación del complejo se observó que la integridad del complejo permanecía estable cuando se utilizaba este detergente [190]. Posteriormente, el lisado celular se sometió a la purificación de His-mSIN1 con el objetivo de conseguir arrastrar al complejo mTORC2 formado por mTOR, Rictor, mLST8 y mSIN1. Para ello se utilizaron dos herramientas paralelamente: resina de níquel o una columna de níquel preempaquetada. Las fracciones correspondientes a las eluciones de la columna de níquel fueron analizadas mediante geles SDS-PAGE y posterior inmunodetección de las subunidades del complejo mTORC2: mTOR, mLST8, Rictor y mSIN1. Los resultados mostraron la presencia de las cuatro subunidades que forman parte del complejo mTORC2.

#### **Organización molecular del complejo mTORC2 purificado, este se encuentra en un estado de dimerización.**

Tras la cromatografía de afinidad, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular para conseguir una purificación más resolutive además de una estimación del peso molecular del complejo y, a modo preparativo, para su posterior estudio estructural mediante microscopía electrónica. El perfil de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas en esta cromatografía de exclusión molecular muestra que las fracciones con máxima absorbancia a 280 nm aparece en un volumen de elución menor que el correspondiente al marcador de peso molecular 440 kDa y menor que el del marcador cuyo peso molecular es de 670 kDa. Considerando la suma de los pesos moleculares de los componentes del complejo mTORC2, este tendría un peso molecular de aproximadamente 650 kDa, podría estar formando dímeros. Estos resultados coinciden con los análisis bioquímicos del complejo TORC2 en levaduras, los cuales indican que el complejo se encuentra en forma de dímero; además, en este mismo estudio encontraron

resultados similares en cuanto a la dimerización de ambos complejos, mTORC1 y mTORC2, en mamíferos [187]. Paralelamente, se llevó a cabo un proceso de estabilización del complejo mTORC2 purificado mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol con glutaraldehído (GraFix). El perfil de absorbancia a 280 nm muestran un máximo en las fracciones recogidas que se corresponde con la presencia del glutaraldehído en un mayor porcentaje. Estas fracciones fueron sometidas a una electroforesis en condiciones nativas y posterior inmunodetección mediante Western blot de los diferentes componentes del complejo mTORC2. Los resultados mostraron una banda a la misma altura para las subunidades Rictor, mLST8 y mSIN1, que se corresponde con un peso molecular aproximado de 1236 kDa. Estos resultados confirman que el complejo mTORC2 purificado se encuentra posiblemente formando un dímero. Estudios estructurales del complejo mTORC1 y, muy recientemente, del complejo mTORC2 coinciden en que ambos complejos se encuentran formando dímeros a través de la interacción de las regiones HEAT de las dos subunidades mTOR, cada una de ellas presente en cada uno de los monómeros. El patrón de dimerización de ambos complejos es similar; sin embargo, mTORC2 presenta un hueco central más estrecho que el complejo mTORC1 como resultado de una dimerización posiblemente más compacta [75, 142]. Esta podría ser la razón por la cual, en condiciones nativas, no se consigue detectar la subunidad mTOR, ya que la subunidad queda cubierta e inaccesible por el resto de subunidades tras el ensamblaje del complejo.

#### **Estabilidad del complejo mTORC2 del complejo purificado.**

Con el propósito de un posterior estudio de la estructura del complejo mTORC2, se llevó a cabo la tinción negativa de las fracciones procedentes de las eluciones de la cromatografía de exclusión molecular para su posterior análisis por microscopía electrónica. En las micografías de estas se observaron formaciones de agregados en las muestras. Por este motivo, se optó por utilizar el método de GraFix para conseguir una mayor estabilización del complejo mediante la ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol utilizando un agente entrecruzador, en este caso el glutaraldehído. Así mismo, las fracciones procedentes del método de GraFix fueron analizadas por microscopía mediante tinción negativa. En esta ocasión, no se visualizaron agregados, si no muestras aparentemente homogéneas de partículas individuales.

**CAPÍTULO II:  
INTEGRIDAD FUNCIONAL  
DEL COMPLEJO mTORC2**





## 5. INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL COMPLEJO mTORC2.

### 5.1. INTRODUCCIÓN

El complejo mTORC2 controla la proliferación y la supervivencia celular principalmente por la fosforilación de varios miembros de la familia de las quinasas AGC. Entre los sustratos del complejo mTORC2 se encuentran la proteína quinasa Akt, la proteína quinasa PKC y la proteína SGK1 [67].

Akt es una serina/treonina quinasa activada por un mecanismo dual que requiere su translocación a la membrana plasmática y su fosforilación. Akt contiene un dominio PH el cual tiene una gran afinidad por PIP3. Dicha unión es la responsable de la translocación de Akt hacia la membrana plasmática y su fosforilación en T308 mediada por la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1). Sin embargo, es necesaria una segunda fosforilación de Akt para ser activada completamente. Esta segunda fosforilación es mediada por el complejo mTORC2 [18, 191-193].

La proteína Akt, fosforilada y activada por la vía de señalización insulina/PI3K, promueve la supervivencia celular, proliferación y crecimiento de las células a través, a su vez, de la fosforilación de otros sustratos incluyendo el factor de transcripción FoxO1/3, el regulador metabólico GSK3 $\beta$  y el inhibidor de mTORC1, TSC2 [37, 128].

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos tras la caracterización de la integridad funcional del complejo mTORC2 purificado de células de mamífero HEK293T. Siendo Akt uno de los principales sustratos del complejo mTORC2, se llevó a cabo una cuantificación de los niveles de fosforilación de Akt en dos líneas celulares, HEK293T y U87, tras introducir el complejo mTORC2 en su interior y; además, se realizó un ensayo de fosforilación de Akt *in vitro* también para evaluar la integridad funcional del complejo mTORC2.

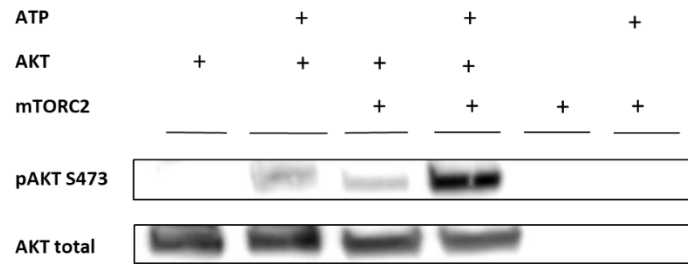
Por otro lado, es bien conocido que mTORC2 tiene un importante papel en la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis y de manera indirecta inhibiendo la autofagia a través de la activación del complejo mTORC1. En este capítulo se muestran además los resultados obtenidos en el estudio de viabilidad para ambas líneas celulares, HEK293T y U87, como respuesta al complejo mTORC2 exógeno.

### 5.2. RESULTADOS

#### 5.2.1. Actividad quinasa del complejo purificado mTORC2.

Puesto que la actividad quinasa del complejo mTORC2 fosforila la serina 473 de Akt, uno de los principales sustratos del complejo mTORC2 [67], se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro* con el objetivo de conocer la integridad funcional del complejo mTORC2.

Para ello, se purificó Akt recombinante unida a una cola GST. Tras purificar el complejo mTORC2 este fue incubado con la proteína Akt añadiendo a la reacción 500 mM de ATP en presencia de 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup>, 50 mM KCl y 25 mM HEPES pH 7.4. Tras la incubación se llevó a cabo la inmunodetección de Akt total, así como la cuantificación de los niveles de fosforilación en la S473. En la Figura 5.1 aparece una banda de mayor intensidad correspondiente a la Akt fosforilada en la S473, cuando la Akt es incubada con el complejo mTORC2.



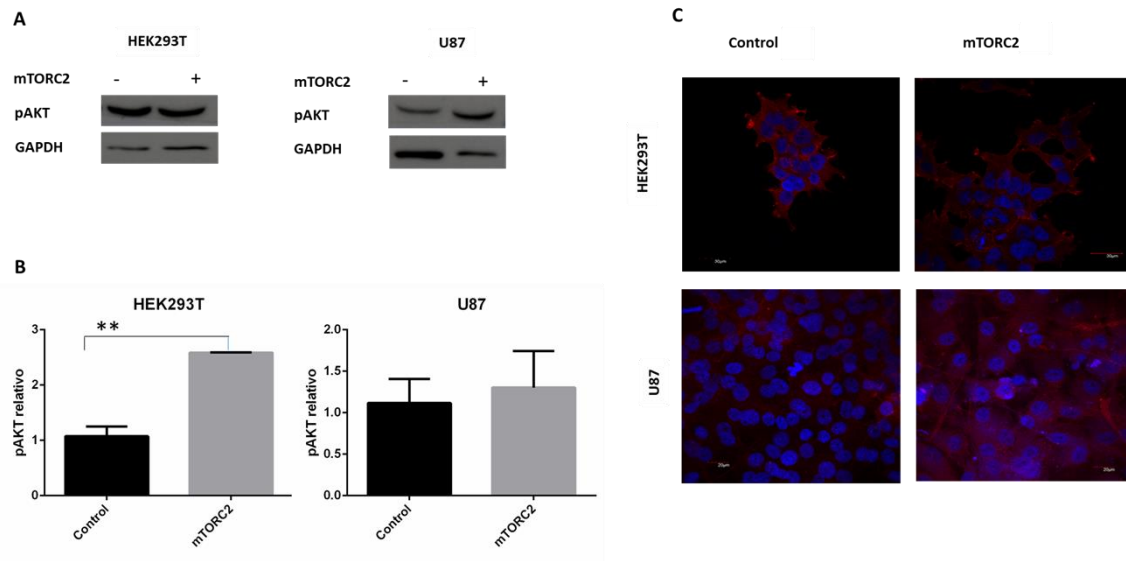
**Figura 5.1. Actividad quinasa del complejo purificado mTORC2.**  
Ensayo de fosforilación de Akt en el residuo S473 presencia de mTORC2 exógeno.

### 5.2.2. Niveles de fosforilación de Akt en células HEK293T y U87

Se midieron los niveles de fosforilación de Akt *in vivo* tras introducir el complejo mTORC2 en dos líneas celulares: HEK293T y U87. La línea celular HEK293T son células embrionarias de riñón humano que no presentan *per se* ninguna alteración en la ruta de señalización PI3K/mTOR/ Akt, mientras que las U87 son células de glioblastoma multiforme donde existen altos niveles de Akt fosforilada. Tras interiorizar el complejo mTORC2 en las células HEK293T y U87, los niveles de fosforilación de Akt fueron evaluados mediante la inmunodetección de la fosforilación de Akt en el residuo S473.

Tras la inmunodetección mediante Western blot, las bandas correspondientes a la proteína Akt fosforilada en la S473 fueron densitometradas con el objetivo de cuantificar los niveles de fosforilación. Este estudio revela que, tras incluir el complejo mTORC2 en el interior celular de ambas líneas celulares, los niveles de fosforilación en la S473 de Akt solo son significativamente mayores para la línea celular HEK293T ( $p\text{-valor} = 0,0014 < 0,05$ ) mientras que para las células U87 este aumento de la actividad quinasa del complejo mTORC2 no es significativo ( $p\text{-valor} = 0,3964 > 0,05$ ) (Figura 5.2A y B).

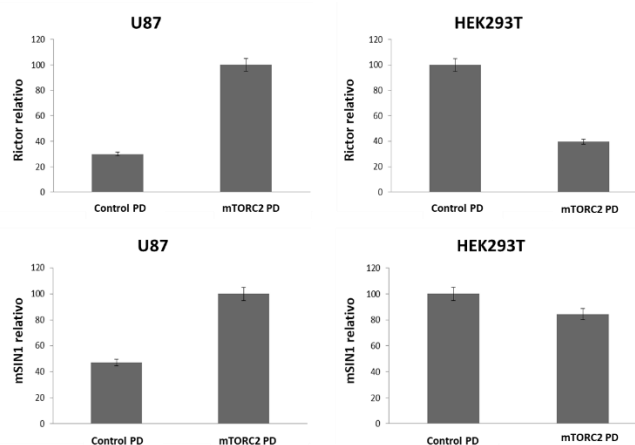
Las imágenes obtenidas mediante la inmunodetección de Akt en su forma fosforilada realizado por microscopia confocal revelan un aumento en los niveles de Akt fosforilada en ambas líneas celulares, HEK293T y U87 tras introducir el complejo mTORC2 en el interior de las mismas (Figura 5.2C).



**Figura 5.2. Ensayo in vivo de fosforilación de Akt.** A) Representación de los niveles de expresión de LC3-II normalizada frente a GAPDH. Los datos son representados por la media  $\pm$  SEM  $**p < 0.05$  vs Control (t-student test). C) Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal y marcaje de pAKT.

### 5.2.3. Niveles de expresión del componente del complejo mTORC2: mTOR

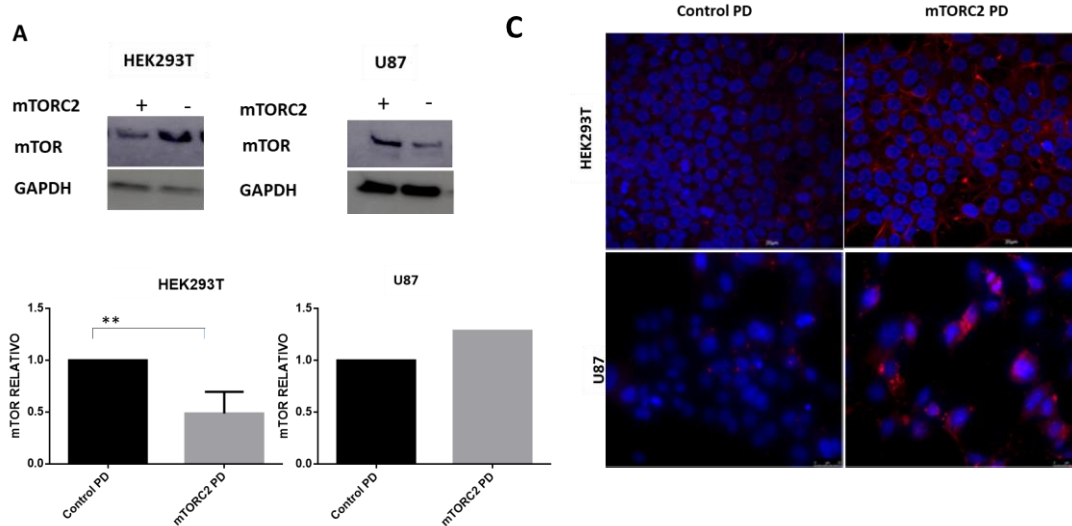
Con el objetivo de confirmar la introducción del complejo mTORC2 en el interior de ambas líneas celulares, se evaluaron de manera preliminar los niveles de expresión de las distintas subunidades del complejo mTORC2 (Figura 5.3). Los resultados obtenidos muestran que, inesperadamente, las células HEK293T presentaban niveles de Rictor y mSIN1 menores tras incluir el complejo mTORC2 en su interior celular, mientras que el comportamiento de estos niveles en la línea celular U87 era lo contrario, los niveles de mSIN1 Y Rictor aumentaban.



**Figura 5.3. Niveles de expresión de los componentes del complejo mTORC2:** Representación de los niveles relativos de expresión de mSIN1 Y Rictor normalizada frente a GAPDH.

Ante estos resultados, los niveles de mTOR, como principal componente del complejo mTORC2, también fueron cuantificados mediante el densitometrado de bandas obtenidas en la inmunodetección por Western blot, así como la visualización de mTOR mediante microscopía confocal.

Los resultados representados por la figura 5.4A muestran que, para el caso de las células HEK293T, los niveles de mTOR disminuyen significativamente tras incluir el complejo mTORC2 en el interior celular.



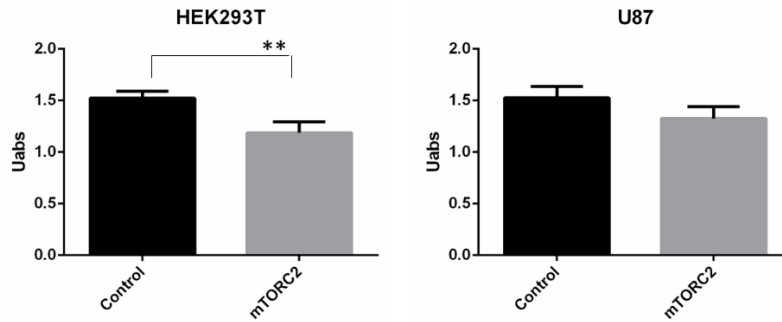
**Figura 5.4. Niveles de expresión del componente del complejo mTOR.** **A)** Western blot anti-mTOR y GAPDH **B)** Gráfica de barras que representa la densidad relativa de mTOR normalizada frente a GAPDH. Los datos son representados por la media  $\pm$  SEM  $**p < 0.05$  vs Control (t-student test) **C)** Imágenes adquiridas por microscopía confocal y marcaje de mTOR.

#### 5.2.4. Viabilidad celular

Dado que mTORC2 juega un papel importante en la regulación de la proliferación y supervivencia celular y teniendo en cuenta la disminución en los niveles de expresión de mTOR significativamente en las células HEK293T tras introducir el complejo, se evaluó la viabilidad de las células HEK293T y U87 antes y después de introducir el complejo mTORC2.

Para ello, se utilizó el reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), reactivo que es reducido por la enzima NADPH de las células viables, esta reducción del compuesto MTT es la responsable del cambio de coloración del medio medido a 570 nm.

Los resultados muestran una diferencia significativa ( $p$ -valor = 0,0017 < 0,05) en el caso de las células HEK293T, donde la viabilidad de estas se ve comprometida tras incluir el complejo mTORC2. Sin embargo, en el caso de las células U87, la diferencia entre el control y las células tratadas con el complejo mTORC2 exógeno no es significativa ( $p$ -valor = 0,0972 > 0,05) (Figura 5.5).



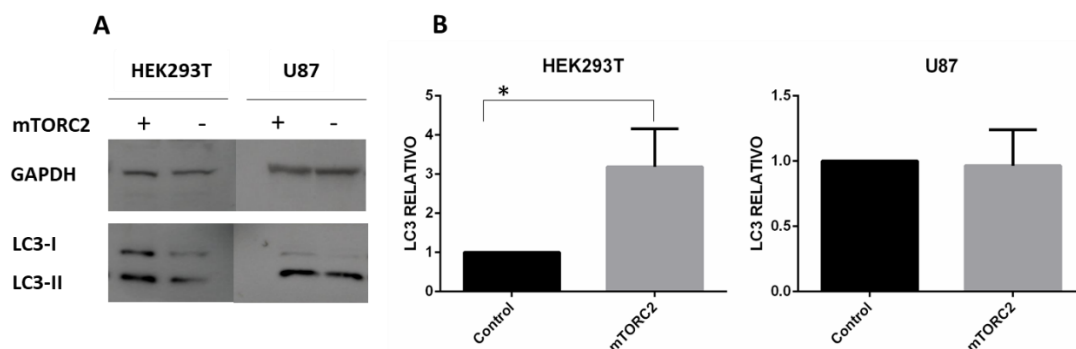
**Figura 5.5. Viabilidad celular.** Representación de la viabilidad de las líneas celulares HEK293T y U87 en ausencia y presencia del complejo mTORC2 exógeno en su interior. Los datos son representados por la media  $\pm$  SEM **\*\***  $p < 0.05$  vs Control (t-student test).

### 5.2.5. Autofagia y apoptosis

Uno de los mecanismos relacionados con la viabilidad celular en los que el complejo mTORC2 está implicado, es el proceso de la apoptosis. Este proceso es inhibido directamente por el complejo mTORC2, mientras que el proceso de autofagia se encuentra inhibido indirectamente por el complejo mTORC2 a través de la activación del complejo mTORC1. Considerando la inclusión del complejo mTORC2 en el interior celular de ambas líneas, se analizó si se producían los procesos de autofagia y apoptosis en presencia de mTORC2 exógeno.

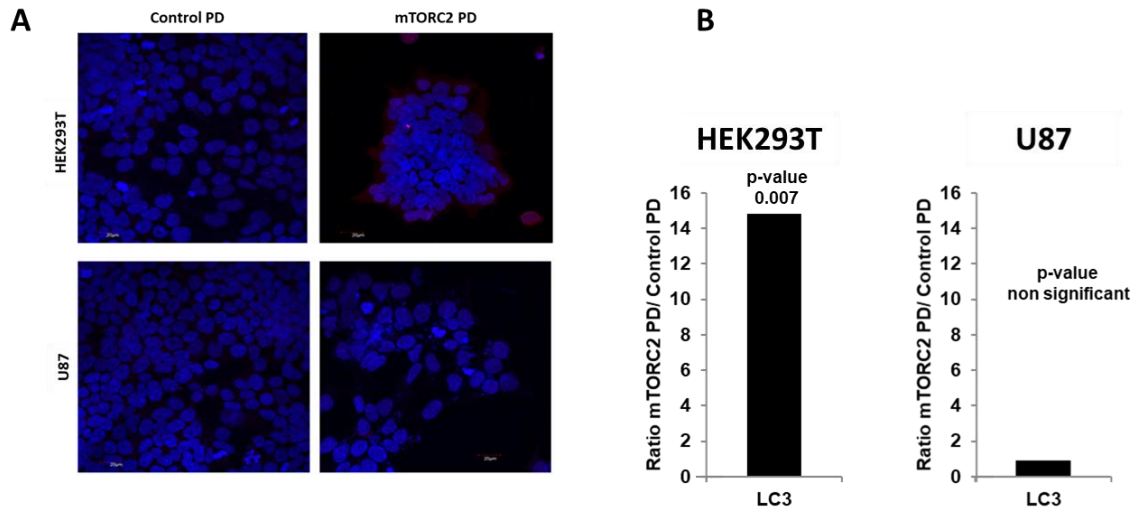
Para ello, tras la introducción del complejo mTORC2 en el interior de las células, se realizó un ensayo de inmunodetección de la proteína LC3 y la caspasa 3 mediante la técnica de Western blot. LC3 se trata de una proteína que forma parte de los autofagosomas que se forman durante el proceso de autofagia; mientras que la caspasa 3 es una molécula clave en la ruta que desencadena el proceso de apoptosis. Tras la inmunodetección de ambas proteínas, solo para el caso de LC3 se detectó señal.

El resultado muestra un aumento significativo para el caso de las HEK293T, donde los niveles de expresión de LC3-II aumentan en presencia del complejo mTORC2 exógeno ( $p$ -valor = 0,0180 < 0,05), mientras que en el caso de las células U87 no se evidencia cambios en los niveles de expresión de LC3-II ( $p$ -valor = 0,8741 > 0,05) (Figura 5.6).



**Figura 5.6. Autofagia y apoptosis.** A) Western blot anti-LC3 y GAPDH B) Representación de la densidad relativa de LC3-II normalizada frente a GAPDH. Los datos son representados por la media  $\pm$  SEM **\***  $p < 0.05$  vs Control (t-student test).

Estos datos fueron corroborados mediante la técnica de microscopía confocal y citometría de flujo. Una vez más, solo las células HEK293T muestran un aumento de los niveles de expresión de LC3 tras introducir el complejo mTORC2, obteniendo un valor significativo mediante citometría de flujo ( $p$ -valor = 0,007 > 0,05) (Figura 5.7).



**Figura 5.7. Autofagia y apoptosis. A)** Detección de LC3 mediante microscopia confocal en células HEK293T y U87, tratadas con el complejo mTORC2 exógeno y no tratadas. **B)** Análisis de LC3 mediante citometría de flujo en células HEK293T y U87 tratadas y no tratadas con el complejo mTORC2 exógeno.

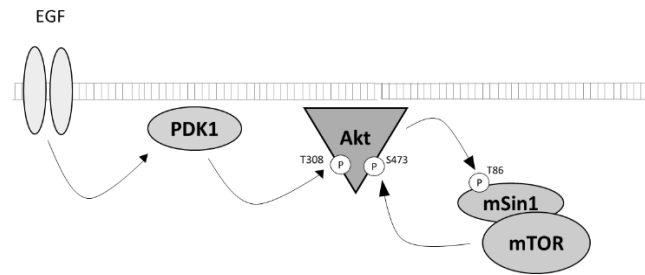
### 5.3. DISCUSIÓN

**Los niveles de fosforilación en la S473 de Akt aumentan tras integrar el complejo purificado mTORC2 en el interior de las células HEK293T.**

Uno de los objetivos de esta tesis es el estudio de la integridad funcional del complejo mTORC2 que ha sido purificado. Para ello, el complejo mTORC2 fue integrado en células HEK293T y U87 para, posteriormente cuantificar los niveles de fosforilación de Akt en el residuo S473, por ser uno de los principales sustratos del complejo.

Akt es una serina/treonina quinasa activada por un mecanismo dual que requiere su translocación a la membrana plasmática y su fosforilación. Akt contiene un dominio PH el cual tiene una gran afinidad por PIP3. Dicha unión es la responsable de la translocación de Akt hacia la membrana plasmática y su fosforilación en T308 mediada por la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1). Sin embargo, es necesaria una segunda fosforilación de Akt para ser activada completamente. El complejo mTORC2 es responsable de esta segunda fosforilación.

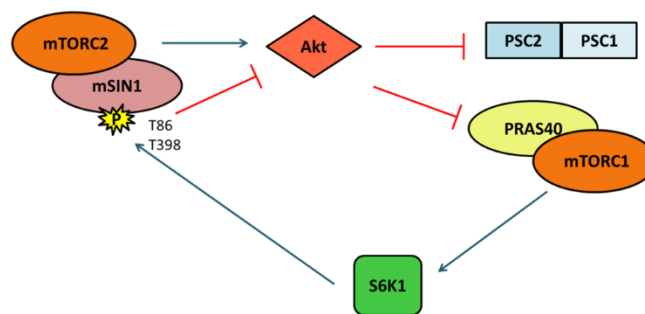
A su vez, Sean J. Humphrey y colaboradores propusieron un modelo de activación del complejo mTORC2 en el cual la actividad quinasa de pAkt actuaba sobre el residuo T86 de mSIN1, activando el complejo y permitiendo la consecutiva fosforilación de Akt en el residuo S473 potenciando y estabilizando su actividad quinasa (Figura 5.7) [194].



**Figura 5.7.** Modelo de la activación de mTORC2 dependiente del factor de crecimiento EGF mediado por la fosforilación de mSin1 por Akt.

En esta línea, se ha descrito la existencia de esta retroalimentación positiva entre el complejo mTORC2 Y Akt en adipocitos 3T3-L1 y células HEK293 [194], además la fosforilación en el residuo T86 de mSIN1 a través de Akt regula positivamente la señalización del complejo mTORC2 *in vivo* y su actividad quínasa *in vitro* [195].

Por el contrario, Liu y colaboradores confirman la existencia de una regulación negativa de mTORC2, que asegura que no ocurra una hiperactivación de la oncoproteína Akt facilitando el proceso de tumorigénesis. En este estudio se observó que la fosforilación en el residuo T86 de mSIN1 se correlaciona positivamente con la actividad de S6K1, sustrato de mTORC1, pero a su vez es inversa a la fosforilación de Akt, indicando así que la fosforilación de mSIN1 a través del sustrato S6K1, podría actuar como un regulador fisiológico negativo de la fosforilación de Akt. De este modo, se describe la existencia de una retroalimentación negativa entre ambos complejos, de tal forma que el sustrato de mTORC1, S6K1, frente a una sobreactivación, produce la fosforilación de los residuos T86 y T398 de la subunidad mSIN1 del complejo mTORC2. Estas fosforilaciones comprometen la integridad del complejo mTORC2 y por lo tanto su actividad quínasa (Figura 5.8) [91].



**Figura 5.8. Retroalimentación negativa.** La fosforilación de mSIN1 deteriora la integridad del complejo mTORC2 e inhibe la señalización Akt corriente abajo suprimiendo la tumorigénesis.

Acorde con los trabajos descritos, tras introducir el complejo mTORC2 exógeno en el interior celular, estas presentan un aumento en los niveles de Akt fosforilada en el residuo S473. Aumento que solo es significativo en el caso de las células HEK293T. Las células HEK293T son

células embrionarias de riñón humano en las que la ruta de señalización PI3K/mTOR/Akt no presenta ninguna desregulación, por lo que los niveles de fosforilación de Akt en células control presentan un patrón normal y este resulta significativamente alterado al incrementar los niveles del complejo mTORC2. Las células U87, por el contrario, son células de glioblastoma (tumor más común y maligno entre las neoplasias de la glía) donde existen altos niveles de Akt fosforilada como consecuencia de posibles alteraciones en las moléculas reguladoras de la activación de Akt [196-199]. En el caso tanto de PDK1 como del complejo mTORC2 existen evidencias de que ambos están sobreactivados en pacientes con glioblastoma multiforme. A pesar de que no existen referencias de mutaciones que afectan a la activación de PDK1 y mTORC2 si se ha demostrado que son dianas clave con alto potencial terapéutico [199].

En este sentido, se ha descrito también que la sobreexpresión de Rictor promueve la activación del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) y; por lo tanto, la activación de la proliferación celular, indicando que Rictor participa en la activación feedback de Akt inducida por rapamicina [200]. En un estudio llevado a cabo en células gástricas cancerígenas, células SGC7901, donde existe una sobreexpresión de Rictor, se ha demostrado la existencia de sinergias entre la inhibición del complejo mTORC2 y la inhibición del complejo mTORC1. El sustrato de mTORC1, S6K1, es significativamente inhibido cuando las células SGC7901 son tratadas con rapamicina, sin embargo, los niveles de fosforilación de Akt en S473 son aumentados ya que la inhibición del complejo mTORC1 mediante la rapamicina perjudica la actividad de S6K1 sobre IGF-1R y Rictor permitiendo una total activación de Akt debida a las fosforilaciones en los residuos T308 y S473 de la misma [201].

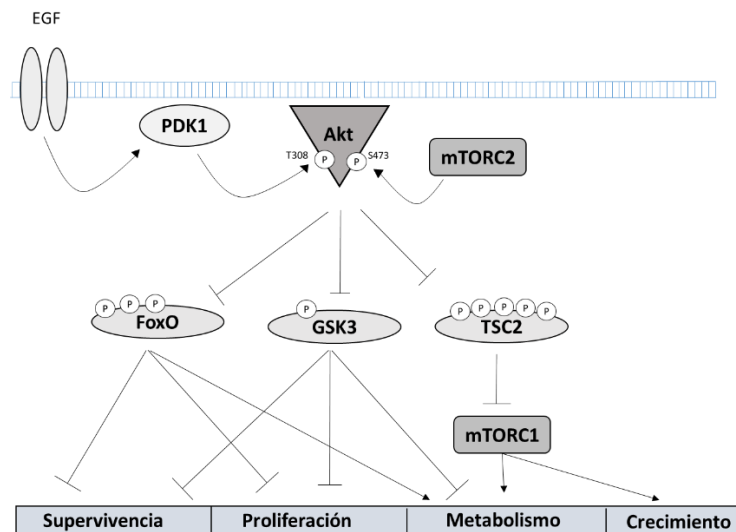
#### **Viabilidad celular resulta comprometida tras un aumento de los niveles de pAkt en las células HEK293T.**

La activación de Akt a través del complejo mTORC2 promueve la supervivencia celular, proliferación y crecimiento celular a través de numerosos efectores. Entre estos efectores, se encuentran los factores de transcripción FoxO. La activación de Akt permite la translocación de las proteínas FoxO fuera del núcleo atenuando su actividad transcripcional [202, 203]. Akt media esta regulación a través de la fosforilación directa de tres residuos conservados en los factores de transcripción (FoxO1, 3,4 y 6) localizados en las regiones: el extremo N-terminal, la secuencia de localización celular y la secuencia de exportación celular. Estas fosforilaciones son reconocidas por la familia de proteínas 14-3-3, las cuales facilitan el transporte de las proteínas FoxO fosforiladas al citosol. Debido a que los factores de transcripción FoxO por los responsable de la inducción de la apoptosis, Akt a través de la fosforilación de los estos inhiben la inducción de este proceso [204, 205].

La serina/treonina quinasa GSK3 fue el primer sustrato en identificarse de Akt [206]. GSK3, generalmente, se encuentra activa en ausencia de estímulos exógenos y es inactivada tras la estimulación de la proliferación celular con factores de crecimiento [206]. Akt es responsable de una fosforilación en el extremo amino terminal de GSK3 creando un pseudosustrato intramolecular que ocluye el sitio de unión para los sustratos del mismo; y por lo tanto inhibiendo la actividad de GSK3 [207-209]. GSK3 fosforila y activa diferentes sustratos envueltos en procesos de supervivencia celular, estos sustratos son responsables de la fosforilación que es reconocida por la ligasa ubiquitina E3 y consecuentemente sufrirán la degradación por parte del proteosoma. Estos incluyen MCL-1 [210, 211] y el factor de transcripción c-Myc [212, 213]. GSK3 también participa en la regulación del metabolismo celular a través de la fosforilación e inhibición de enzimas metabólicas [214], o indirectamente a través de la inhibición de factores de transcripción que regulan el metabolismo [215].

Por otro lado, la fosforilación de Akt también promueve el crecimiento celular mediante la activación del complejo celular mTORC1, el cual estimula los procesos biosintéticos subyacentes en el crecimiento [67]. El principal mecanismo por el cual Akt activa al complejo mTORC1 es a través de la fosforilación e inhibición del complejo TSC2. El complejo TSC actúa como una GTPasa inhibiendo a la proteína Rheb y por consiguiente inhibiendo el complejo mTORC1. Sin embargo, la inhibición del complejo TSC a través de Akt permite la activación del complejo mTORC1 mediante la proteína Rheb [216-218]. La activación de Akt permite a su vez la activación del complejo mTORC1 a través de la inhibición de TSC2. La subunidad PRAS40 del complejo mTORC1 es otro sustrato de Akt que está envuelto en la regulación del complejo mTORC1. La actividad quinasa de Akt fosforila a PRAS40 en el residuo T246 y se libera del complejo permitiendo la activación del mismo [19, 20]. La activación de mTORC1 promueve una variedad de procesos anabólicos, tales como la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, mientras que inhibe procesos catabólicos como la autofagia [67].

Por consiguiente, la activación de la Akt juega un papel importante en la proliferación y supervivencia celular actuando como enlace de señalización para ambos complejos, mTORC1 y mTORC2 [219]. Por este motivo, se llevó a cabo un estudio de la viabilidad en las células HEK293T y U87 con el objetivo de averiguar cómo afectaba la integración del complejo mTORC2 exógeno en el interior de las células. Los resultados obtenidos tras tratar a las células con el reactivo MTT, muestran que solo en caso de las células HEK293T, las cuales presentan un aumento significativo de fosforilación de Akt en la S473 tras introducir el complejo mTORC2, se observa una disminución significativamente mayor en la viabilidad y supervivencia celular. En términos generales, la activación de Akt inhibe los procesos de muerte celular y anabolismo como son la apoptosis y autofagia (Figura 5.8) [130]. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que, a pesar de la sobreactivación de la Akt como consecuencia de la actividad del complejo mTORC2 exógeno, en las células HEK293T es posible que se esté llevando a cabo alguno de estos procesos de muerte celular.



**Figura 5.8.** Esquema de la Implicaciones de la activación de Akt en los los complejos mTORC1 y mTORC2 están implicados.

### **El proceso de autofagia como mecanismo protector ante los altos niveles de pAkt en la S473 en las células HEK293T.**

Como consecuencia del resultado obtenido tras los estudios de viabilidad donde, solo en el caso de las células HEK293T en presencia del complejo mTORC2 exógeno, dicha viabilidad se ve comprometida como respuesta al aumento de los niveles de fosforilación de Akt. Puesto que la apoptosis y la autofagia son procesos regulados por la activación de Akt que comprometen la viabilidad celular, se llevaron a cabo estudios para determinar qué proceso se podría estar produciendo como consecuencia de la integración del complejo mTORC2 exógeno.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada inhibida por la actividad quinasa del complejo mTORC2 fosforilando y activando a Akt. La proteína Akt activada promueve la translocación de los factores de transcripción FoxO fuera del núcleo impidiendo la transcripción de los efectores de la apoptosis [202]. Para estudiar la implicación de la apoptosis en la viabilidad celular de las células HEK293T, se llevó a cabo la inmunodetección por Western blot de la caspasa-3, molécula clave en la ruta de inducción de la apoptosis [220]. En ningún caso se detectó la presencia de la caspasa-3, lo que podría indicar que el proceso de apoptosis podría estar inhibido debido a la elevada activación de la Akt.

Por otro lado, la autofagia es un proceso de degradación celular que juega un papel importante en el suministro de energía, particularmente durante el desarrollo y en respuesta al estrés de nutrientes. Este proceso es llevado a cabo por vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas que se fusionan con el compartimento lítico, permitiendo la degradación de los componentes celulares y su reciclaje [221, 222]. Este mecanismo intracelular está conservado desde las levaduras hasta organismos multicelulares. Su alteración está implicada en muchas enfermedades, incluyendo miopatías, neurodegeneración y cáncer, así como la resistencia a las infecciones de patógenos [223-225]. A nivel molecular, la autofagia juega un papel pro-supervivencia y pro-muerte mediante la regulación de diferentes rutas de señalización. Algunos estudios han demostrado que la inhibición de mTORC1 incrementa los niveles de autofagia, mientras que la estimulación del mismo reduce este proceso [226]. También mTORC2 tiene un papel indirecto en la autofagia inhibiendo la misma a través de la activación de mTORC1. La ruta de señalización de PI3K activa mTORC2, el cual fosforila a Akt en dos residuos diferentes (S473 y T308), permitiendo la activación de mTORC1 a través de la vía PI3K [87, 103]. El sustrato activado de mTORC2, Akt (S473) actúa como una quinasa fosforilando el factor de transcripción FoxO3a e inhibiendo su actividad. Otros estudios han identificado a FoxO3a como un factor responsable de la transcripción de un conjunto de genes relacionados con la autofagia. Sin embargo, aún se desconoce si existe una acción directa del complejo mTORC2 sobre la autofagia [227].

Para determinar que el proceso de autofagia era el responsable de la disminución de la viabilidad de las células HEK293T, se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína específica de este, la proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 (LC3) tras la inclusión del complejo mTORC2 exógeno en el interior de células HEK293T y U87. La forma conjugada lipídica de LC3, LC3-II, se localiza en las membranas de los autofagosomas. Esta puede ser separada de la forma monoconjugada (LC3-I) mediante electroforesis e identificado mediante inmunodetección [228]. Por lo tanto, se midieron los niveles de expresión de LC3 a través de su inmunodetección y su posterior análisis por las técnicas de Western blot, microscopía confocal y citometría de flujo. Los resultados presentados en este trabajo muestran un aumento de los niveles de expresión de LC3-II, lo que podría indicar que el proceso de autofagia se encuentra activado, a pesar de que existe un aumento de los niveles del complejo mTORC2 y por consiguiente de pAkt.

Este hecho solo ocurre en las células HEK293T donde se ha introducido el complejo mTORC2 y los niveles de fosforilación en el residuo S473 de Akt también se encuentran aumentados en consecuencia de la actividad quinasa del complejo mTORC2 exógeno. El proceso de autofagia presenta un sistema complejo de señalización y muchos estudios indican que la ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR está íntimamente relacionada con este proceso. La Akt fosforilada a través del complejo mTORC2 impide que el complejo TSC actúe inhibiendo al complejo mTORC1. mTORC1, a su vez, promueve la inhibición de la autofagia a través del complejo ULK1 (proteína quinasa tipo uridina 1) [229, 230]. De esta manera, en ausencia de nutrientes, los niveles de Akt fosforilada disminuyen favoreciendo la inhibición del complejo mTORC1 y la activación del proceso de autofagia [231, 232]. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que se ha activado el proceso de autofagia a pesar del aumento en los niveles de fosforilación de Akt. El proceso de autofagia generalmente ejerce efectos sobreprotectores frente al estrés celular y es mediado por diferentes respuestas, incluyendo la degradación de proteínas citosólicas y la modulación de la muerte celular [233, 234]. Ciertos estudios llevados a cabo para conocer el papel protector del complejo mTORC2 frente a la muerte celular tubular inducida por cisplatino y la lesión renal aguda, determinaron que una deficiencia de Rictor, componente importante del complejo mTORC2, podría reducir la inducción de autofagia, ya que la expresión de Atg-5 (del inglés, Autophagy related 5) y LC3II y el número de autofagosomas fueron significativamente disminuidos en células pretratadas con shRNA para el gen de Rictor [235]. Acorde con estos estudios, Xu D. y colaboradores coinciden en que una deficiencia de Rictor reduce la inducción del proceso de autofagia en el daño por isquemia reperusión (I/R) hepática [236].



CAPÍTULO III:  
ARPOXIMACIÓN ESTRUCTURAL  
DEL COMPLEJO mTORC2





## 6. APROXIMACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO mTORC2

### 6.1. INTRODUCCIÓN

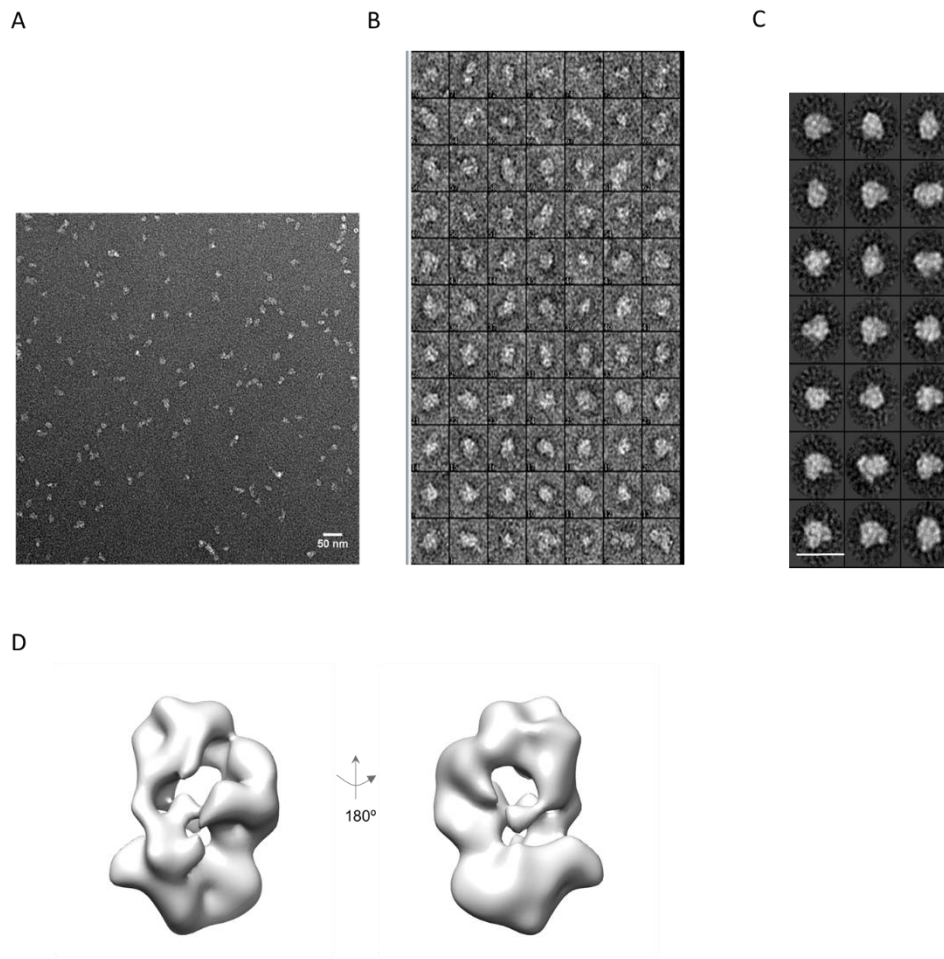
El complejo mTORC2 juega un papel importante y esencial en la regulación de la proliferación celular a través de la fosforilación de miembros de la familia de las quinasas: Akt, PKC y SGK1. Por lo tanto, la inhibición del complejo es una diana terapéutica contra distintos tipos de cáncer y alteraciones. Conociendo la estructura del complejo mTORC2, se puede diseñar inhibidores específicos del mismo para impedir la interacción entre sus subunidades o la unión del sustrato al dominio catalítico del complejo. De ahí, la importancia del estudio estructural del complejo mTORC2.

La estructura tridimensional del complejo mTORC1 ha sido ampliamente estudiada [76, 237-239]. Recientemente, Yang y colaboradores han resuelto la estructura del complejo mTORC1 a resolución atómica, además de revelar el mecanismo de activación mediante Rheb y su inhibición mediante PRAS40 [240]. La estructura del complejo TORC2 de *S. cerevisiae* primero se resolvió mediante tinción negativa, y posteriormente a alta resolución mediante criomicroscopía [241-243]. La estructura del complejo mTORC2 ha permanecido desconocida hasta que en 2018, Chen y otros autores resolvieron la estructura a una resolución mayor, 4.9Å, por criomicroscopía [142]. Dada la inexistencia de estos estudios hasta el momento, la caracterización estructural tras la purificación del complejo mTORC2 constituye uno de los objetivos de este trabajo de investigación.

### 6.2. RESULTADOS

#### 6.2.1. Microscopía electrónica de transmisión

Tras la purificación del complejo mTORC2 y la estabilización de sus interacciones, se seleccionaron las fracciones correspondientes al máximo de absorbancia a 280nm para observar las muestras mediante microscopía electrónica. Previamente, se llevó a cabo experimentos de tinción negativa de las muestras con el objetivo de analizar el estado de las mismas. Para ello, se montaron unas rejillas de cobre-paladio (Gilder Grids) sobre las que se colocaron una película de carbono para favorecer la adsorción de la muestra del complejo mTORC2. Tras la incubación de la muestra con la rejilla durante dos minutos, se llevó a cabo la tinción de las mismas con acetato de uranilo al 1-2% (p/v). Finalmente, se tomaron imágenes con un microscopio FEI Tecnai T12 (Figura 6.1A) donde se visualizaron partículas individuales con una morfología más o menos homogénea. Estas imágenes de partículas individuales de las micografías fueron seleccionadas (Figura 6.1B) y clasificadas en 2D libres de referencia (Figura 6.1C). Las imágenes obtenidas siguen dos patrones diferentes según la morfología: vistas laterales, las cuales presentan una morfología globular y vistas frontales en las que se distinguen dos protuberancias perpendiculares entre sí. Estas medias en 2D permitieron la reconstrucción de un modelo tridimensional a baja resolución del complejo mTORC2 (Figura 6.1D) el cual presenta una forma globular con una cavidad irregular en su interior. Teniendo en cuenta los resultados previos de oligomerización del complejo mTORC2, este modelo 3D sería el resultado de la unión de dos heterotetrámeros del complejo mTORC2 formado cada uno de ellos por mTOR, mLST8, Rictor y mSIN1. Este modelo tridimensional, posteriormente, serviría como modelo de referencia para refinar y clasificar en 3D las imágenes procedentes de la criomicroscopía.

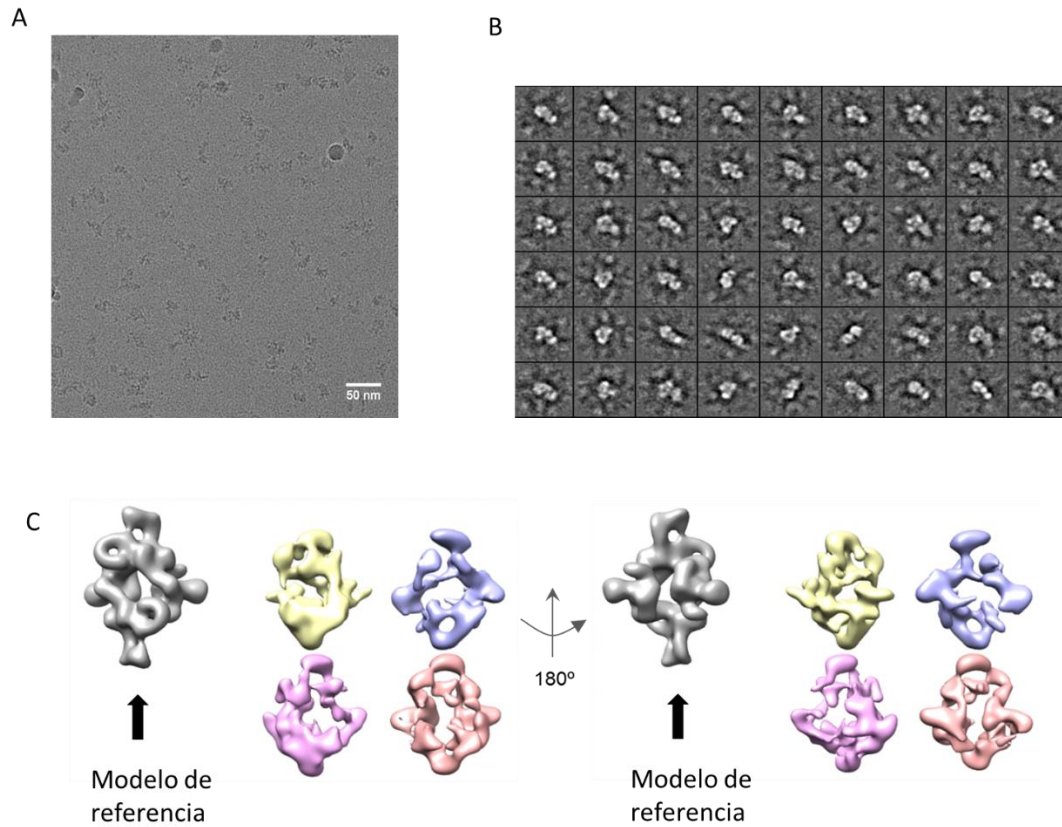


**Figura 6.1. Caracterización del complejo mTORC2 purificado mediante microscopía electrónica.** **A)** Campo de microscopía electrónica representativo obtenido para el complejo mTORC2 purificado mediante cromatografía de afinidad y estabilizado mediante la técnica GraFix. Barra de escala 50nm. **B)** Selección de partículas individuales del complejo mTORC2. **C)** Medias 2D libres de referencia obtenidas para el complejo mTORC2 purificado. Barra de escala 17nm. **D)** Modelo tridimensional del complejo mTORC2 por tinción negativa.

### 6.2.3. Crio-microscopía electrónica del complejo mTORC2

Una vez visualizadas las muestras del complejo mTORC2 purificado mediante microscopía electrónica por tinción negativa y corroborado la homogeneidad e integridad de las mismas, estas fueron vitrificadas para su posterior visualización mediante crio-microscopía.

Las imágenes de crio-microscopía electrónica fueron adquiridas con el microscopio TITAN que cuenta con una cámara Gatan K2 Summit (K2 Summit Direct Detector camera). Una vez adquiridas, se llevó a cabo su procesamiento con las distintas aproximaciones en función de la calidad y características de las mismas y utilizando como referencia el modelo tridimensional del complejo mTORC1.



**Figura 6.2 Caracterización del complejo mTORC2 purificado mediante crio-microscopía. A)** Campo de crio-microscopía representativo obtenido para el complejo mTORC2 purificado mediante cromatografía de afinidad y estabilizado mediante la técnica GraFix. Barra de escala 50nm. **B)** Medias 2D libres de referencia obtenidas para el complejo mTORC2 purificado. **D)** Modelo tridimensional del complejo mTORC2 mediante crio-microscopía.

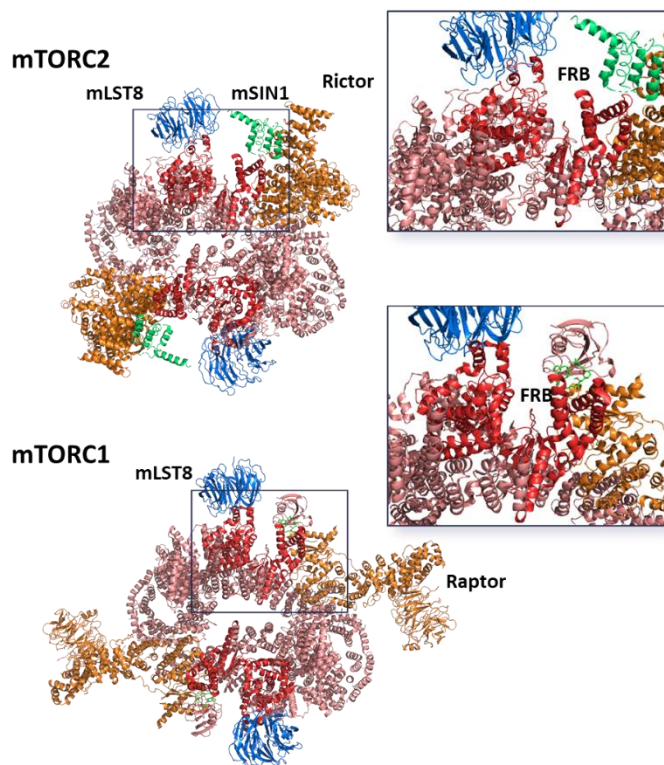
### 6.3. DISCUSIÓN

El receptor de rapamicina se encuentra altamente conservado en eucariotas, desde las levaduras hasta humanos, formando parte de dos complejos funcional y estructuralmente diferentes: mTORC1 y mTORC2 [6, 189]. Ambos complejos comparten dos subunidades que conforman el núcleo del mismo: mTOR y mLST8 [14]. Mientras que Raptor es un componente específico del complejo mTORC1, Rictor junto con mSIN1 son específicos del complejo mTORC2 [13, 15, 86, 112].

Las funciones de ambos complejos han sido ampliamente estudiadas durante las dos últimas décadas. Sin embargo, la información estructural del complejo mTORC1 y mTORC2 ha estado limitada a una baja resolución. Dado que ambos complejos, mTORC1 y mTORC2 presentan pesos moleculares superiores a 1 MDa, obtener muestras altamente purificadas y homogéneas resulta muy complicado.

La primera estructura del complejo TORC2 de *S. cerevisiae* (scTORC2) se resolvió mediante tinción negativa y crio-microscopía a una resolución de  $\sim 26$  Å y 7.9 Å, respectivamente [241, 242]. Hasta hace relativamente poco, no se había logrado resolver la estructura del complejo mTORC2 de la especie humana; y dada su importancia para el diseño de inhibidores del mismo, uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación se centra en la caracterización

estructural del complejo mTORC2 a través de la técnica de crio-microscopía electrónica. Para ello se optimizó la purificación del complejo con el fin de obtener una muestra íntegra y homogénea. Tras la purificación del complejo mediante cromatografía de afinidad y su estabilización mediante ultracentrifugación en gradiente, las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa y crio-microscopía. En las microfotografías obtenidas tras tinción negativa se observa una muestra homogénea donde se seleccionaron imágenes de partículas individuales que se utilizaron para una clasificación en 2D libre de referencia. Las imágenes obtenidas podrían representar diferentes vistas del complejo ya que se distinguen dos patrones principalmente: vistas laterales, las cuales presentan una morfología globular y vistas frontales en las que se distinguen dos protuberancias perpendiculares entre sí. En el modelo tridimensional obtenido a partir de las imágenes en 2D, se observa un hueco central alrededor del cual se disponen las distintas subunidades de dos heterodímeros del complejo mTORC2 ya que las muestras procedentes de la técnica de GraFix se corresponden con la forma dimerica del complejo. Esta primera aproximación estructural del complejo mTORC2 coincide con los resultados publicados recientemente donde presenta la estructura de dicho complejo por crio-microscopía a resoluciones 4.9 Å y 7.4 Å respectivamente [143, 244]. En estos trabajos se confirma que el complejo mTORC2 se encuentra formando un dímero simétrico. Este dímero es el resultado de la unión de dos heterotetrámeros, conteniendo cada uno de ellos una copia de cada subunidad que conforma el complejo mTORC2 (mTOR-Rictor-mLST8-mSIN1). La unión de ambas copias de la subunidad mTOR actúa como esqueleto central dejando un hueco romboidal entre ellas. Dicho hueco central es más estrecho en el caso del complejo mTORC2 tal y como se describe en el trabajo de Chen y colaboradores [142]. Al comparar la estructura tridimensional de ambos complejos, mTORC1 y mTORC2 (Figura 6.3), se observa como la región FRB del complejo mTORC2 queda inaccesible para la rapamicina debido a la unión de mSIN1 y Rictor.



**Figura 6.3.** Estructura tridimensional del complejo mTORC2 y mTORC1 con vista ampliada de la región catalítica de la subunidad mTOR.

# DISCUSIÓN GENERAL





## 7. DISCUSIÓN GENERAL.

El receptor de rampamicina en mamíferos mTOR forma parte de dos complejos estructural y funcionalmente diferentes: mTORC1 y mTORC2 [5-7]. Como objetivo principal de este trabajo de investigación se propuso la purificación del complejo de mamífero mTORC2 y a continuación llevar a cabo su caracterización funcional y una aproximación estructural.

El complejo mTORC2 presenta un alto peso molecular, aspecto que dificultaba el proceso de purificación y la estabilización de su integridad. Para lograr el primer objetivo propuesto se procedió a establecer una línea celular estable utilizando células de mamífero HEK293T sobreexpresando la subunidad específica mSIN1 del complejo mTORC2. En el tampón de lisis se utilizó CHAPS como detergente con el objetivo de mantener la integridad del complejo [190]. Después de varias cromatografías (afinidad y exclusión molecular) se consiguió aparentemente purificar el complejo mTORC2. Se realizó una inmunodetección de las principales subunidades del complejo mTORC2: mTOR, Rictor, mLST8 y mSIN1 corroborando que dichas subunidades proteicas estaban presentes y que el complejo se había purificado satisfactoriamente. Con los resultados obtenidos se confirmó que el complejo mTORC2 se encontraba formando un dímero, acorde con estudios previos obtenidos para el caso del complejo TORC2 de levaduras y estudios estructurales recientes del complejo mTORC2 donde ponen de manifiesto que este complejo forma dímeros a través de la interacción de las repeticiones HEAT de la principal subunidad mTOR [142, 187]. Posteriormente, el complejo mTORC2 una vez purificado se estudió mediante microscopía electrónica por tinción negativa. Las imágenes mostraban formaciones de agregados resultando ser una muestra no homogénea por lo que se sospechó que la integridad del complejo mTORC2 no era estable. Por esta razón se decidió llevar a cabo una ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol (GraFix) con un agente de entrecruzamiento (glutaraldehído) para preservar su integridad. La fracción correspondiente al máximo de absorbancia a 280 nm se sometió de nuevo a su caracterización mediante microscopía electrónica y aparentemente la muestra se mostraba más homogénea. Con el objetivo de confirmar estos resultados, se llevaron a cabo geles nativos (Blue Native) y a continuación se realizó una inmunodetección de las subunidades del complejo mTORC2. Los resultados mostraron una banda superior al marcador de peso molecular correspondiente a 1.236 kDa. Estos datos confirman de nuevo que el complejo mTORC2 se encontraba en su formando un dímero tal y como se había descrito previamente [187].

Akt es uno de los principales sustratos del complejo mTORC2. Este complejo media la fosforilación de Akt en la S473 [192]. Por este motivo la funcionalidad del complejo mTORC2 se estudió en función de los niveles de fosforilación de la S473 de la Akt mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. El ensayo *in vitro* mostró que el complejo mTORC2 mantiene íntegra su actividad quinasa. Por otro lado, al introducir el complejo mTORC2 en el interior de las líneas celulares HEK293T y U87, solo se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de Akt en la S473 en el caso de las células HEK293T. Las células U87 son células del glioblastoma multiforme humano que ya presentan una alteración en la ruta de señalización PI3K, en la que los niveles de fosforilación de Akt ya se encuentran elevados. Es posible que la actividad quinasa del complejo al ser insertado en el interior de la línea celular U87 sea imperceptible. Sin embargo, las células HEK293T son células embrionarias de riñón humano que no presentan una hiperactivación en la vía de señalización PI3K. Por lo tanto, en el caso de las células HEK293T, el incremento en los niveles de fosforilación de Akt en la S473 se podría asociar a la actividad del complejo mTORC2 exógeno indicando una vez más, que el complejo mTORC2 mantiene la integridad de su actividad quinasa.

Dado que el complejo mTORC2 tiene un importante papel en el crecimiento y la proliferación celular, se estudió la viabilidad de ambas líneas celulares mediante un ensayo de MTT. Mientras que las células HEK293T se mostraba un descenso en su viabilidad cuando se introducía el complejo mTORC2, las células U87 no presentaban cambio significativo.

El complejo mTORC2, a través de la fosforilación de Akt en la S473, tiene un papel importante en la supervivencia celular, proliferación y crecimiento celular a través de numerosos efectores y procesos entre los que se encuentra la apoptosis. La activación de Akt permite la translocación de las proteínas FoxO fuera del núcleo atenuando su actividad transcripcional e inhibiendo la expresión de los factores de la apoptosis [202, 203]. Dado este papel inhibitorio del complejo mTORC2 en la apoptosis a través de la activación de Akt, se llevó a cabo la inmunodetección de la caspasa 3 para evaluar si el proceso de la apoptosis era el responsable de la disminución de la viabilidad de las células HEK293T. Sin embargo, los resultados mostraban que no existía activación del proceso de apoptosis. Hecho acorde con lo esperado ya que, como se ha mencionado anteriormente, las células HEK293T con el complejo mTORC2 exógeno en su interior, presenta una hiperactivación de la Akt, y la activación de Akt promueve la disminución de la actividad de las proteínas FoxO y por tanto, la inhibición de la apoptosis.

La autofagia es otro proceso que puede comprometer la viabilidad celular. Dicho proceso está directamente regulado por el complejo mTORC1 cuya activación es mediada por pAkt. Esto sitúa al complejo mTORC2 como mediador indirecto del proceso de autofagia. Por esta razón, se evaluaron los niveles de expresión de LC3-II ya que es una molécula que forma parte del autofagosoma y su presencia es indicativa de que el proceso de autofagia se encuentra activo. La línea celular HEK293T presentaba un aumento significativo de los niveles de expresión de LC3-II tras introducir el complejo mTORC2, indicando que el proceso de autofagia se encontraba activo. Sin embargo, en cuanto a la línea celular U87, los resultados mostraron que no se estaba dando una activación en el proceso de autofagia dado que no existía un aumento en los niveles de expresión de LC3-II. Según los trabajos descritos, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son contradictorios a lo que cabría esperar, puesto que un aumento en la activación de Akt implicaría la activación del complejo mTORC1 y por consiguiente la inhibición de la apoptosis. Sin embargo, se ha descrito que una deficiencia de Rictor, componente con un papel importante en la actividad quinasa del complejo mTORC2, está asociado a una disminución del proceso de autofagia [235, 236]. Aún se desconoce si existe una regulación directa del complejo mTORC2 sobre el proceso de autofagia; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestran como, a pesar del incremento en los niveles de pAkt tiene lugar el proceso de autofagia. Este proceso podría actuar como respuesta defensiva ante la hiperactivación de Akt causada por el complejo mTORC2 exógeno. Además, en la línea celular U87 este mecanismo de protección podría estar alterado, ya que estas células sufren una hiperactivación en la vía de señalización de PI3K sin ocurrir el proceso de autofagia como respuesta protectora.

Por último, debido al importante papel del complejo mTORC2 en la regulación de la proliferación celular y supervivencia celular, uno de los principales objetivos de esta investigación fue el estudio estructural del complejo mTORC2. Sin embargo, la estructura del complejo mTORC2 se resolvió recientemente por Chen y colaboradores quienes han resuelto la estructura tridimensional del complejo mTORC2 mediante criomicroscopía a una resolución de 4.9Å [142].

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestran dos patrones en las imágenes en 2D procedentes de la microscopía electrónica de transmisión que se podrían corresponder con dos vistas diferentes del complejo: vistas laterales las cuales presentan una

morfología globular y vistas frontales en las que se distingue dos protuberancias perpendiculares entre sí. Por otro lado, la reconstrucción tridimensional del complejo mTORC2 deja ver una cavidad central alrededor de la cual se dispondría las subunidades del dímero que forma el complejo mTORC2. Además, el modelo tridimensional obtenido muestra que el dominio quinasa de mTOR no queda tan accesible. Estos resultados coinciden con el trabajo, recientemente publicado de Chen y colaboradores, donde describen que la subunidad mSIN1 y Rictor hacen que el dominio FRB de mTOR no sea accesible para la molécula de la rapamicina [142].



**CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

Por lo tanto, tras los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se podría concluir que:

- A pesar de su elevado peso molecular e inestabilidad, el proceso de purificación del complejo mTORC2 ha sido satisfactoriamente optimizado obteniendo muestras del mismo íntegras y homogéneas.
- La caracterización bioquímica y estructural del complejo mTORC2 demuestra que este se encuentra formando dímeros de las cuatro subunidades mTOR, mLST8, Rictor y mSIN1.
- Los ensayos de fosforilación de la S473 de Akt, como principal sustrato del complejo mTORC2, *in vitro* e *in vivo* indican que el complejo mTORC2 mantiene su capacidad catalítica tras el proceso de purificación.
- La línea celular HEK293T, ante la introducción del complejo mTORC2 exógeno en su interior, responde con un aumento significativo de la actividad quinasa del complejo; mientras que este aumento de la actividad quinasa del complejo mTORC2 para la línea celular U87, células tumorales del glioblastoma multiforme, es imperceptible.
- La viabilidad de la línea celular HEK293T se ve comprometida tras la integración del complejo mTORC2 purificado; mientras que en las células U87 no se ve afectada la viabilidad de las células.
- La viabilidad de la línea celular HEK293T se ve afectada debido a que el proceso de autofagia podría presentarse como un posible mecanismo de defensa frente a ese aumento en los niveles de expresión del complejo mTORC2.
- La aproximación estructural del complejo mTORC2 muestra la existencia de una cavidad central como consecuencia de la unión de los dos heterodímeros y alrededor del cual se disponen las subunidades del complejo mTORC2.
- La aproximación tridimensional del complejo mTORC2 muestra una cavidad estrecha debido a la unión de Rictor y mSIN1 y; por lo tanto, como ha sido confirmado anteriormente, la región FRB de mTOR no queda accesible para la rapamicina.



# BIBLIOGRAFÍA





## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Eng, C., S. Sehgal, and C. Vézina, *Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors*. The Journal of antibiotics, 1984. **37**(10): p. 1231-1237.
2. Martel, R., J. Klicius, and S. Galet, *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 1977. **55**(1): p. 48-51.
3. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. Nature reviews Drug discovery, 2009. **8**(8): p. 627.
4. Chung, J., et al., *Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1227-1236.
5. Brown, E.J., et al., *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex*. Nature, 1994. **369**(6483): p. 756.
6. Sabatini, D.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**(1): p. 35-43.
7. Sabers, C.J., et al., *Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(2): p. 815-822.
8. Andrade, M.A. and P. Bork, *HEAT repeats in the Huntington's disease protein*. Nature genetics, 1995. **11**(2): p. 115.
9. Knutson, B.A., *Insights into the domain and repeat architecture of target of rapamycin*. Journal of structural biology, 2010. **170**(2): p. 354-363.
10. Siekierka, J.J., et al., *A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin*. Nature, 1989. **341**(6244): p. 755.
11. Harding, M.W., et al., *A receptor for the immuno-suppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase*. Nature, 1989. **341**(6244): p. 758.
12. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217.
13. Kim, D.-H., et al., *mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery*. Cell, 2002. **110**(2): p. 163-175.
14. Kim, D.-H., et al., *GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR*. Molecular cell, 2003. **11**(4): p. 895-904.
15. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. Cell, 2002. **110**(2): p. 177-189.
16. Nojima, H., 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*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(18): p. 15461-15464.
17. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. Nature reviews Molecular cell biology, 2011. **12**(1): p. 21.
18. Guertin, D.A., et al., *Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCα, but not S6K1*. Developmental cell, 2006. **11**(6): p. 859-871.
19. Sancak, Y., et al., *PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase*. Molecular cell, 2007. **25**(6): p. 903-915.
20. Vander Haar, E., et al., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40*. Nature cell biology, 2007. **9**(3): p. 316.
21. Wang, L., et al., *PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(27): p. 20036-20044.

22. Peterson, T.R., et al., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. Cell, 2009. **137**(5): p. 873-886.
23. Nascimento, E.B. and D.M. Ouwens, *PRAS40: target or modulator of mTORC1 signalling and insulin action?* Archives of physiology and biochemistry, 2009. **115**(4): p. 163-175.
24. Kovacina, K.S., et al., *Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(12): p. 10189-10194.
25. Nascimento, E.B., et al., *Insulin-mediated phosphorylation of the proline-rich Akt substrate PRAS40 is impaired in insulin target tissues of high-fat diet-fed rats*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3221-3228.
26. Fonseca, B.D., et al., *PRAS40 is a mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(34): p. 24514-24524.
27. Oshiro, N., et al., *The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(28): p. 20329-20339.
28. Ekim, B., et al., *mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression*. Molecular and cellular biology, 2011. **31**(14): p. 2787-2801.
29. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nature reviews Molecular cell biology, 2006. **7**(2): p. 85.
30. Nascimento, E.B., et al., *Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1*. Cellular signalling, 2010. **22**(6): p. 961-967.
31. Dey, N., et al., *MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(29): p. 25586-25603.
32. Panic, N., et al., *Single Nucleotide Polymorphisms within the 8Q24 Region are Not Associated with the Risk of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas*. Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases, 2016. **25**(3).
33. Chen, S. and H.E. Hamm, *DEP domains: more than just membrane anchors*. Developmental cell, 2006. **11**(4): p. 436-438.
34. Zhao, Y., X. Xiong, and Y. Sun, *DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF<sup>β</sup>TrCP E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy*. Molecular cell, 2011. **44**(2): p. 304-316.
35. Hodges, A.K., et al., *Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin*. Human molecular genetics, 2001. **10**(25): p. 2899-2905.
36. Garami, A., et al., *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2*. Molecular cell, 2003. **11**(6): p. 1457-1466.
37. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nature cell biology, 2002. **4**(9): p. 648.
38. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
39. Li, R.-J., et al., *Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin*. Elife, 2016. **5**: p. e19360.
40. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Molecular cell, 2008. **30**(2): p. 214-226.
41. Inoki, K., T. Zhu, and K.-L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-590.
42. Shaw, R.J., et al., *The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(10): p. 3329-3335.

43. Brugarolas, J., et al., *Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex*. Genes & development, 2004. **18**(23): p. 2893-2904.
44. Feng, Z., et al., *The regulation of AMPK  $\beta$ 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways*. Cancer research, 2007. **67**(7): p. 3043-3053.
45. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & development, 2004. **18**(16): p. 1926-1945.
46. Gingras, A.-C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. Genes & development, 2001. **15**(7): p. 807-826.
47. Martin, K.A. and J. Blenis, *Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways*. 2002.
48. Raught, B., et al., *Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases*. The EMBO journal, 2004. **23**(8): p. 1761-1769.
49. Yang, H.-S., et al., *The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(1): p. 26-37.
50. Yang, H.-S., et al., *A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(9): p. 3894-3906.
51. Dorrello, N.V., et al., *S6K1-and  $\beta$ TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth*. Science, 2006. **314**(5798): p. 467-471.
52. Richardson, C.J., et al., *SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control*. Current Biology, 2004. **14**(17): p. 1540-1549.
53. Ma, X.M., et al., *SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs*. Cell, 2008. **133**(2): p. 303-313.
54. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance*. 2013, The Company of Biologists Ltd.
55. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(9): p. 1125-1131.
56. Bakan, I. and M. Laplante, *Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation*. Current opinion in lipidology, 2012. **23**(3): p. 226-234.
57. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. Cell metabolism, 2008. **8**(3): p. 224-236.
58. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. **146**(3): p. 408-420.
59. Howell, J.J., et al., *A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism*. 2013, Portland Press Limited.
60. Ben-Sahra, I., et al., *Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1*. Science, 2013: p. 1228792.
61. Robitaille, A.M., et al., *Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis*. Science, 2013. **339**(6125): p. 1320-1323.
62. Ben-Sahra, I., et al., *mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle*. Science, 2016. **351**(6274): p. 728-733.
63. French, J.B., et al., *Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria*. Science, 2016. **351**(6274): p. 733-737.
64. Liu, Y.-C., et al., *Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc*. PloS one, 2008. **3**(7): p. e2722.
65. Ben-Sahra, I. and B.D. Manning, *mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth*. Current opinion in cell biology, 2017. **45**: p. 72-82.

66. Düvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Molecular cell, 2010. **39**(2): p. 171-183.
67. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth, metabolism, and disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
68. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nature cell biology, 2011. **13**(2): p. 132.
69. Martina, J.A., et al., *MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB*. Autophagy, 2012. **8**(6): p. 903-914.
70. Roczniak-Ferguson, A., et al., *The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis*. Sci. Signal., 2012. **5**(228): p. ra42-ra42.
71. Settembre, C., et al., *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB*. The EMBO journal, 2012. **31**(5): p. 1095-1108.
72. Zhao, J., et al., *mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(52): p. 15790-15797.
73. Rousseau, A. and A. Bertolotti, *An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis*. Nature, 2016. **536**(7615): p. 184.
74. Zhang, Y., et al., *Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1*. Nature, 2014. **513**(7518): p. 440.
75. Yip, C.K., et al., *Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition*. Molecular cell, 2010. **38**(5): p. 768-774.
76. Aylett, C.H., et al., *Architecture of human mTOR complex 1*. Science, 2016. **351**(6268): p. 48-52.
77. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Molecular cell, 2002. **10**(3): p. 457-468.
78. Lamming, D.W., et al., *Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity*. Science, 2012. **335**(6076): p. 1638-1643.
79. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. Molecular cell, 2006. **22**(2): p. 159-168.
80. Pearce, L.R., et al., *Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2*. Biochemical Journal, 2007. **405**(3): p. 513-522.
81. Woo, S.-Y., et al., *PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  expression and signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(35): p. 25604-25612.
82. Thedieck, K., et al., *PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis*. PloS one, 2007. **2**(11): p. e1217.
83. Wang, B., et al., *TRAF2 and OTUD7B govern a ubiquitin-dependent switch that regulates mTORC2 signalling*. Nature, 2017. **545**(7654): p. 365.
84. Colicelli, J., et al., *Expression of three mammalian cDNAs that interfere with RAS function in Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(7): p. 2913-2917.
85. Schroder, W., et al., *Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene*. Gene, 2004. **339**: p. 17-23.
86. Frias, M.A., et al., *mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s*. Current Biology, 2006. **16**(18): p. 1865-1870.
87. Oh, W.J., et al., *mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide*. The EMBO journal, 2010. **29**(23): p. 3939-3951.
88. Liu, P., et al., *PtdIns (3, 4, 5) P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex*. Cancer discovery, 2015: p. CD-15-0460.
89. Tatebe, H., et al., *Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit*. Elife, 2017. **6**: p. e19594.

90. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity*. Cell, 2006. **127**(1): p. 125-137.
91. Liu, P., et al., *Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis*. Nature cell biology, 2013. **15**(11): p. 1340.
92. Chen, M.-Y., Y. Long, and P.N. Devreotes, *A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in Dictyostelium*. Genes & Development, 1997. **11**(23): p. 3218-3231.
93. Hilti, N., et al., *Gene ste20 controls amiloride sensitivity and fertility in Schizosaccharomyces pombe*. Current genetics, 1999. **35**(6): p. 585-592.
94. Wedaman, K.P., et al., *Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell, 2003. **14**(3): p. 1204-1220.
95. Stutfeld, E., et al., *Architecture of the human mTORC2 core complex*. Elife, 2018. **7**: p. e33101.
96. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Current biology, 2004. **14**(14): p. 1296-1302.
97. Yang, Q., et al., *Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity*. Genes & development, 2006. **20**(20): p. 2820-2832.
98. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
99. Akcakanat, A., et al., *Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **362**(2): p. 330-333.
100. Johnstone, C.N., et al., *PRR5 encodes a conserved proline-rich protein predominant in kidney: analysis of genomic organization, expression, and mutation status in breast and colorectal carcinomas*. Genomics, 2005. **85**(3): p. 338-351.
101. Pearce, L.R., et al., *Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney*. Biochemical Journal, 2011. **436**(1): p. 169-179.
102. Gan, X., et al., *Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(13): p. 10998-11002.
103. Zinzalla, V., et al., *Activation of mTORC2 by association with the ribosome*. Cell, 2011. **144**(5): p. 757-768.
104. Huang, J., et al., *The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(12): p. 4104-4115.
105. Huang, J., et al., *Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors*. Cancer research, 2009. **69**(15): p. 6107-6114.
106. Saci, A., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter, *Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size*. Molecular cell, 2011. **42**(1): p. 50-61.
107. Yu, Y., et al., *Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1322-1326.
108. Boulbes, D., et al., *Rictor phosphorylation on the Thr-1135 site does not require mammalian target of rapamycin complex 2*. Molecular Cancer Research, 2010: p. 1541-7786. MCR-09-0409.
109. Dibble, C.C., J.M. Asara, and B.D. Manning, *Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1*. Molecular and cellular biology, 2009. **29**(21): p. 5657-5670.

110. Julien, L.-A., et al., *mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling*. Molecular and cellular biology, 2010. **30**(4): p. 908-921.
111. Treins, C., et al., *Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1*. Oncogene, 2010. **29**(7): p. 1003.
112. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nature cell biology, 2004. **6**(11): p. 1122.
113. Gan, X., et al., *PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- $\delta$  phosphorylation and cell migration downstream of Ga 12*. Nature cell biology, 2012. **14**(7): p. 686.
114. Li, X. and T. Gao, *mTORC2 phosphorylates protein kinase C $\zeta$  to regulate its stability and activity*. EMBO reports, 2014. **15**(2): p. 191-198.
115. Thomanetz, V., et al., *Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology*. J Cell Biol, 2013. **201**(2): p. 293-308.
116. Newton, A.C., *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*. Biochemical Journal, 2003. **370**(2): p. 361-371.
117. Facchinetti, V., et al., *The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C*. The EMBO journal, 2008. **27**(14): p. 1932-1943.
118. Ikenoue, T., et al., *Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling*. The EMBO journal, 2008. **27**(14): p. 1919-1931.
119. Masri, J., et al., *mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor*. Cancer research, 2007. **67**(24): p. 11712-11720.
120. Lang, F., et al., *(Patho) physiological significance of the serum-and glucocorticoid-inducible kinase isoforms*. Physiological reviews, 2006. **86**(4): p. 1151-1178.
121. García-Martínez, J.M. and D.R. Alessi, *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum-and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)*. Biochemical Journal, 2008. **416**(3): p. 375-385.
122. Lu, M., et al., *mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(35): p. 30647-30654.
123. Lang, F., C. Stournaras, and I. Alesutan, *Regulation of transport across cell membranes by the serum-and glucocorticoid-inducible kinase SGK1*. Molecular membrane biology, 2014. **31**(1): p. 29-36.
124. Lu, M., et al., *mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1*. Journal of the American Society of Nephrology, 2010. **21**(5): p. 811-818.
125. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nature reviews Molecular cell biology, 2009. **10**(5): p. 307.
126. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell, 2009. **136**(4): p. 731-745.
127. Drenan, R.M., et al., *FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(1): p. 772-778.
128. Marzec, M., et al., *Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway*. Oncogene, 2007. **26**(38): p. 5606.
129. Huang, H. and D.J. Tindall, *Dynamic FoxO transcription factors*. J Cell Sci, 2007. **120**(15): p. 2479-2487.
130. Greer, E. and A. Brunet, *FOXO transcription factors in ageing and cancer*. Acta physiologica, 2008. **192**(1): p. 19-28.
131. Fu, Z. and D. Tindall, *FOXOs, cancer and regulation of apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(16): p. 2312.
132. Kiechle, F.L. and X. Zhang, *Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications*. Clinica Chimica Acta, 2002. **326**(1-2): p. 27-45.

133. Rishi, A.K., X. Zhang, and A. Wali, *Targeting of apoptosis signaling pathways and their mediators for cancer therapy*, in *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. 2009, Springer. p. 149-188.
134. Lomonosova, E. and G. Chinnadurai, *BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview*. *Oncogene*, 2009. **27**(S1): p. S2.
135. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011. **1813**(11): p. 1978-1986.
136. Kumar, A., et al., *Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism*. *Diabetes*, 2010. **59**(6): p. 1397-1406.
137. Tang, Y., et al., *Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism*. *Nature communications*, 2016. **7**: p. 11365.
138. Kumar, A., et al., *Muscle-specific deletion of rictor impairs insulin-stimulated glucose transport and enhances Basal glycogen synthase activity*. *Molecular and cellular biology*, 2008. **28**(1): p. 61-70.
139. Albert, V., et al., *mTORC2 sustains thermogenesis via Akt-induced glucose uptake and glycolysis in brown adipose tissue*. *EMBO molecular medicine*, 2016. **8**(3): p. 232-246.
140. Hagiwara, A., et al., *Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c*. *Cell metabolism*, 2012. **15**(5): p. 725-738.
141. Betz, C., et al., *mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(31): p. 12526-12534.
142. Chen, X., et al., *Cryo-EM structure of human mTOR complex 2*. *Cell research*, 2018. **28**(5): p. 518.
143. Edward, S., et al., *Architecture of the human mTORC2 core complex*. *eLife*, 2018. **7**.
144. Grabiner, B.C., et al., *A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity*. *Cancer discovery*, 2014. **4**(5): p. 554-563.
145. Gkoutakos, A., et al., *Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex*. *Carcinogenesis*, 2018. **39**(8): p. 971-980.
146. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. *Acta neuropathologica*, 2007. **114**(2): p. 97-109.
147. DeAngelis, L.M., *Brain tumors*. *New England Journal of Medicine*, 2001. **344**(2): p. 114-123.
148. Akhavan, D., T.F. Cloughesy, and P.S. Mischel, *mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside*. *Neuro-oncology*, 2010. **12**(8): p. 882-889.
149. Tanaka, K., et al., *Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-κB pathway that promotes chemotherapy resistance*. *Cancer discovery*, 2011. **1**(6): p. 524-538.
150. Huang, P.H., et al., *Phosphotyrosine signaling analysis of site-specific mutations on EGFRvIII identifies determinants governing glioblastoma cell growth*. *Molecular BioSystems*, 2010. **6**(7): p. 1227-1237.
151. Katanasaka, Y., et al., *Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma*. *Molecular cancer*, 2013. **12**(1): p. 31.
152. Li, L., et al., *EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors*. *Neuro-oncology*, 2009. **11**(1): p. 9-21.
153. Vogt, P.K. and J.R. Hart, *Akt demoted in glioblastoma*. *Sci. Signal.*, 2009. **2**(67): p. pe26-pe26.
154. Jhanwar-Uniyal, M., et al., *Deconstructing mTOR complexes in regulation of Glioblastoma Multiforme and its stem cells*. *Advances in biological regulation*, 2013. **53**(2): p. 202-210.
155. Sabatini, D.M., *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**(9): p. 729.

156. Adler, E.M., 2009: *Signaling Breakthroughs of the year*. 2010, American Association for the Advancement of Science.
157. Masui, K., et al., *mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc*. Cell metabolism, 2013. **18**(5): p. 726-739.
158. Masui, K., W.K. Cavenee, and P.S. Mischel, *mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2014. **25**(7): p. 364-373.
159. Selvarajah, J., et al., *DNA damage-induced S and G2/M cell cycle arrest requires mTORC2-dependent regulation of Chk1*. Oncotarget, 2015. **6**(1): p. 427.
160. Chantaravisoont, N., et al., *Significance of filamin A in mTORC2 function in glioblastoma*. Molecular cancer, 2015. **14**(1): p. 127.
161. Hisamatsu, T., et al., *Potential role of mTORC2 as a therapeutic target in clear cell carcinoma of the ovary*. Molecular cancer therapeutics, 2013. **12**(7): p. 1367-1377.
162. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus*. Nature reviews Disease primers, 2015. **1**: p. 15019.
163. Yuan, M., et al., *Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(35): p. 29579-29588.
164. Yuan, T., et al., *mTORC2 Signaling: A Path for Pancreatic  $\beta$  Cell's Growth and Function*. Journal of molecular biology, 2018. **430**(7): p. 904-918.
165. Yuan, T., et al., *Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes*. Diabetologia, 2017. **60**(4): p. 668-678.
166. Cybulski, N., et al., *mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(24): p. 9902-9907.
167. Smith, U. and B.B. Kahn, *Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids*. Journal of internal medicine, 2016. **280**(5): p. 465-475.
168. López-Otín, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.
169. Riera, C.E., et al., *Signaling networks determining life span*. Annual review of biochemistry, 2016. **85**: p. 35-64.
170. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. nature, 2009. **460**(7253): p. 392.
171. Lamming, D.W., et al., *Depletion of Rictor, an essential protein component of mTORC2, decreases male lifespan*. Aging cell, 2014. **13**(5): p. 911-917.
172. Ohi, M., et al., *Negative staining and image classification—powerful tools in modern electron microscopy*. Biological procedures online, 2004. **6**(1): p. 23.
173. Dubochet, J., et al., *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Quarterly reviews of biophysics, 1988. **21**(2): p. 129-228.
174. Adrian, M., et al., *Cryo-negative staining*. Micron, 1998. **29**(2-3): p. 145-160.
175. Zhang, X., et al., *Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution*. Nature structural & molecular biology, 2013. **20**(1): p. 105.
176. Kastner, B., et al., *GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy*. Nature methods, 2008. **5**(1): p. 53.
177. Schagger, H., W. Cramer, and G. Vonjagow, *Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis*. Analytical biochemistry, 1994. **217**(2): p. 220-230.
178. Kerenyi, L. and F. Gallyas, *Über Probleme der quantitativen Auswertung der mit physikalischer Entwicklung versilberten Agarelektrophoretogramme*. Clinica Chimica Acta, 1973. **47**(3): p. 425-436.
179. Merrill, C.R., R.C. Switzer, and M.L. Van Keuren, *Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly*

- sensitive silver stain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4335-4339.
180. Switzer III, R.C., C.R. Merrill, and S. Shifrin, *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels*. Analytical biochemistry, 1979. **98**(1): p. 231-237.
  181. Rabilloud, T., *A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains*. Electrophoresis, 1992. **13**(1): p. 429-439.
  182. Mindell, J.A. and N. Grigorieff, *Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy*. Journal of structural biology, 2003. **142**(3): p. 334-347.
  183. Heymann, J.B. and D.M. Belnap, *Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy*. Journal of structural biology, 2007. **157**(1): p. 3-18.
  184. Tang, G., et al., *EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy*. Journal of structural biology, 2007. **157**(1): p. 38-46.
  185. Scheres, S.H., et al., *Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 977.
  186. Ludtke, S.J., P.R. Baldwin, and W. Chiu, *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. Journal of structural biology, 1999. **128**(1): p. 82-97.
  187. Wullschleger, S., et al., *Molecular organization of target of rapamycin complex 2*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(35): p. 30697-30704.
  188. Stark, H., *GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM*, in *Methods in enzymology*. 2010, Elsevier. p. 109-126.
  189. Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall, *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*. Science, 1991. **253**(5022): p. 905-909.
  190. Chen, C.-H. and D.D. Sarbassov, *Integrity of mTORC2 is dependent on phosphorylation of SIN1 by mTOR*. Journal of Biological Chemistry, 2011: p. jbc. M111. 282590.
  191. Testa, J.R. and A. Bellacosa, *AKT plays a central role in tumorigenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(20): p. 10983-10985.
  192. Alessi, D.R. and P. Cohen, *Mechanism of activation and function of protein kinase B*. Current opinion in genetics & development, 1998. **8**(1): p. 55-62.
  193. Dangelmaier, C., et al., *PDK1 selectively phosphorylates Thr (308) on Akt and contributes to human platelet functional responses*. Thrombosis and haemostasis, 2014. **112**(03): p. 508-517.
  194. Humphrey, S.J., et al., *Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2*. Cell metabolism, 2013. **17**(6): p. 1009-1020.
  195. Yang, G., et al., *A positive feedback loop between Akt and mTORC2 via SIN1 phosphorylation*. Cell reports, 2015. **12**(6): p. 937-943.
  196. Suzuki, Y., et al., *Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas*. Journal of radiation research, 2010. **51**(3): p. 343-348.
  197. Xue, L., et al., *Low MiR-149 expression is associated with unfavorable prognosis and enhanced Akt/mTOR signaling in glioma*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**(9): p. 11178.
  198. Cheng, J.Q., et al., *The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7482.
  199. Li, X., et al., *PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 33440.
  200. Yin, Y., et al., *mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR*. Cell research, 2016. **26**(1): p. 46.
  201. Bian, Y.-H., et al., *Targeting mTORC2 component rictor inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer*. American journal of translational research, 2017. **9**(9): p. 4317.

202. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *cell*, 1999. **96**(6): p. 857-868.
203. Kops, G.J., et al., *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B*. *Nature*, 1999. **398**(6728): p. 630.
204. Coffey, P.J. and J.R. WOODGETT, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. *European Journal of Biochemistry*, 1991. **201**(2): p. 475-481.
205. Webb, A.E. and A. Brunet, *FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control*. *Trends in biochemical sciences*, 2014. **39**(4): p. 159-169.
206. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 785.
207. Dajani, R., et al., *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. *Cell*, 2001. **105**(6): p. 721-732.
208. Frame, S. and P. Cohen, *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*. *Biochemical Journal*, 2001. **359**(1): p. 1-16.
209. ter Haar, E., et al., *Structure of GSK3 $\beta$  reveals a primed phosphorylation mechanism*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2001. **8**(7): p. 593.
210. Ding, Q., et al., *Degradation of Mcl-1 by  $\beta$ -TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization*. *Molecular and cellular biology*, 2007. **27**(11): p. 4006-4017.
211. Maurer, U., et al., *Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1*. *Molecular cell*, 2006. **21**(6): p. 749-760.
212. Sears, R., et al., *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. *Genes & development*, 2000. **14**(19): p. 2501-2514.
213. Welcker, M., et al., *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(24): p. 9085-9090.
214. PARKER, P.J., F.B. CAUDWELL, and P. Cohen, *Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo*. *European journal of biochemistry*, 1983. **130**(1): p. 227-234.
215. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: functional insights from cell biology and animal models*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2011. **4**: p. 40.
216. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. *Genes & development*, 2003. **17**(15): p. 1829-1834.
217. Manning, B.D., et al., *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway*. *Molecular cell*, 2002. **10**(1): p. 151-162.
218. Potter, C.J., L.G. Pedraza, and T. Xu, *Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2*. *Nature cell biology*, 2002. **4**(9): p. 658.
219. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB signaling: navigating the network*. *Cell*, 2017. **169**(3): p. 381-405.
220. Tobaben, S., et al., *Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons*. *Cell death and differentiation*, 2011. **18**(2): p. 282.
221. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007. **8**(11): p. 931.
222. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. *Genes & development*, 2007. **21**(22): p. 2861-2873.

223. Cadwell, K., T.S. Stappenbeck, and H.W. Virgin, *Role of autophagy and autophagy genes in inflammatory bowel disease*, in *Autophagy in Infection and Immunity*. 2009, Springer. p. 141-167.
224. Huang, J. and D.J. Klionsky, *Autophagy and human disease*. *Cell cycle*, 2007. **6**(15): p. 1837-1849.
225. Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld, *Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body*. *Developmental cell*, 2004. **7**(2): p. 167-178.
226. Codogno, P. and A. Meijer, *Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death*. *Cell death and differentiation*, 2005. **12**(S2): p. 1509.
227. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. *Cell metabolism*, 2007. **6**(6): p. 458-471.
228. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 542-545.
229. Swiech, L., et al., *Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2008. **1784**(1): p. 116-132.
230. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. *FEBS letters*, 2010. **584**(7): p. 1287-1295.
231. Zeng, M. and J.-N. Zhou, *Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells*. *Cellular signalling*, 2008. **20**(4): p. 659-665.
232. Kim, K.W., et al., *Autophagy upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer*. *Autophagy*, 2008. **4**(5): p. 659-668.
233. Rautou, P.-E., et al., *Autophagy in liver diseases*. *Journal of hepatology*, 2010. **53**(6): p. 1123-1134.
234. Czaja, M.J., et al., *Functions of autophagy in normal and diseased liver*. *Autophagy*, 2013. **9**(8): p. 1131-1158.
235. Li, J., et al., *Rictor/mTORC2 protects against cisplatin-induced tubular cell death and acute kidney injury*. *Kidney international*, 2014. **86**(1): p. 86-102.
236. Xu, D., et al., *Rictor Deficiency Aggravates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice by Suppressing Autophagy and Regulating MAPK Signaling*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018. **45**(6): p. 2199-2212.
237. Sparks, C. and D. Guertin, *Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy*. *Oncogene*, 2010. **29**(26): p. 3733.
238. Baretić, D., et al., *Tor forms a dimer through an N-terminal helical solenoid with a complex topology*. *Nature communications*, 2016. **7**: p. 11016.
239. Yang, H., et al., *4.4 Å resolution cryo-EM structure of human mTOR complex 1*. *Protein & cell*, 2016. **7**(12): p. 878-887.
240. Yang, H., et al., *Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40*. *Nature*, 2017. **552**(7685): p. 368.
241. Gaubitz, C., et al., *Molecular basis of the rapamycin insensitivity of target of rapamycin complex 2*. *Molecular cell*, 2015. **58**(6): p. 977-988.
242. Karuppasamy, M., et al., *Cryo-EM structure of Saccharomyces cerevisiae target of rapamycin complex 2*. *Nature communications*, 2017. **8**(1): p. 1729.
243. Gaubitz, C., et al., *TORC2 structure and function*. *Trends in biochemical sciences*, 2016. **41**(6): p. 532-545.
244. Yang, H., et al., *The structure of mTOR complexes at a glance*. *Precision Cancer Medicine*, 2018. **1**.

