CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

# Mecanismos reguladores de las cinasas AKT y mTOR asociados al proceso de migración celular

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. ISMAEL BRACHO VALDÉS**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de tesis: Dr. JOSÉ VÁZQUEZ PRADO

México, D.F. MARZO 2014

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 35 del Departamento de Farmacología y el laboratorio 19 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Doctor José Vázquez Prado.

El desarrollo del trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca No. 205513 y el donativo No. 152434, así como, por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional con el apoyo para obtención de grado.

**Contenido.**

**Lista de abreviaturas** ..... i
**Índice de figuras** ..... v
**Índice de tablas** ..... vii
**Resumen** ..... ix
**Abstract** ..... xi
**I. Introducción** ..... 1
A. Angiogénesis ..... 1
**1. Perspectiva histórica** ..... 4
**2. Angiogénesis y vasculogénesis** ..... 7
**3. Estimulación del crecimiento angiogénico** ..... 9
**4. Factores angiogénicos y sus receptores** ..... 15
**5. Alteraciones en la formación de vasos sanguíneos** ..... 16
**6. Angiogénesis tumoral** ..... 20
**7. Terapia anti- y pro-angiogénica** ..... 23
B. Migración de células endoteliales ..... 29
C. Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR ..... 31
**1. Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)** ..... 33
**2. La cinasa AKT/PKB** ..... 33
**3. mTOR (mammalian Target Of Rapamaycin)** ..... 41
D. Familia de proteínas con dominios BAG ..... 52
E. Chaperonas moleculares ..... 55
**1. Hsp70 (70 kDa Heat shock protein)** ..... 55
**2. GRp58 (Glucose-Regulated protein 58)** ..... 57
F. Sistema ubiquitina-proteosoma ..... 58
**II. Planteamiento del problema** ..... 61
**III. Hipótesis** ..... 63
**IV. Objetivo general** ..... 63
**V. Objetivos particulares** ..... 63

**VI. Estrategia experimental** ..... 65
**VII. Metodología experimental** ..... 69
A. Ensayo de doble híbrido ..... 69
1. **Principio del sistema de doble híbrido** ..... 69
2. **Obtención de levaduras que expresan la carnada** ..... 70
3. **Ensayo de doble híbrido** ..... 72
4. **Obtención del cDNA de las levaduras** ..... 76
5. **Confirmación de la interacción e identidad de la presa** ..... 77
6. **Soluciones empleadas** ..... 78
B. Transformación de bacterias ..... 80
1. **Transformación de bacterias E. coli DH5 alfa** ..... 80
2. **Purificación de plásmidos por Miniprep** ..... 82
3. **Preparación de bacterias E. coli DH5 alfa competentes** ..... 84
4. **Soluciones empleadas** ..... 84
C. Plásmidos y construcciones ..... 87
D. Cultivo celular y transfección ..... 89
1. **Cultivo celular** ..... 89
2. **Transfección celular** ..... 89
3. **Pretratamientos y estímulos celulares** ..... 91
4. **Lisados celulares totales** ..... 93
5. **Soluciones empleadas** ..... 94
E. Inmunoprecipitación, Pull-down e Inmunoblot ..... 100
1. **Inmunoprecipitación** ..... 100
2. **Pull down (Precipitación por afinidad)** ..... 101
3. **Inmunoblot (Western Blot)** ..... 102
4. **Denudación de la membrana de PVDF (stripping)** ..... 107
5. **Soluciones empleadas** ..... 108
F. Microscopía de fluorescencia ..... 112
1. **Transfección y preparación de las células** ..... 112

2. **Inmunofluorescecia** ..... 113
3. **Montaje y análisis de colocalización** ..... 113
4. **Soluciones empleadas** ..... 114

G. Estabilidad de AKT y ensayo de ubiquitinación *in vivo* ..... 115
1. **Estabilidad de AKT** ..... 115
2. **Ensayo de ubiquitinación de AKT** ..... 115
3. **Soluciones y reactivos empleados** ..... 116

H. Ensayo de fosforilación de BAG5 ..... 118

I. Ensayo de activación de AKT y mTOR ..... 118
1. **Fosforilación de AKT** ..... 118
2. **Activación de mTOR** ..... 118

J. Ensayo de cierre de herida y quimiotaxis ..... 119
1. **Ensayo de cierre de herida** ..... 119
2. **Ensayo de quimiotaxis** ..... 120
3. **Soluciones empleadas** ..... 124

K. Análisis estadístico ..... 125

**VIII. Resultados** ..... 127

A. Interacción AKT-BAG5 ..... 127
1. **Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT** ..... 127
2. **Distribución subcelular y co-localización de BAG5 y AKT** ..... 131
3. **BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT** ..... 133
4. **La degradación de AKT inducida por BAG5 es mediada por Hsp70** ..... 138
5. **Parkina, una ligasa de ubiquitina tipo E3, promueve la ubiquitinación y degradación de AKT y contribuye al efecto de BAG5** ..... 139
6. **La fosforilación de BAG5, correlaciona con una reducción en la interacción con AKT** ..... 143
7. **BAG5 modula la fosforilación de AKT y la migración celular dependiente de HGF** ..... 148

B. Interacción mTOR-GRp58 ..... 152

1. **La interacción entre mTOR y GRp58 disminuye en condiciones oxidantes** ..... 152
2. **Los cambios en la expresión de GRp58 afectan la actividad del complejo 1 de mTOR pero no del complejo 2 de mTOR** ..... 153
3. **La proteína GRp58 es requerida para la señalización del complejo 1 de mTOR en respuesta al agente oxidante PAO** ..... 159

**IX. Discusión** ..... 163

A. Interacción AKT-BAG5 ..... 163

1. **Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT** ..... 163
2. **BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT** ..... 166
3. **La degradación de AKT inducida por BAG5 es mediada por Hsp70 y Parkina** ..... 167
4. **La fosforilación de BAG5 correlaciona con una reducción en su interacción con AKT** ..... 172
5. **BAG5 modula la fosforilación de AKT y la migración celular dependiente de HGF** ..... 173

B. Interacción mTOR-GRp58 ..... 175

1. **La chaperona GRp58 es requerida para la señalización de mTORC1 en respuesta al agente oxidante PAO** ..... 176
2. **Los cambios en la expresión de GRp58 afectan la actividad del complejo 1 de mTOR pero no del complejo 2 de mTOR** ..... 178

**X. Conclusiones** ..... 181

**XI. Referencias** ..... 183

**XII. Anexo** ..... 203

A. Artículo original: Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57 ..... 203

B. Artículo original en revisión: AKT ubiquitination and degradation via Hsp70/Parkin complex is facilitated by its interaction with Bag5 ..... 219

C. Artículo de revisión: mTORC1- and mTORC2-interacting proteins Keep their multifunctional partners focused ..... 245

1. **Portada de la revista: IUBMB Life** ..... 264

D. Artículo de divulgación: Angiogénesis tumoral ..... 267

1. **Cartel del artículo de divulgación: Angiogénesis tumoral** ..... 284

## Lista de abreviaturas.

17-AAG ..... 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin
4E-BP1 ..... Proteína de unión al factor de iniciación de la traducción 4E-1
ACAP1 ..... *ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1*
ADP ..... Adenosina difosfato
AGC ..... Familia de proteínas cinasas PKA, PKG, PKC
AKT ..... Proteína cinasa B (PKB)
AMPc ..... Adenosina monofosfato cíclico
AMPK ..... Proteína cinasa activada por AMP
ANOVA ..... Análisis de varianza
APE ..... *AKT phosphorylation enhancer*
APPL ..... *Adaptor protein containing PH d. PTB d. and Leucine zipper motif*
ArgBP2γ ..... *Arg-binding protein 2 gama*
ASB ..... Albúmina de suero bovino
ATG100 ..... Gen relacionado a autofagia 100
ATG13 ..... Gen relacionado a autofagia 13
BAD ..... Bcl-2-associated death promoter
BAG5 ..... *BCL2-associated athanogene 5*
bFGF ..... Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BLAST ..... *Basic Local Alignment Search Tool*
CDA ..... Condiciones desestabilizantes de AKT
CHIP .....*Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein*
CHX ..... Cicloheximida
CPE ..... Células progenitoras endoteliales
CTMP ..... Proteína moduladora del carboxilo terminal de AKT
CXCL12 ..... *C-X-C motif chemokine 12*
DLL4 ..... *Delta-like-4*
DMEM ..... *Dulbecco's modified Eagle's medium*
EGFL7 ..... *EGF-like domain-containing protein 7*
EGFP ..... Proteína verde fluorescente
eNOS ..... Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK1/2 ..... Cinasa regulada por señales extracelulares
ERp57 ..... *Endoplasmic reticulum protein 57(GRp58)*

FAT ..... *FRAP, ATM, TRRAP*
FATC ..... *FAT carboxyl-terminal*
FK-BP12 ..... Proteína de unión a FK506-12
FKHR ..... *Forkhead in rhabdomyosarcoma (FOXO1)*
FLIP ..... *FLICE-inhibitory protein*
FOXO1 ..... *Forkhead box protein O1*
FRAP ..... *FKBP12-Rapamycin associated protein*
FRB ..... *FKBP12-Rapamycin Binding domain*
GβL ..... *G-protein eta-subunit Like protein*
GAP ..... *GTPase-activating protein*
GEFs ..... *Guanine nucleotide exchange factors*
GLUT ..... *Glucose transporter*
GPCR ..... Receptor acoplado a proteínas G
Grb10 ..... *Growth factor receptor-binding protein-10*
GRp58 .....*Glucose regulated protein, 58 kDa*
GSK-3β ..... *Glycogen synthase kinase 3 beta*
GST ..... *Glutathione S-transferase*
GTP ..... Guanosín trifosfato
HEAT ..... *Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of PP2A and TOR1*
HEK293 ..... *Human Embryonic Kidney 293*
HEK293T ..... HEK293 transformadas con el antígeno T grande
HeLa ..... Células de adenocarcinoma cervicouterino (Henrieta Lacks)
HGF ..... Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1α ..... Factor inducible por hipoxia 1 alfa
hTERT ..... Telomerasa transcriptasa inversa humana
IKKα ..... *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*
JIP1 ..... *JNK interacting protein 1*
JNK ..... *c-Jun N-terminal kinase*
LB ..... *Lysogeny Broth*
MAPK ..... Proteína cinasa activada por mitógenos
MDM2 ..... *Murine doble minute 2*
MEKK3 ..... *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*
MG132 ..... *Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal*
mLST8 ..... *mammalian Lethal with Sec13 protein 8*

mSIN1 ..... *mammalian Stress-activated map kinase-INteractin protein 1*
mTOR ..... *mammalian/mechanistic Target Of Rapamaycin*
NF-κβ ..... *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
ON ..... Óxido nítrico
P-Rex1..... *PI(3,4,5)P3-dependent Rac exchanger 1*
p70S6K ..... *p70 ribosomal s6 protein kinase*
PAE ..... *Porcine Aortic Endothelial Cells*
PAGE ..... Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAK ..... *p21-activated kinases*
PAO ..... *Phenylarsine oxide*
PBH2 ..... *Prohibitin 2*
PDGF ..... Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR ..... Receptor para PDGF
PDK1 ..... Proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos-1
PDK2 ..... Proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos-2
PEG ..... Polietilenglicol
PH ..... Dominio Homólogo a Plekstrina
PHLDA3 ..... *Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3*
PHLPP ..... *PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases*
PI3K ..... Fosfatidilinositol-3-cinasa
PlGF ..... Factor de crecimiento placentario
PIKK ..... Cinasas relacionadas a la PI3K
PIP ..... Fosfatidilinositol monofosfato
PIP2 ..... Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3 ..... Fosfatidilinositol trifosfato
PKA ..... Proteína cinasa A
PKB ..... Proteína cinasa B (AKT)
PKC ..... Proteína cinasa C
PP2A ..... Proteína fosfatasa 2A
PPARγ ..... *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PRAS40 ..... *Proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
pTD1 ..... Antígeno T grande de SV40
PTEN ..... Fosfatasa y homóloga a Tensina
PVDF ..... Difluoruro de polivinildieno

PVP ..... Polivinilpirrolidona
RAFT ..... Rapamycin and FKBP12 target
RAPT ..... Rapamycin target
RAPTOR ..... Regulatory-Associated Protein of mTOR
RHEB ..... Ras homolog enriched in brain
RICTOR ..... Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
RSK1 ..... p90 Ribosomal S6 Kinase 1
RTK ..... Receptor tirosina cinasa
S1P ..... Esfingosina-1-fosfato
S6 ..... Proteína ribosomal S6
SB ..... *Super Broth*
SDF-1 ..... Factor derivado de las células estromales-1
SDS ..... Dodesil sulfato de sodio
SEP ..... Sirolimus effector protein
SFB ..... Suero fetal bovino
shRNA ..... *Short hairping* RNA de interferencia
SRBP1 ..... *Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1*
STAT3 ..... *Signal transducer and activator of transcription 3*
Tcl1 ..... T-cell leukemia/lymphoma-1
TEMED ..... N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida
TGFβ ..... Factor de crecimiento transformante beta
TNFα ..... Factor de necrosis tumoral-alfa
TOR ..... *Target of Rapamycin*
TRB3 ..... *Tribbles homolog 3*
TSC1/2 ..... *tuberous sclerosis complex 1/2*
TTC3 ..... *Tetratricopeptide repeat domain 3*
UA ..... Unidades arbitrarias
UR ..... Unidades relativas
VEGF ..... Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR ..... Receptor para el VEGF
VPF ..... Factor de permeabilidad vascular
X-α-Gal ..... 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosida

## Índice de figuras.


1. Angiogénesis ..... 2
2. Angiogénesis fisiológica y patológica ..... 3
3. Mecanismos moleculares de la angiogénesis ..... 10
4. Angiogénesis tumoral ..... 20
5. Bases moleculares de la terapia antiangiogénica ..... 26
6. Participación de la vía PI3K-AKT-mTOR en la migración endotelial y angiogénesis ..... 30
7. Mecanismo de activación de la vía PI3K-AKT-mTOR ..... 32
8. Arreglo lineal de los dominios de AKT y proteínas con las que interactúan ..... 35
9. Los complejos de mTOR y las proteínas con las que estos establecen interacciones funcionales ..... 45
10. Vías de señalización de los complejos 1 y 2 de mTOR ..... 48
11. La familia de proteínas BAG ..... 54
12. Estructura de GRp58/ERp57 ..... 57
13. Estrategia experimental ..... 66
14. Fundamento del sistema de doble híbrido en levaduras ..... 71
15. Ensayo de doble híbrido en levaduras ..... 74
16. Sistema de transferencia húmedo ..... 103
17. Principio de detección por inmunoblot ..... 106
18. Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT ..... 128
19. Distribución subcelular de BAG5 y AKT ..... 132
20. BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT ..... 136
21. La degradación de AKT promovida por BAG5 es mediada por Hsp70 ..... 140

22. Parkina promueve la ubiquitinación y degradación de AKT y contribuye al efecto de BAG5 ..... 142

23. La fosforilación de BAG5 y AKT correlaciona con una reducción en la interacción entre estas proteínas ..... 146

24. BAG5 modula la activación de AKT y la migración celular dependiente de HAGA ..... 150

25. La interacción entre mTOR y GRp58 disminuye en condiciones oxidantes ..... 154

26. El complejo 1 de mTOR disminuye su señalización cuando se atenúa la expresión de GRp58 ..... 156

27. El complejo 1 de mTOR incrementa su señalización con la sobreexpresión de GRp58 ..... 157

28. El incremento en la señalización de mTORC1 debido a la sobreexpresión de GRp58 es sensible a Rapamicina ..... 158

29. GRp58 es requerido para la señalización del complejo 1 de mTOR en respuesta al agente oxidante PAO ..... 160

30. Papel de BAG5 y GRp58 como reguladores de la vía PI3K-AKT-mTOR ..... 164

## Índice de tablas.

1. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis excesiva ..... 17

2. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis insuficiente o regresión vascular ..... 18

3. Inhibidores angiogénicos ..... 24

4. Tipos de inhibidores angiogénicos ..... 28

5. Cantidad de los componentes de las mezclas A y B dependiendo del tamaño de la caja Petri en la transfección con Lipofectamine Plus reagent ..... 90

6. Cantidad de los componentes de la mezcla en dependencia del tamaño de la caja Petri en la transfección con Polyfect ..... 91

7. Soluciones requeridas para preparar geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) ..... 102

8. Condiciones del inmunoblot para las diferentes proteínas detectadas ..... 105

## Resumen.

La formación de nuevos capilares a partir de los ya existentes (proceso conocido como angiogénesis) es crucial en la homeostasis del organismo sano y su alteración contribuye en la patogenia de numerosas enfermedades de índole isquémico, inflamatorio, inmune y neoplásico, entre otras. La migración celular, evento esencial durante la angiogénesis, depende en gran medida de la correcta activación de la vía PI3K-AKT-mTOR. La identificación de proteínas que modulen la actividad de esta vía, a través de su asociación con los dominios catalíticos de las cinasas AKT y mTOR, constituyen potenciales blancos para terapias anti- o pro-angiogénicas. Nosotros estamos interesados en entender los aspectos moleculares responsables de la migración de las células endoteliales, particularmente, la transducción de señales angiogénicas, mismas que comúnmente derivan en la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR, la cual además de promover el crecimiento, la proliferación y sobrevivencia celular, está implicada en la migración de las células endoteliales y otros procesos angiogénicos, mediante mecanismos efectores aún no completamente esclarecidos. Considerando que las funciones atribuibles a esta vía de señalización son fuertemente reguladas por fosforilación y/o interacción de sus componentes fundamentales con proteínas reguladoras, nos propusimos identificar proteínas con afinidad por el dominio catalítico de AKT, capaces de modular la función de esta cinasa en el proceso de migración celular y, habiendo identificado a la co-chaperona BAG5 como una proteína con afinidad por AKT, decidimos explorar, junto con la caracterización de ésta, el efecto en la vía de la chaperona GRp58 que previamente había sido identificada en el laboratorio por su afinidad con el dominio de cinasa de mTOR.

Nuestros datos demuestran la interacción entre AKT y BAG5, una proteína con dominios BAG que contiene un sitio consenso de fosforilación por AKT1. BAG5 es un miembro de una familia de reguladores de chaperonas implicado en la patogenia de la enfermedad de Parkinson y del cáncer de próstata, a través de regular positiva o negativamente a las chaperonas Hsp70 y GRp78 y de las

ligasas de ubiquitina Parkina y CHIP. Esta familia de proteínas con dominios BAG clásicamente se ha considerado como promotora de la sobrevivencia celular, actividad que es controversial para BAG5, pues existen evidencias que apoyan tanto el efecto pro-sobrevivencia como el efecto anti-sobrevivencia celular. Nosotros encontramos que bajo condiciones de ausencia de estímulo celular, AKT interacciona con BAG5 resultando en la degradación de AKT dependiente de ubiquitinación vía la participación del complejo Hsp70/Parkina, mientras que en condiciones de estimulación celular, BAG5 resulta fosforilado por AKT y disociado de ella, además, BAG5 modula negativamente la activación de AKT y la señalización hacia el proceso de migración celular. Estos datos sugieren una regulación recíproca entre AKT y BAG5 dependiente de las condiciones de actividad celular donde, AKT es seleccionada para degradación vía BAG5 en condiciones de reposo celular, pero se estabiliza y señaliza en condiciones de activación celular, durante la cual queda exenta de la regulación dependiente de BAG5 por inducir su fosforilación y disociación. En cuanto al efecto que GRp58, una chaperona sensible al estado redox, ejerce en esta vía de transducción, encontramos que en condiciones oxidantes disminuye su interacción con mTOR lo que promueve la activación del complejo mTORC1, el cual comúnmente se ubica río abajo de la cinasa AKT, en tanto que no afecta al complejo mTORC2, un activador directo de esta cinasa. En conjunto, nuestros datos indican que en condiciones de estrés nutricional, las cinasas AKT y mTOR son reguladas por complejos de chaperonas que las mantienen en un estado inactivo y que su disociación, en condiciones de estímulo, favorece la activación de la vía. Estos descubrimientos revelan un papel complejo de las proteínas chaperonas como reguladoras de la señalización de AKT y mTOR y contribuyen a la identificación de posibles blancos terapéuticos para modular el proceso angiogénico.

## Abstract.

The formation of new capillaries from pre-existing vessels (a process known as angiogenesis) is essential in the homeostasis of the healthy organism. The alteration in this process contributes to the pathogenesis of ischemic, inflammatory, immune and neoplastic diseases, among others. Thus, it is important to identify factors that modulate the angiogenic process, since they constitute potential targets for anti- or pro-angiogenic therapy. Angiogenesis involves recognition of angiogenic factors, proliferation and migration of endothelial cells and blood vessel maturation. We are interested in the signal transduction pathways that regulate endothelial cell migration in response to angiogenic cues in particular the PI3K-AKT-mTOR signaling cascade. The serine/threonine kinases AKT and mTOR are core components, downstream of growth factors and other cellular stimuli, which, besides promoting proliferation, growth, metabolism and cell survival, are involved in endothelial migration and angiogenesis by mechanisms not yet completely understood. Considering the fundamental role played by AKT in endothelial cell migration, we focused on the identification of novel interactors of this serine-threonine kinase as a potential regulators of its function in the context of cell migration, as well as, assessing the role of a cellular redox sensor, GRp58, in the activation of both mTOR complexes.

In this work, we describe the identification of BAG5, a member of a chaperone modulator family, with a partially conserved AKT phosphorylation consensus motive, as an AKT interacting partner. BAG5 is involved in the pathogenesis of Parkinson's disease and prostate cancer via interaction with the molecular chaperone Hsp70 and GRP78 and the ubiquitin ligases, Parkin and CHIP, resulting in positive or negative regulation of them. This BAG family proteins has been considered as a promoter of cell survival, but for BAG5 this activity is controversial because there are evidences to support both pro-survival and anti-survival effects. We found that under starved conditions BAG5 interacts and targets AKT to ubiquitination-dependent degradation, via the participation of

Hsp70/Parkin complex, while in stimulated cells, BAG5 is phosphorylated and released from AKT, allowing its activation and the consequent regulation of its functions that includes cell migration. Altogether, these results suggest a model of reciprocal regulation between AKT and BAG5, where AKT signaling activities are attenuated under cell quiescence conditions by its interaction with BAG5 selecting AKT for degradation, but during cell activation it remains exempt of BAG5 dependent regulation by inducing its phosphorylation and dissociation. Furthermore, we demonstrate that the known interaction between the redox-sensitive chaperone, GRp58, and mTOR decreases under oxidizing conditions. This chaperone facilitates the activation of mTOR complex 1 (Raptor) but not mTOR complex 2 (Rictor) in response to insulin and the oxidizing agent PAO, suggesting a regulation of mTOR pathway based on a GRp58-dependent differential activation of mTOR complexes by a redox-sensitive mechanism.

These findings contribute to elucidate the regulation of AKT and mTOR signaling and, via the identification of new direct regulators, further supports their potential as therapeutic targets to modulate the angiogenic process.

# I. Introducción.

## A. Angiogénesis.

El crecimiento y viabilidad de un organismo requiere de comunicación entre tejidos y órganos mediante un transporte eficiente de oxígeno, nutrientes, moléculas de señalización y células. Esta tarea es llevada a cabo por una extensa red vascular constituida por los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos, los cuales se forman durante el desarrollo embrionario, inicialmente a partir de células progenitoras y posteriormente por remodelado de los vasos. Este sistema se integra funcionalmente con diferentes órganos, adquiriendo características tejido-específicas y conservando la plasticidad, de modo que puede dar lugar a la generación de nuevos vasos. Los vasos sanguíneos y linfáticos están interconectados a través del vaso linfático más grande, el conducto torácico, el cual drena la linfa a la circulación sanguínea [1-4].

La cara interna del plexo vascular está revestida por células endoteliales que, además de realizar diversas funciones esenciales en el mantenimiento de la homeostasis y servir de barrera selectiva para el paso de sustancias y células, están encargadas de regular el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, fenómeno conocido como angiogénesis (Figura 1). Este complejo proceso es esencial en la función y reparación tisular. Sin embargo, la generación insuficiente o excesiva de estos vasos favorece la generación y/o progresión de diversos estados patológicos, como las enfermedades isquémicas y el cáncer. De hecho, los tumores en desarrollo fomentan la formación de vasos sanguíneos para cubrir sus requerimientos metabólicos, fenómeno conocido como angiogénesis tumoral (Figura 2). Por otro lado, las células progenitoras endoteliales pueden ser reclutadas de la médula ósea y de la pared de vasos sanguíneos adyacentes, contribuyendo al desarrollo de vasos sanguíneos tanto en el estado fisiológico como el patológico (Figuras 1 y 2).

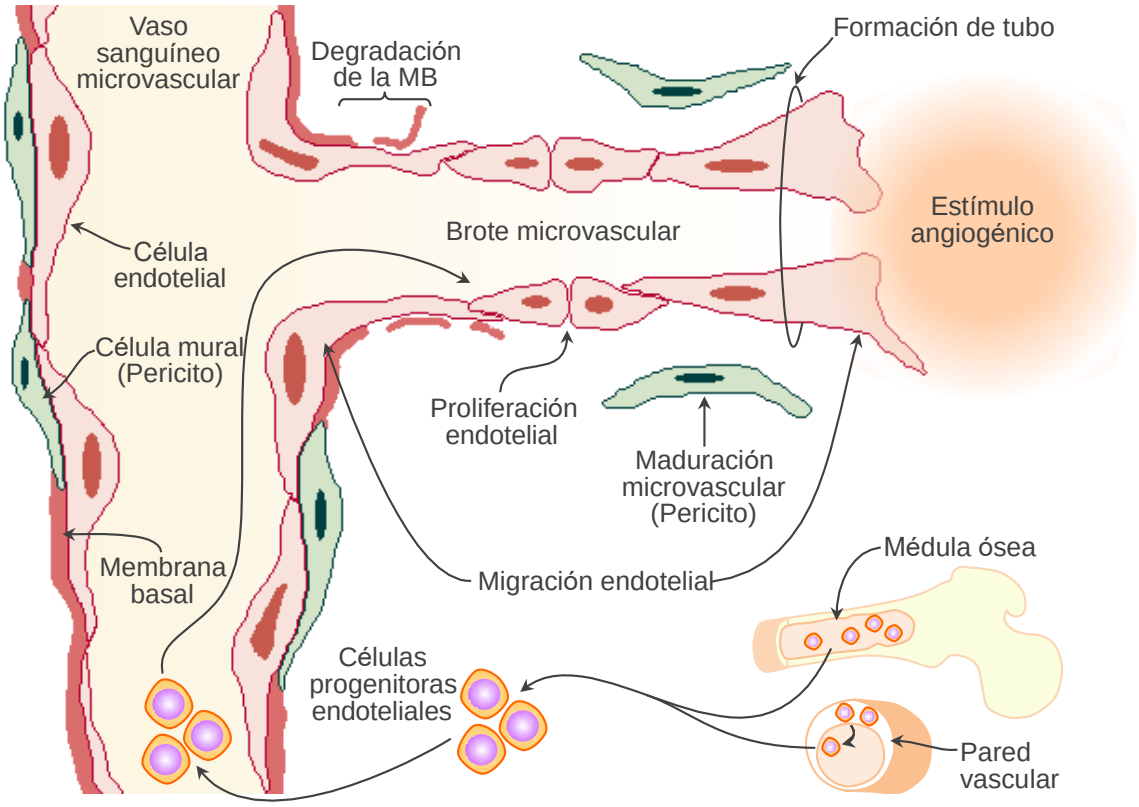



**Figura 1. Angiogénesis**. La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes se inicia en los capilares adyacentes a tejidos secretores de factores angiogénicos. Las células endoteliales que reciben la señal (no todas las células endoteliales reciben la señal de manera simultánea) dan lugar a la rama endotelial a partir de la cual se origina un nuevo brote microvascular. Primeramente se presenta una dilatación vascular acompañada de un incremento en la permeabilidad del endotelio, favoreciéndose la degradación proteolítica de la membrana basal por metaloproteinasas y la pérdida de los contactos célula-célula entre las células endoteliales. Esto permite la migración de las células endoteliales en dirección del estímulo angiogénico. La polarización celular ocurre por una distribución asimétrica de moléculas de señalización y una organización asimétrica del citoesqueleto de actina que culmina en la proyección de extensiones membranales conocidas como lamelipodios y filopodios, además de la formación de adhesiones focales y la integración de complejos contráctiles constituidos por miosina y fibras de actina. Las células endoteliales proliferan, generando con ello la base celular que va a constituir al nuevo capilar. Posteriormente las células endoteliales maduran, inhibiendo su crecimiento y adecuando su forma para adquirir una estructura tubular de capilar, que se consolida con el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso. Investigaciones recientes han demostrado que la formación de vasos sanguíneos en la etapa postnatal también puede involucrar la contribución de células progenitoras endoteliales provenientes de la médula ósea y de la pared de los vasos sanguíneos adyacentes.

En las células endoteliales, la transducción de señales angiogénicas promueve la generación y maduración de nuevos vasos sanguíneos mediante la activación de procesos que incluyen la migración quimiotáctica y proliferación

celular. De tal manera que los factores y receptores angiogénicos, así como las proteínas que participan en la transducción de sus señales, constituyen potenciales blancos farmacológicos, útiles en el tratamiento de pacientes con enfermedades relacionadas a alteraciones vasculares, pudiéndose emplear además, como marcadores de respuesta a la terapia anti- o pro-angiogénica (Figuras 1 y 2).

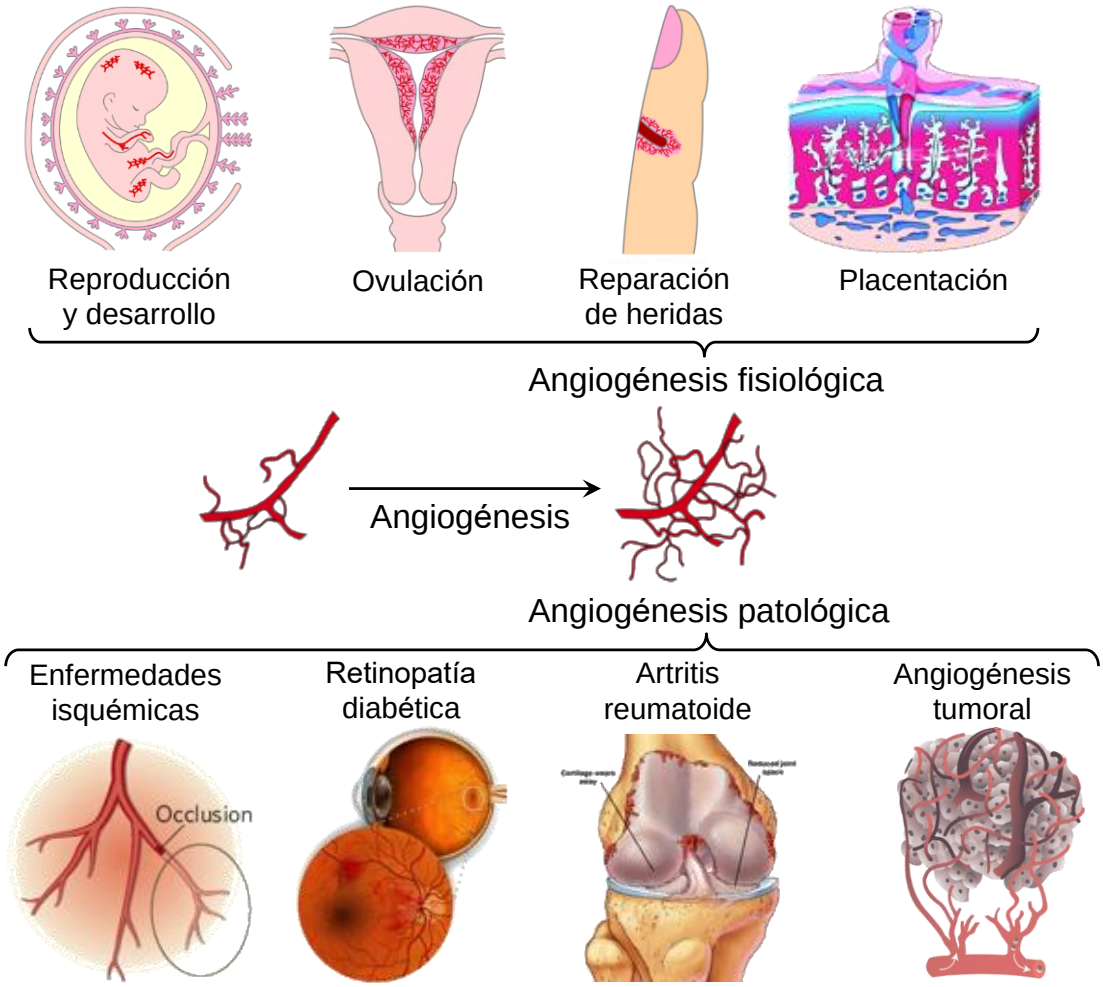



**Figura 2. Angiogénesis fisiológica y patológica**. La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) contribuye en una amplia variedad de condiciones fisiológicas y patológicas. Existiendo, pues, dos vertientes de la misma: una beneficiosa (fisiológica) que usualmente es focal, autolimitada en tiempo, es esencial para el crecimiento de órganos en el embrión y en el adulto participa en procesos de cicatrización de heridas, ovulación, remodelación del esqueleto o tisular, placentación, etc.; y otra perjudicial (patológica) que característicamente es crónica, favorece el sangrado, el edema y la destrucción tisular y participa importantemente en el crecimiento tumoral y metástasis, la artritis reumatoide o la retinopatía diabética entre otras.

## 1. Perspectiva histórica.

Desde periodos tempranos de la historia de la humanidad se situaba al corazón como órgano vital y se vinculaba con la circulación de “fluidos vitales” a través de canales. Aunque estos razonamientos a menudo eran erróneos y estaban ligados a una concepción religiosa y a la magia, sin duda representaron la base para los descubrimientos posteriores realizados con mayor rigor científico. Primero Miguel Servet, en 1553, y posteriormente William Harvey, en 1628, postularon que la sangre circula gracias a que el corazón la impulsa por las arterias hacia los tejidos y regresa a él por las venas. Décadas más tarde, en 1661, Marcelo Malpighi consolidó esta teoría a partir de sus observaciones, con ayuda de un microscopio, de la conexión entre diminutas arterias y venas. Complementariamente, en 1684, Antonie van Leeuwenhoek, examinó el sistema circulatorio, percatándose que a nivel microscópico el capilar sanguíneo sólo admite el paso de un glóbulo rojo a la vez [5].

El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos fue observado, por primera vez, por el cirujano escoces John Hunter en 1787, como resultado de haber ligado el vaso sanguíneo que irriga el sitio de implantación de los cuernos de ciervo. Hoy sabemos que la generación de estos nuevos vasos (circulación colateral) es secundaria a la hipoxia producida por la ligadura del vaso. Además, empleó el término de “tejido de granulación” para describir la apariencia de una herida en proceso de cicatrización en la que se observan vasos sanguíneos ensanchados y neoformados [6-8]. Casi un siglo después, en 1860, el anatomopatólogo alemán Julius Friedrich Cohnheim designó a la arteria primordial para un área delimitada como “arteria terminal”, lo que sirvió de base para sus posteriores estudios en isquemia regional [9]. Años más tarde, en 1863 Rudolph Virchow evidenció la estructura anormal de los vasos sanguíneos de tumores humanos [10], dando pie a los trabajos de Goldman quien fue de los primeros en sugerir la asociación entre el crecimiento tumoral y a la formación de nuevos vasos [11]. Estos descubrimientos sentaron la base para el desarrollo del estudio de la angiogénesis en el cáncer.

Con la descripción del patrón de ramificación de los vasos sanguíneos en un animal vivo, gracias al empleo de cámaras transparentes insertadas en la oreja del conejo, por Clark y Clark en 1932, se estableció el campo de la biología vascular, incrementándose con ello el interés de los investigadores hacia este terreno [12]. En 1935, el patólogo Arthur T. Hertig empleó por primera vez el término “angiogénesis” para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta [13]. En tanto que la primera asociación entre el crecimiento tumoral y un infiltrado de vasos sanguíneos recién formados en un modelo tumoral en conejo data de 1939 [14]. En la década de los 1940s, Algire y colaboradores fueron los primeros en observar la existencia de vasos sanguíneos que se dirigen hacia un tumor, demostrando con esto que los tumores atraen activamente nuevos vasos sanguíneos, proceso que 30 años más tarde sería conocido como angiogénesis tumoral [15-17]. Experimentos subsecuentes insinuaron la existencia de un “factor X” inductor de una actividad angiogénica regulada por oxígeno, que mediaba el crecimiento de vasos retinianos anormales [18]. La existencia de un “factor difusible” liberado por los tumores que atrae a nuevos vasos sanguíneos hacia el sitio del tumor se demostró dos décadas después [19, 20].

En 1971 Judah Folkman, cirujano e investigador de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, considerado el fundador del campo de investigación de la angiogénesis, define una nueva era en el campo de la angiogénesis tumoral, postulando que los tumores sólidos son dependientes de angiogénesis y que la inhibición de la angiogénesis podría usarse en la terapia anticancerosa [21]. Premisa que más tarde se amplió para otras enfermedades dependientes de angiogénesis como la retinopatía diabética. Además, en el mismo periodo, el grupo de Folkman pudo aislar una fracción del fluido de ascitis tumoral capaz de estimular el crecimiento de vasos sanguíneos [22]. Además, logró demostrar que un cúmulo de células de carcinoma no puede crecer en una zona avascular del ojo de un conejo susceptible, pero se desarrolla de manera exponencial al ser implantado en una región en que puede atraer a vasos sanguíneos del iris,

mostrando que el crecimiento progresivo del tumor es absolutamente dependiente de la angiogénesis [23].

A partir de ese momento, los esfuerzos de numerosos grupos se encaminaron a entender los mecanismos moleculares de la angiogénesis, así como a desarrollar estrategias para inhibir o inducir la angiogénesis con fines terapéuticos. En 1975, trabajos realizados por el grupo de Folkman resultaron en el descubrimiento del primer inhibidor de la angiogénesis presente en cartílago de conejos neonatos [24]. Posteriormente, en 1984, se purificó el primer factor angiogénico identificado como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) [25]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), conocido ahora como uno de los factores angiogénicos más importantes, fue inicialmente identificado por Senger y Dvorak en 1983 como un potente factor de permeabilidad vascular (VPF, por sus siglas en inglés) que permite el escape de proteínas plasmáticas al espacio extravascular, las cuales forman una matriz de fibrina que promueve el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos [26]. Más tarde, en 1989, Napoleone Ferrara y colaboradores identificaron al VEGF [27] que resultó ser una molécula idéntica al VFP [28]. Otros estudios, del grupo de Ferrara, demostraron que el bloqueo del VEGF causaba regresión tumoral en ratones [29]. Durante la década de 1990, con los primeros ensayos clínicos, como parte de una búsqueda incesante tanto de factores anti- o pro-angiogénicos endógenos como de fármacos que los modulen, se dio paso a la aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) del primer fármaco estimulador angiogénico, en 1997, para el tratamiento de úlceras del pie diabético (becaplermin, Regranex) y de varios fármacos antiangiogénicos como el bevacizumab (Avastin), inhibidores multicinasa, así como el temsirolimus (Torisel) y everolimus (Afinitor) ambos inhibidores de mTOR, parte de la vía PI3K-Akt, para distintos tipos de cánceres [30]. A pesar de los importantes avances en el campo de la angiogénesis y el cáncer y el optimismo terapéutico, los resultados han sido modestos, haciendo notar la necesidad de la comprensión en mayor detalle del complejo proceso angiogénico.

## 2. Angiogénesis y vasculogénesis.

Durante el desarrollo embrionario, mediante el proceso conocido como vasculogénesis, se forma el plexo vascular primario a partir de células precursoras conocidas como angioblastos. Posteriormente, este sistema vascular primitivo es sujeto a remodelación de los vasos existentes, de los que emergen ramas endoteliales que maduran para dar lugar a nuevos capilares, este proceso se extiende a la etapa postnatal y es conocido como angiogénesis [31]. Entonces, por definición, la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Investigaciones recientes han demostrado que la formación de vasos sanguíneos en la etapa postnatal también puede involucrar la contribución de células progenitoras endoteliales provenientes de la médula ósea [32].

*Vasculogénesis: Participación de Células Progenitoras Endoteliales en la formación de nuevos vasos sanguíneos.*

Durante la etapa embrionaria el hemangioblasto, de origen mesodérmico, se diferencia en células progenitoras hematopoyéticas y en angioblastos, dando origen a los sistemas hematopoyético y vascular respectivamente. El angioblasto es el precursor común para las células endoteliales, pericitos y las células musculares lisas. Estos, proliferan, migran hacia la periferia y forman agregados celulares que más tarde constituirán un plexo vascular primario, conformado por arterias, venas y linfáticos [33-35]. Más allá de la función en el desarrollo embrionario del sistema vascular, se ha demostrado la existencia de células progenitoras endoteliales que persisten durante la etapa posnatal, resguardadas en la médula ósea [36], de donde pueden movilizarse y ser reclutadas a tejidos en los que esté ocurriendo una formación activa de vasos sanguíneos; tal es el caso de los tumores en crecimiento [37-40].

La permanencia de células progenitoras endoteliales en la médula ósea, o bien su movilización hacia la circulación y reclutamiento a sitios activos en la formación de nuevos vasos sanguíneos, depende del reconocimiento de factores angiogénicos secretados por tejidos hipóxicos. Entre tales factores se

incluye el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y la quimiocina SDF1/CXCL12 [39]; ésta última es también considerada un factor de retención de células progenitoras endoteliales, presente en la médula ósea. Aún cuando existe controversia sobre la naturaleza exacta y por consiguiente sobre los marcadores que definen la identidad de las células progenitoras endoteliales, se acepta que en su superficie existen marcadores de células progenitoras hematopoyéticas, así como marcadores específicos de endotelio como la cadherina endotelial vascular, la E-selectina, el receptor tipo 2 para VEGF (VEGFR2) y el receptor Tie2 [33, 41]. Al estar sujetas a movilización por factores angiogénicos, la presencia de células progenitoras endoteliales en sangre periférica podría ser un indicador de un estado angiogénico y servir como parámetro para el monitoreo de una terapia antiangiogénica [42, 43].

*Angiogénesis: Formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes.*

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes se inicia en los capilares adyacentes a tejidos secretores de factores angiogénicos. Las primeras células que responden son las endoteliales, cuyos receptores, en respuesta a los factores angiogénicos, desencadenan una cascada intracelular de transducción de señales que modifican su fenotipo. Puesto que el factor angiogénico se presenta en un gradiente de concentración, no todas las células endoteliales reciben la señal de manera simultánea, dando lugar a que se adquiera una polaridad en la respuesta y se definan sitios de brote a partir de los que se origina una nueva rama endotelial. Recientemente se ha podido demostrar que la respuesta diferencial entre las distintas células endoteliales, que constituyen a un capilar expuesto a un estímulo angiogénico, está determinada por la participación de diversos sistemas de receptores y cascadas de transducción que localmente generan señales positivas pro-angiogénicas y negativas, garantizando la integridad del capilar en los sitios en los que no se genera un brote [44].

Una de las primeras fases de la angiogénesis consiste en una dilatación vascular acompañada de un incremento en la permeabilidad del endotelio. Esto favorece la degradación proteolítica de la membrana basal por metaloproteinasas y la pérdida de los contactos célula-célula entre las células endoteliales [45]. En la matriz extracelular degradada se abre una brecha para que las células endoteliales migren en dirección del estímulo angiogénico. Justo detrás de ellas se activa un proceso de proliferación necesario para generar la masa celular que constituye al nuevo capilar. Posteriormente las células endoteliales maduran, inhibiendo su crecimiento y adecuando su forma para adquirir una estructura tubular de capilar [3], que se consolida con el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso. Así, los capilares recubiertos de pericitos, que sirven de soporte a los tubos endoteliales, son considerados los elementos funcionales finales de una red vascular madura. Los pocos tejidos que en la etapa postnatal desarrollan procesos de angiogénesis incluyen a los órganos reproductivos femeninos (en la edad reproductiva), así como órganos que están bajo crecimiento fisiológico [46] o en la cicatrización de heridas. Los vasos generados como resultado de un proceso de angiogénesis fisiológica maduran rápidamente al establecer las adhesiones célula-célula y célula-sustrato necesarias para consolidar un vaso funcional, volviéndose rápidamente capilares estables.

**3. Estimulación del crecimiento angiogénico.**

El VEGF (VEGF-A) es el factor angiogénico mejor caracterizado y considerado el de mayor relevancia. Este factor forma parte de una familia extensa de reguladores angiogénicos potentes que incluyen al PlGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D. El VEGF-A tiene efectos en las células endoteliales y en sus progenitoras, promoviendo quimiotaxis, proliferación y diferenciación, procesos fundamentales para el ensamble de estructuras vasculares y para el remodelado angiogénico en condiciones fisiológicas y patológicas (Figura 3).

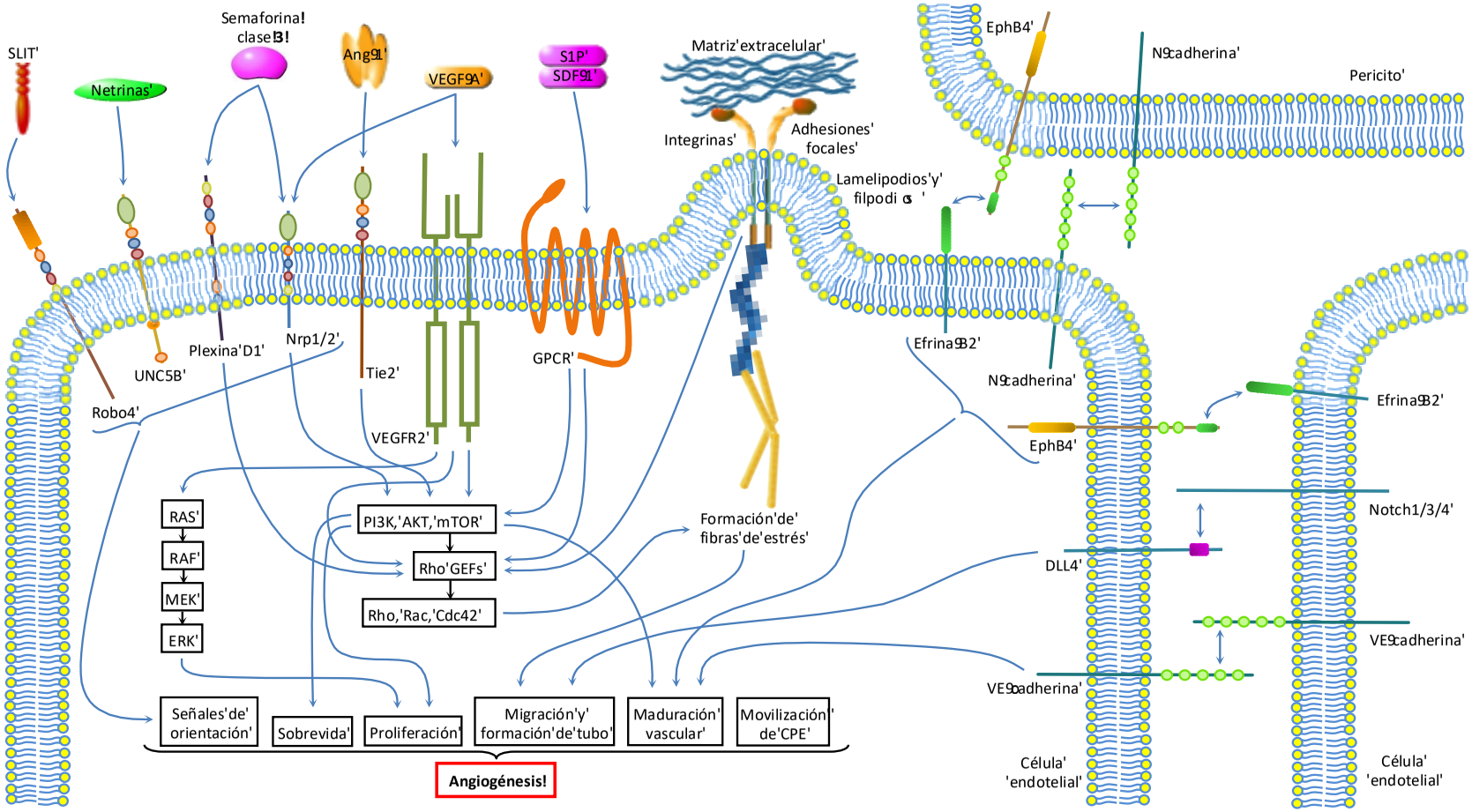

SLIT
Netrinas
Semaforina clase 3
Ang-1
VEGF-A
S1P
SDF-1
Matriz extracelular
Integrinas
Adhesiones focales
Lamelipodios y filopodios
EphB4
N-cadherina
Pericito
Robo4
UNC5B
Plexina D1
Nrp1/2
Tie2
VEGFR2
GPCR
Efrina-B2
N-cadherina
EphB4
Efrina-B2
Notch1/3/4
DLL4
VE-cadherina
VE-cadherina
RAS
RAF
MEK
ERK
PI3K, AKT, mTOR
Rho GEFs
Rho, Rac, Cdc42
Formación de fibras de estrés
Señales de orientación
Sobrevida
Proliferación
Migración y formación de tubo
Maduración vascular
Movilización de CPE
Angiogénesis
Célula endotelial
Célula endotelial

**Figura 3. Mecanismos moleculares de la angiogénesis.** La angiogénesis depende del reconocimiento de los factores angiogénicos, que son reconocidos por receptores específicos. En el caso del VEGF-A, éste activa al receptor VEGFR2 cuya función depende de su dominio intracelular, constituido por una cinasa con especificidad por residuos de tirosina que da lugar a eventos de fosforilación, incluyendo al receptor mismo. Las proteínas efectoras del VEGFR2 pueden dar lugar a la generación de segundos mensajeros que activan a otras proteínas del sistema de transducción de señales. Por ejemplo, el segundo mensajero PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) generado por la acción de la PI3K, lleva a la activación de la cinasa AKT. Además, en la cascada de transducción, se pueden estimular los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs) que activan a las GTPasas de la familia de Rho, provocando la polimerización de actina. Este paso es obligado para la migración celular. Durante el avance, se tienen que establecer nuevas adhesiones con la matriz extracelular, las integrinas son receptores heterodiméricos fundamentales para establecer tales adhesiones e influyen en los cambios morfológicos vinculados a la formación de una nueva estructura tubular. Durante el proceso, las células permanecen adheridas a sus vecinas, mediante la participación de las VE-cadherinas. Además, para consolidar al capilar se atraen a pericitos (células murales) con los que también se establecen interacciones mediadas por receptores. Al igual que los receptores para VEGF, los receptores Tie2 están constituidos por un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular constituido por una cinasa de residuos de tirosina. Recientemente se demostró que en células quiescentes, la activación de estos receptores constituye una señal de sobrevivencia, mientras que en situaciones reminiscentes de un proceso angiogénico, estos mismos receptores están vinculados a procesos de migración celular y proliferación. No todas las células endoteliales que forman parte de los capilares periféricos responden a la presencia del VEGF generando brotes que se extiendan en nuevas ramas. Esto se debe a que existen señales que controlan negativamente el proceso, restringiéndolo espacialmente para que ocurra de manera organizada. Por supuesto, estas señales negativas también son detectadas y transducidas por receptores específicos. Algunos de ellos, cuya función en las células endoteliales está siendo revelada, corresponden a sistemas ligando/receptor que en el sistema nervioso controlan la extensión del cono axonal en la búsqueda del establecimiento de sinapsis. Entre ellos, se ilustran los sistemas SLIT/Robo4, Netrina/Unc5B y Semaforina 3/Plexina D1. Parte de la razón que explica por qué las células adyacentes a la que emite el brote endotelial no hacen lo mismo, se basa en el mecanismo de acción de Notch, este receptor, al ser activado por DLL4 genera una señal negativa que mantiene a la célula quiescente debido a que disminuye la expresión de receptores para VEGF. Este mecanismo de control espacial de la emisión de un brote endotelial se ve fortalecido por la capacidad de las células líderes de la migración de generar DLL4, manteniendo a las células vecinas inhibidas, y de secretar PDGF, que atrae a pericitos que fortalecen el vaso en formación además de inhibir que siga proliferando o extendiéndose. Entre las cascadas de transducción de señales destaca la participación de cinasas y GTPasas de bajo peso, particularmente de la familia de Rho, vinculadas al citoesqueleto de actina y por lo tanto responsables de la migración y cambios en la forma celular, así como la familia de Ras, promotor de la proliferación celular. Otro grupo de receptores que merece una mención especial son los acoplados a proteínas G, estos emplean mecanismos de transducción diferentes pero que son integrados para dar lugar a eventos celulares similares como la activación de cinasas y GTPasas que dirigen la migración celular. Incluso, existe evidencia de que el VEGF y la quimiocina SDF1, secretados por tumores, pueden activar sistemas de señalización intracelular en células de la médula ósea que las lleva a dirigirse al tumor o bien a nichos metastásicos, en donde retroalimentan positivamente el proceso de angiogénesis tumoral. Cabe señalar que en muchos tumores, estos procesos no ocurren a cabalidad, dando lugar a vasos sanguíneos aberrantes.

Además de un aumento en la síntesis y secreción de VEGF, un mecanismo regulador de la biodisponibilidad de este factor depende de la liberación de la fracción asociada a la matriz extracelular. Así, la composición de la matriz extracelular alrededor de la vasculatura puede afectar, positiva o negativamente, el patrón de formación de vasos sanguíneos (Figura 3).

*Selección de células que forman un brote endotelial ante un estímulo angiogénico.*

El crecimiento angiogénico depende de que algunas células endoteliales de los capilares sean seleccionadas para que de ellas se genere un brote que eventualmente dará lugar a una nueva rama capilar y se consolidará en un capilar funcional. Estas células se transforman en líderes, ubicándose al frente de la rama endotelial emergente desde donde dirigen la migración y crecimiento del brote. El mecanismo que controla que no todas las células endoteliales reaccionen indiscriminadamente a la presencia de un factor angiogénico depende de señales negativas locales. Los receptores Notch y su ligando Delta-like-4 (DLL4) son esenciales para este control negativo de la generación inapropiada de brotes durante el proceso de remodelado de los vasos sanguíneos (Figura 3). Una disminución en los niveles de DLL4, o bien un bloqueo en la señalización de Notch, aumenta el número de brotes endoteliales, implicando en un incremento dramático del número de ramas nuevas. El VEGF-A induce la expresión del DLL4 en las células líderes que dirigen el brote endotelial, mientras que Notch, al ser activado en las células endoteliales vecinas, suprime la posibilidad de generar un brote adyacente ya que lleva a una disminución en la expresión de VEGFR2 y VEGFR3, poniendo a las células en desventaja para responder ante la presencia de VEGF [47, 48]. Otro mecanismo por el cual se regula la generación de brotes endoteliales incluye al sistema angiopoyetina-Tie. Los receptores Tie junto con sus correspondientes ligandos (angiopoyetinas) controlan la quiescencia vascular. Existe evidencia de la inducción de angiopoyetina 2 en el sitio de brote endotelial, mientras que la

angiopoyetina 1 promueve la estabilización vascular por distintos mecanismos de señalización [49].

Las células líderes ubicadas al borde de la rama endotelial en formación, que surgen de un brote endotelial y que son seguidas por una columna de células endoteliales en proliferación, deben integrar una serie de señales quimioatrayentes y repulsivas que determinan de manera muy precisa las rutas de extensión del capilar en formación. Estas células responden a gradientes de diversos factores de crecimiento entre los que destaca principalmente el VEGF, de quimiocinas como el SDF1/CXCL12 y de moléculas originalmente descritas por su papel esencial en la extensión neuronal. Esto hace evidente el paralelismo existente entre las vías angiogénicas y neurogénicas, pues comparten las señales que guían su crecimiento. Entre los sistemas de ligandos y receptores cuya función determina las rutas de extensión, tanto de capilares en formación como de conos de crecimiento axonal se incluyen: Slit/Robo, Semaforina/Neuropilina/Plexina, Netrina/Unc5 y efrinas/Receptores para Efrinas (Figura 3). Estos sistemas de ligandos y receptores, junto con los sistemas intracelulares de transducción de señales que activan, participan en el remodelado embrionario del sistema de vasos sanguíneos y, de acuerdo a evidencias recientes, también en procesos de angiogénesis tumoral [50, 51]. Ejemplo de este sistema ligando-receptor que marca el camino por el que las células líderes de la migración endotelial avanzan incluye a la Semaforina 3E, cuya presencia les indica hacia dónde no dirigirse, ya que al ser reconocida por la Plexina D1, expresada en las células endoteliales se genera una señal intracelular que deriva en movimiento celular en la dirección contraria a la localización de la Semaforina.

*Consecuencias de la generación de brotes endoteliales y de la quimiotaxis.*

Las células endoteliales ubicadas al frente del brote adquieren una conducta invasiva y móvil, activan proteasas que degradan localmente la membrana basal subendotelial. Durante este proceso, la integridad del capilar se mantiene gracias a las uniones célula-célula entre las células adyacentes. La expresión

de VEGFR2 hacia el frente del brote, orienta a las células endoteliales hacia un gradiente de concentración de la isoforma VEGF165 asociada a la matriz extracelular que funciona como una señal quimioatrayente [52]. Esto causa cambios dramáticos en la forma de la célula líder del brote endotelial, misma que genera extensiones polarizadas conocidas como filopodios, constituidos por extensiones membranales digitiformes que se extienden hacia el frente de las células que migran. Esas extensiones están estructuradas por la polimerización de los filamentos de actina en respuesta a la transducción de señales del estímulo quimiotáctico [53]. Finalmente, estas extensiones celulares en dirección al quimioatrayente establecen adhesiones a la matriz extracelular contribuyendo al desplazamiento de la célula. La proliferación de las células endoteliales es promovida por una isoforma difusible del VEGF-A (VEGF120). La definición del perfil vascular es influida por sistemas adicionales de regulación, tales como la intervención de correceptores, como las neuropilinas, que pueden asociarse a los receptores clásicos para VEGF. Las células líderes del brote endotelial atraen a los pericitos que fortalecerán al capilar en formación. El mecanismo depende de la secreción de PDGF que es un quimioatrayente para los pericitos, ya que estas células expresan al PDGFRβ, receptor para este factor. Con base en estos conocimientos, se ha propuesto que la inhibición de la migración, tanto de células endoteliales como de pericitos, podría representar una ventaja adicional en una terapia antiangiogénica [52, 54, 55] (Figura 5).

*Evolución de los brotes endoteliales a vasos sanguíneos maduros.*

Para formar nuevas conexiones vasculares, las células líderes de la rama endotelial en crecimiento deben suprimir su motilidad y establecer interacciones con otros capilares, de forma que eventualmente se pueda cerrar el circuito endotelial. El establecimiento del flujo sanguíneo requiere de la formación del lumen vascular, proceso que se asocia fuertemente a la formación de vacuolas mediante el proceso de pinocitosis. La lumenización involucra un cambio importante en la forma celular que requiere de la contribución de la maquinaria

de adhesión celular, particularmente de receptores de la familia de las integrinas y de la activación de GTPasas pequeñas de la familia de Rho, en particular Cdc42 y Rac1 [56, 57]. La activación de Rho, Rac y Cdc42 promueve la polimerización de actina y los cambios en la forma celular que resultan en consecuencia. La formación del lumen y la tubulogénesis también son controlados por la proteína EGFL7 [58]. Finalmente, el reclutamiento de pericitos y la síntesis de proteínas de matriz extracelular que constituyen la membrana basal subendotelial, junto con la reducción en la proliferación endotelial, resultan en la maduración de los capilares recién formados. En el cáncer pueden presentarse alteraciones en las distintas etapas del proceso, dando lugar a vasos sanguíneos aberrantes.

**4. Factores angiogénicos y sus receptores.**

El VEGF-A (comúnmente llamado VEGF) constituye el ejemplo más sobresaliente entre los factores angiogénicos descritos. Su inhibición ha demostrado utilidad en la terapéutica antiangiogénica contra distintos tipos de cáncer (Figura 3). Este factor en condiciones de hipoxia es secretado por células tumorales, teniendo entonces una función patológica asociada a la formación de vasos sanguíneos tumorales. El VEGF fue identificado en 1983, por Senger y Dvorak, quienes lo caracterizaron como un factor de permeabilidad vascular (VPF) [26]. De forma independiente, en 1989, Ferrara y colaboradores identificaron al VEGF [27] y ambos grupos coincidieron en que tanto el factor de permeabilidad vascular como el VEGF corresponden a la misma molécula, evidenciando la importancia y variedad de funciones atribuibles a este importante agente vascular [28]. Así como el VEGF-A, otros miembros de la familia del VEGF son producidos por tumores humanos, incluyendo al VEGF-C y al VEGF-D [59]. El PlGF es otro miembro de la familia del VEGF que también se ha asociado al cáncer y a otras patologías [60]. Existen 3 grupos de receptores para VEGF. El receptor al que se le ha atribuido un papel preponderante en el proceso de angiogénesis postnatal, incluyendo a la angiogénesis tumoral, es al receptor VEGFR2. El VEGFR1 se considera un

modulador de la función del VEGFR2, ya que puede unir al ligando pero no transduce eficientemente la señal. Por su parte, el VEGFR3 se expresa particularmente en endotelio linfático y responde en especial a VEGF-C y VEGF-D.

Las angiopoyetinas constituyen otro grupo de péptidos también involucrados en la angiogénesis [61] que son reconocidas por los receptores Tie. En particular, se les atribuye una función en el proceso de incorporación de pericitos al vaso. Además se han descrito numerosos factores angiogénicos inespecíficos que actúan tanto en las células endoteliales como en muchas otras. Entre ellos destacan: el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-$\beta$), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la interleucina 8 (IL-8), el factor derivado del estroma (SDF-1/CXCL12) (Figura 3). Además, las condiciones hipóxicas asociadas al crecimiento tumoral activan al factor inducible por hipoxia 1$\alpha$ (HIF-1$\alpha$), el cual promueve la expresión de muchos factores angiogénicos, incluyendo a algunos de los mencionados.

## 5. Alteraciones en la formación de vasos sanguíneos.

*Enfermedades dependientes de la angiogénesis.*

En la etapa postnatal, la angiogénesis contribuye al crecimiento de órganos; mientras que durante la etapa adulta, la mayoría de los vasos sanguíneos permanecen quiescentes. En condiciones normales, la angiogénesis posnatal sólo ocurre en la reparación de heridas y, en el caso de las mujeres, durante el ciclo ovárico, y en la placenta durante el embarazo, siendo un fenómeno focal que se autolimita en tiempo. Sin embargo, las células endoteliales conservan su capacidad proliferativa, misma que se evidencia en respuesta a estímulos como la hipoxia. En varias enfermedades, el estímulo angiogénico es excesivo, perdiéndose el balance entre promotores e inhibidores de la angiogénesis, resultando en la activación del proceso angiogénico “*switch* angiogénico”, que puede persistir por años y acompañarse de hemorragia, edema y destrucción

tisular. Las condiciones patológicas más conocidas donde ocurre el *switch* angiogénico son las enfermedades neoplásicas, oculares e inflamatorias, pero también se presenta en muchas otras patologías como: obesidad, asma, diabetes, cirrosis, esclerosis múltiple, endometriosis, SIDA, infecciones bacterianas y enfermedades autoinmunes (Tabla 1). En otras enfermedades como la isquemia miocárdica o la preeclampsia, el *switch* angiogénico es insuficiente, causando una disfunción endotelial, regresión o malformación vascular o prevención de la revascularización, cicatrización y regeneración (Tabla 2, Figura 2).

**Tabla 1. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis excesiva [62].**

| Órgano | Enfermedades en ratones o humanos |
|---|---|
| Numerosos órganos | Cáncer y metástasis; enfermedades infecciosas; péptidos antimicrobianos o infecciones bacterianas que incrementan los niveles de HIF-1; HIV; vasculitis y angiogénesis en enfermedades auntoinmunes (esclerosis sistémica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren). |
| Vasos sanguíneos | Malformaciones vasculares; Síndrome de DiGeorge; Telangiectasia hemorrágica hereditaria; hemangioma cavernoso; hemangioma cutáneo; arteriopatía por transplante y ateroesclerosis. |
| Tejido adiposo | Obesidad (angiogénesis inducida por: dieta grasa, pérdida de peso por inhibidores angiogénicos, anti-VEGFR2 y adipocitocinas). |
| Piel | Psoriasis; verrugas; dermatitis alérgica; cicatrices queloides; granuloma piógeno; enfermedad ampular; sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA y esclerosis sistémica. |
| Ojos | Síndrome de vítreo hiperplásico persistente; retinopatía diabética; retinopatía del prematuro y neovascularización coroidal. |
| Tracto respiratorio | Hipertensión pulmonar primaria; asma; pólipos nasales; rinitis; Inflamación crónica de la vía aérea y fibrosis quística. |
| Tracto gastrointestinal | Colitis ulcerativa; enfermedad periodontal; ascitis; adhesiones peritoneales y cirrosis hepática. |
| Sistema reproductivo | Endometriosis; hemorragia uterina; quistes ováricos e hiperestimulación ovárica. |
| Huesos y articulaciones | Artritis y sinovitis; osteomielitis; formación de osteofitos y angiogénesis de la médula ósea inducida por HIV. |
| Riñones | Nefropatía diabética (etapa temprana: capilares glomerulares agrandados). |

Hasta el momento, la angiogénesis se ha asociado a más de setenta enfermedades y, gracias al esfuerzo de grupos de investigación en el mundo, se siguen identificando enfermedades asociadas al proceso angiogénico. Por lo anterior, la habilidad para controlar el crecimiento de los vasos sanguíneos

representa un beneficio terapéutico considerable. Las estrategias terapéuticas valoradas en la actualidad están orientadas, en su mayoría, a afectar directamente a la célula endotelial [62, 63].

**Tabla 2. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis insuficiente o regresión vascular [62].**

| Órgano | Enfermedades en ratones o humanos |
|---|---|
| Sistema nervioso | Enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; neuropatía diabética y evento vascular cerebral isquémico. |
| Vasos sanguíneos | Diabetes; hipertensión; ateroesclerosis y reestenosis. |
| Piel | Alopecia; púrpura; telangiectasia; formación de lagos venosos; esclerosis sistémica y lupus eritematoso |
| Tracto gastrointestinal | Úlceras orales o gástricas y enfermedad de Crohn. |
| Tracto respiratorio | Síndrome de distrés respiratorio neonatal; fibrosis pulmonar y enfisema pulmonar. |
| Sistema reproductivo | Preeclampsia y hemorragia uterina. |
| Huesos | Osteoporosis y alteración en la cicatrización de fracturas. |
| Riñones | Nefropatía (envejecimiento, síndrome metabólico); glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial. |
| Corazón | Enfermedad isquémica e insuficiencia cardiaca. |

*Angiogénesis fisiológica versus angiogénesis tumoral.*

Durante la vasculogénesis embrionaria, los vasos sanguíneos son formados *de novo*, a partir de células endoteliales precursoras (angioblastos) que ensamblan un plexo capilar primario. A partir de esta red primitiva, geman y se ramifican nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis [31]. La vasculatura en el adulto es por lo general quiescente, y las células endoteliales se encuentran entre las más longevas. De hecho, el recambio de células endoteliales está reportado en años para tejidos que no requieren angiogénesis. Los pocos tejidos que desarrollan procesos de angiogénesis incluyen a los órganos reproductivos femeninos, órganos que están bajo crecimiento fisiológico [46] o tejidos dañados.

Este proceso angiogénico normal se mantiene altamente regulado por un balance entre las señales pro- y anti-angiogénicas, en esto difiere de la angiogénesis patológica en la que el equilibrio entre estas señales se pierde a

favor de las señales proangiogénicas. Durante la angiogénesis fisiológica, los nuevos vasos maduran rápidamente y se vuelven estables. En contraste, los tumores, en ocasiones descritos como “heridas que nunca curan” [64], fracasan en hacerse quiescentes, permitiendo el crecimiento constante de los vasos sanguíneos. Consecuentemente, la vasculatura tumoral desarrolla características únicas que son completamente distintas del sistema vascular normal.

Los vasos sanguíneos tumorales presentan una arquitectura diferente de los de su contraparte normal, pues presentan una forma irregular, son dilatados, tortuosos y pueden presentar ramificaciones en fondo de saco. Además, los vasos tumorales no están organizados en vénulas, arteriolas y capilares como su contraparte normal, más bien presentan características de las tres estructuras de una manera caótica. La red vascular que se forma en los tumores es frecuentemente fenestrada y hemorrágica, debido parcialmente a la sobreproducción de VEGF. Las células perivasculares, las cuales usualmente están en contacto íntimo con el endotelio, a menudo se encuentran en menor cantidad y con una asociación más débil [65, 66]. Se ha reportado que los vasos tumorales tienen células cancerosas integradas en la pared del vaso [67, 68], y algunos tumores dependen fuertemente del reclutamiento de células precursoras endoteliales de la médula ósea [69].

Los tumores pueden ser completamente heterogéneos en su patrón vascular, e incluso ser capaces de sobreproducir una red de capilares disfuncionales. En los vasos tumorales, el flujo sanguíneo irregular puede resultar lento y en ocasiones oscilante, lo que induce la formación de capilares disfuncionales. En contraste, en tejidos normales, la densidad de vasos sanguíneos es controlada dinámicamente por las necesidades metabólicas de nutrientes y oxígeno. Entonces, las anormalidades estructurales y funcionales en los vasos tumorales reflejan la naturaleza patológica de su inducción. Aunque no se conocen completamente los mecanismos que controlan estas anormalidades, se supone que son el resultado del desequilibrio en la expresión y función de los factores angiogénicos.

## 6. Angiogénesis tumoral.

En el cáncer, el tejido nuevo que resulta de la proliferación descontrolada de células tumorales requiere para crecer, al igual que cualquier tejido normal, del suministro de oxígeno y nutrientes. De tal forma que junto con el crecimiento tumoral ocurre la generación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan al tumor en crecimiento. Este proceso, conocido como angiogénesis tumoral, es vital para el crecimiento del tumor y para el establecimiento de metástasis; por consiguiente, ha sido reconocido como un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer (Figura 4) [62, 63, 70, 71].

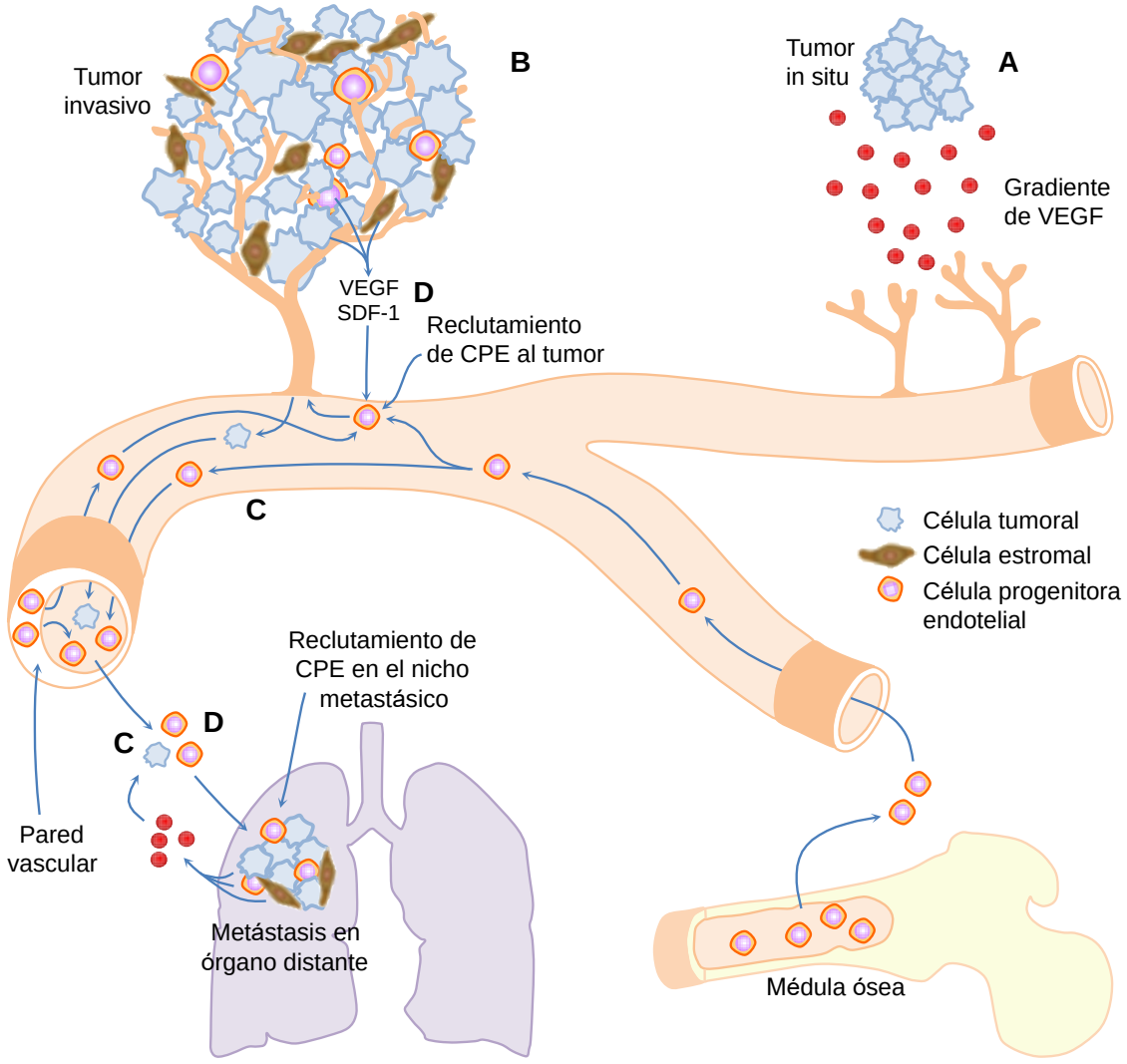


**Figura 4. Angiogénesis tumoral. A.** En condiciones de hipoxia, las células neoplásicas y del estroma que quedan atrapadas en el centro de la masa tumoral expresan una capacidad angiogénica consistente en la liberación de factores, como el VEGF, que estimulan la formación de vasos sanguíneos. **B.** De esta forma favorecen el crecimiento del tumor al asegurar el suministro de oxígeno y nutrientes que les permiten cubrir sus requerimientos metabólicos, este fenómeno es conocido como angiogénesis tumoral. **C.** Las células tumorales también se diseminan a órganos distantes vía los vasos sanguíneos asociados al tumor o las vasos sanguíneos del ganglio centinela. **D.** Las células del estroma tumoral (fibroblastos, células inflamatorias y del sistema inmune) constituyen una fuente adicional de factores angiogénicos, producen quimiocinas como el SDF-1 que recluta células progenitoras endoteliales, derivadas de la médula ósea, que participan activamente en la neovascularización en el sitio tumoral primario o en el nicho metastásico. Además, se ha sugerido fuertemente la existencia de un proceso de movilización de células progenitoras endoteliales residentes en la pared de los vasos sanguíneos para contribuir a este pool de células progenitoras endoteliales circulantes.

Además, aún cuando tradicionalmente se ha considerado que la formación de vasos sanguíneos en la etapa postnatal ocurre mediante angiogénesis a partir de capilares existentes, recientemente se ha descubierto que células progenitoras residentes en la médula ósea pueden responder a los factores angiogénicos de origen tumoral y contribuir, en mayor o menor grado, a la angiogénesis tumoral y, en particular, al establecimiento de nichos metastásicos. Esta situación, cuyo grado de contribución a la generación de vasos tumorales se encuentra en franco debate [37, 72, 73], genera una serie de posibilidades terapéuticas interesantes, ya que permite vislumbrar la posibilidad de utilizar a las células de la médula ósea como vehículos terapéuticos para el tratamiento del cáncer [38, 74-77].

La investigación básica en el campo de la angiogénesis tumoral se ha enfocado en la caracterización de las moléculas y procesos celulares que se relacionan con el reconocimiento de los factores angiogénicos de origen tumoral por parte de células endoteliales y progenitoras. Así como en el estudio de las cascadas de señalización intracelulares que establecen la dinámica de eventos relacionados con la angiogénesis tumoral, tales como cambios en el citoesqueleto, promoción de la expresión de genes, secreción de proteasas que permiten remodelar la matriz extracelular y liberar factores quimiotácticos y de crecimiento atrapados en ella; entre otros que, en conjunto, promueven el

movimiento, proliferación y remodelado de células endoteliales para dar lugar a la formación de nuevas estructuras tubulares.

Ante la premisa de que el crecimiento tumoral y el establecimiento de metástasis requieren de la formación de capilares sanguíneos, la identificación de proteínas cuya actividad sea indispensable para la formación de estos, permitiría el diseño inteligente de fármacos, que redundaría en la mejora significativa en la sobrevida y calidad de vida de los pacientes con cáncer [62, 63, 70].

La capacidad angiogénica de los tumores reside en su habilidad para secretar factores que promueven la generación de nuevos vasos sanguíneos. Un tumor incipiente crece hasta alcanzar el límite que le asegure que sus células reciban el oxígeno necesario para cubrir sus requerimientos metabólicos y mantenerse vivas. De acuerdo a este límite, un microtumor avascular alcanza un diámetro cercano a los 2 mm, después del cual requiere generar sistemas que le permitan el aporte de oxígeno y nutrientes. Así pues, aquellas células que al proliferar la masa tumoral van quedando más alejadas de los capilares existentes, caen en una situación de hipoxia que en sí misma genera una señal intracelular que es trasladada al núcleo de la célula, promoviendo la expresión de genes en respuesta a la falta de oxígeno. El ejemplo paradigmático de esta situación lo ilustra el mecanismo de acción del factor de transcripción regulado por hipoxia, conocido como HIF1α (llamado así por sus siglas en inglés que corresponden a *Hypoxia Inducible Factor*), entre cuyos genes blanco se encuentra el que codifica para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) [78, 79] y el receptor para la quimiocina CXCL12 o SDF-1, CXCR4, cuya expresión favorece el establecimiento de metástasis [80, 81]. Muchos de estos factores angiogénicos expresados por los tumores son los mismos cuya función es fundamental durante el desarrollo normal de la vasculatura en el periodo embrionario.

Las células tumorales alteran el equilibrio existente entre los factores inductores e inhibidores de la angiogénesis [46], favoreciendo un estado angiogénico. La etapa de transición entre un estado no vascularizado que limita el crecimiento

tumoral y un estado de formación rápida de vasos sanguíneos se conoce como "*switch* angiogénico" [46]. La inducción del *switch* angiogénico depende del desequilibrio en la balanza que representa la acción de moléculas antiangiogénicas y proangiogénicas en favor de estas últimas.

Diversos posibles marcadores del proceso angiogénico se encuentran en estudios preclínicos y clínicos; sin embargo, ninguno ha sido validado para el uso clínico rutinario. El empleo de éstos sería de mucha utilidad para detectar y monitorear la actividad angiogénica, la actividad de los fármacos antiangiogénicos, el estudio y desarrollo de nuevos fármacos o la mejora de los fármacos disponibles en la actualidad respecto a la definición de la dosis óptima o el diseño de terapias combinadas. Además, contribuiría a validar la posibilidad invaluable de predecir la respuesta hacia la terapia antiangiogénica, sabiendo de antemano lo complicado que esto resulta, por la multiplicidad de mecanismos angiogénicos y la heterogeneidad intrínseca de los tumores [82, 83].

## 7. Terapia anti- y pro-angiogénica.

*Tratamiento antiangiogénico.*

La primera paciente que recibió una terapia antiangiogénica fue tratada en 1988 de hemangiomatosis pulmonar y hasta la fecha se encuentra saludable y libre de enfermedad. En febrero del 2004, la FDA aprobó el Avastin (Bevacizumab), un anticuerpo monoclonal humanizado, para el cáncer de colon metastásico. Desde la aprobación del Avastin, un fármaco antiangiogénico para el tratamiento de pacientes con cáncer de colon, se ha considerado a esta estrategia como la cuarta modalidad de terapia anticancerosa. El Avastin es pues el primer inhibidor angiogénico que demostró prolongar la sobrevida en un extenso ensayo clínico en pacientes con cáncer avanzado. La FDA en EU y agencias equivalentes en otros 30 países han aprobado alrededor de 10 nuevos fármacos, cuya actividad antiangiogénica es considerada como central en su efecto terapéutico anticanceroso. Existen, además, por lo menos otros 43

fármacos con actividad antiangiogénica que está siendo estudiada en diversos ensayos clínicos. Los inhibidores angiogénicos pueden ser considerados en dos categorías, aquellos que son exclusivamente antiangiogénicos, como el Avastin y el VEGF-Trap, y aquellos (llamados inclusivos) que tienen otras funciones y adicionalmente actividad antiangiogénica. De hecho, muchos inhibidores angiogénicos inclusivos fueron aprobados por la FDA gracias a sus efectos terapéuticos independientes de la angiogénesis, antes incluso de conocer su actividad antiangiogénica. De hecho, en la mayoría de los casos se desconoce el mecanismo de acción antiangiogénico. Tal es el caso, por ejemplo, del Celecoxib, un antiinflamatorio no esteroideo que inhibe con alta selectividad a la ciclooxigenasa-2 (Tabla 3, Figura 5).

**Tabla 3. Inhibidores angiogénicos [84].**

| **Fármacos *exclusivamente* antiangiogénicos** | **Fármacos que *incluyen* actividad antiangiogénica** |
|---|---|
| Aprobados por la FDA | Aprobadas por la FDA |
| Avastin (anticuerpo anti-VEGF, bevacizumab) | Celecoxib (Celebrex)<br>Cetuximab (Erbitux)<br>Herceptin<br>Iressa (inhibe la producción de VEGF por el tumor)<br>Rosiglitazona<br>Taxol (dosis continuas ultra bajas)<br>Talidomida<br>Velcade (inhibidor del proteosoma PS-341)<br>Ácido zoledrónico (Bisfosfonato) |
| En ensayos clínicos | |
| Angiostatina<br>Endostatina<br>Tetrahidrocortisol<br>TNP-470<br>Péptido tromboespondina (ABT 510)<br>VEGF-Trap<br>Vitaxina | |
| En ensayos preclínicos | En ensayos clínicos |
| Arresten<br>Canstatina<br>Rompe Antitrombina III<br>DBP-maf<br>PEDF<br>Tumstatina | AG013736<br>BAY 43-9006<br>CP547632<br>Combretastatina<br>Interferon-alfa<br>NM-3<br>Erlotinib (Tarceva)<br>PTK787<br>SU 5416<br>SU 6668<br>SU 11248<br>2-metoxyestradiol |

*Inhibidores angiogénicos endógenos*.

El trabajo pionero del grupo del recientemente fallecido Dr. Folkman, seguido por muchos otros grupos, ha contribuido a demostrar la existencia de inhibidores angiogénicos endógenos. Más de tres decenas de ellos han sido descubiertos desde 1980 a la fecha. Los inhibidores angiogénicos endógenos ayudan a suprimir la angiogénesis patológica, pues la manipulación genética de tales inhibidores, de sus receptores o bien de enzimas que participan en su liberación, mostraron un incremento en la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Evidencias recientes sugieren que los inhibidores angiogénicos endógenos pueden ser incrementados farmacológicamente. Al menos seis moléculas pequeñas, las cuales están aprobadas por la FDA para su utilización en diversas enfermedades, pueden incrementar los niveles de la endostatina o trombospondina-1. Esta novedosa forma de terapia puede ser guiada por biomarcadores, de forma tal que para monitorear el beneficio farmacológico de tales tratamientos no hay que esperar a que el tumor incremente su tamaño y pueda ser detectado por los métodos convencionales.

*Tipos de inhibidores angiogénicos*.

Los inhibidores angiogénicos han sido clasificados en tres categorías. Los inhibidores Tipo I bloquean una sola proteína angiogénica y con el tiempo pueden perder su efecto debido al desarrollo de resistencia, la cual se puede evitar cuando se combinan con otros inhibidores angiogénicos o con la quimioterapia antiangiogénica metronómica (bajas dosis administradas frecuentemente). Estos inhibidores se han asociado con un incremento en el riesgo de enfermedad tromboembólica y cardiopatía isquémica. Los inhibidores angiogénicos Tipo II bloquean dos o tres proteínas angiogénicas y sus efectos también se pueden aumentar cuando se administran en combinación con otros inhibidores angiogénicos o con la quimioterapia metronómica. Los inhibidores angiogénicos Tipo III son definidos por tener un amplio espectro de blancos antiangiogénicos [63] (Tabla 4).

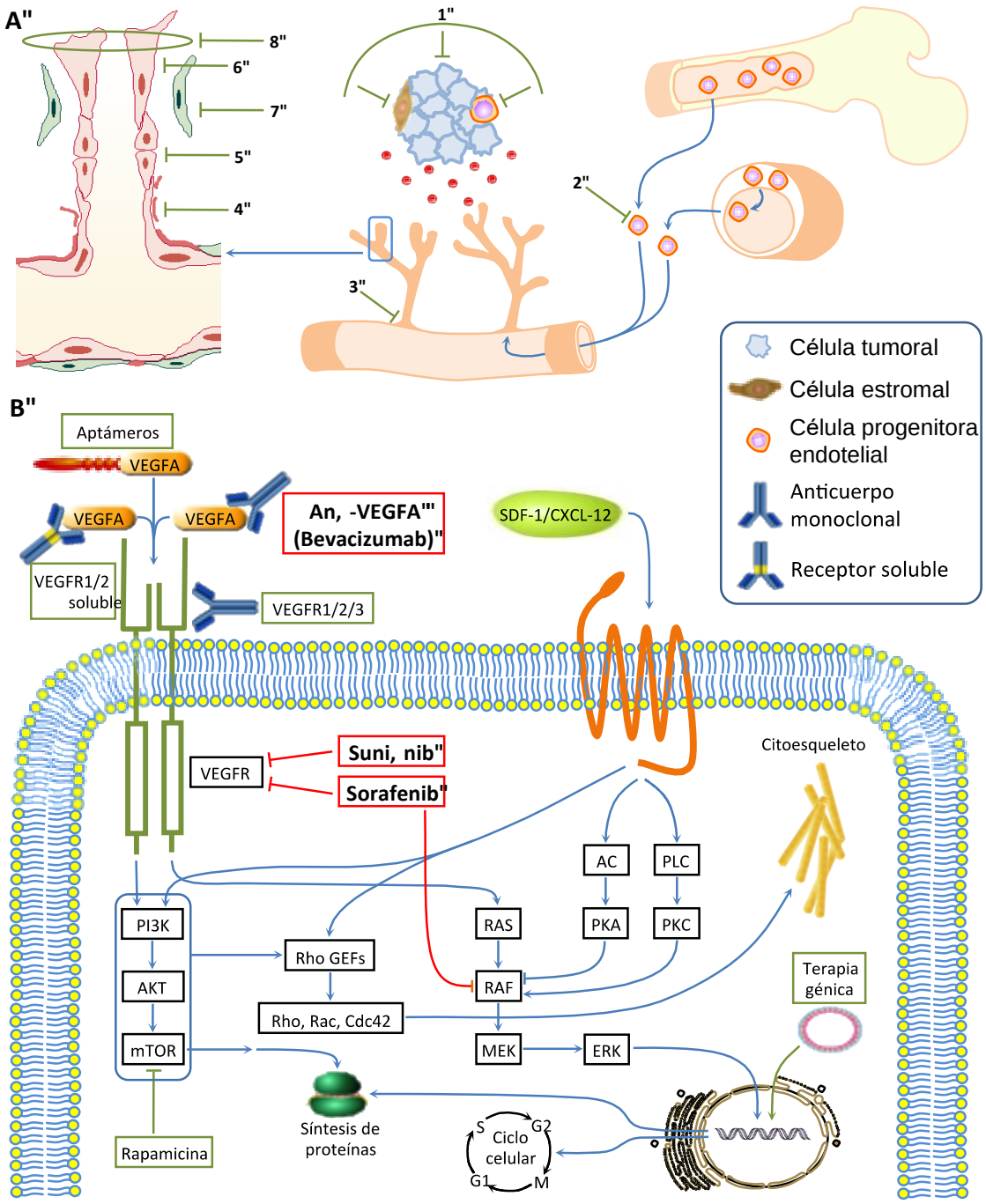



**Figura 5. Bases moleculares de la terapia antiangiogénica. A.** Cada uno de los procesos celulares vinculados a la angiogénesis tumoral depende de la acción de proteínas específicas que representan un blanco potencial para la acción de agentes antiangiogénicos en el tratamiento del cáncer. Las principales estrategias se han dirigido al bloqueo de los factores angiogénicos secretados por células neoplásicas o del estroma tumoral (1). Otras estrategias en investigación están enfocadas a inhibir: (2) la migración de células progenitoras endoteliales y poblaciones proangiogénicas que son reclutadas de la medula ósea, (3) la generación de brotes

angiogénicos, promoviendo la inducción de inhibidores angiogénicos endógenos como la endostatina, (4) la acción de metaloproteasas de matriz extracelular, para impedir que se liberen factores angiogénicos atrapados en ella, así como bloquear el establecimiento de caminos para la migración y extensión del brote angiogénico, (5) la proliferación de las células endoteliales que constituyen la rama endotelial en formación, (6) la migración de células endoteliales y de pericitos (7), y, por último, (8) los cambios morfológicos requeridos para el desarrollo de capilares funcionales. Por otro lado, considerando que con frecuencia los vasos sanguíneos tumorales tienen una estructura y función aberrantes, una alternativa terapéutica consiste en promover la normalización de la vasculatura tumoral, con la intención de conseguir una mejor distribución de las terapias citotóxicas en el tumor, favoreciendo el efecto citotóxico. **B.** Los factores angiogénicos, sus receptores y las proteínas que transducen las señales angiogénicas de origen tumoral constituyen blancos reales o potenciales para la acción de agentes antiangiogénicos. En negritas se indican los agentes terapéuticas antiangiogénicos de uso clínico en pacientes con cáncer. Los grupos de receptores asociados a la formación tumoral de vasos sanguíneos, ilustrados en la figura 2, también están siendo objeto de estudio como blancos terapéuticos. En vista de las particularidades inherentes a los distintos tipos de cáncer, se prevé que las terapias antiangiogénicas deberán estar basadas en la identificación de los grupos de receptores y sistemas de transducción relevantes en cada situación.

Entre los agentes terapéuticos en uso se encuentran anticuerpos contra VEGF y moléculas pequeñas que inhiben la capacidad catalítica (de cinasa de tirosina) del receptor VEGFR2. Se vislumbra la utilización de receptores solubles para atrapar a los factores angiogénicos sin conducir a una señal en la célula endotelial. Así como de moléculas inhibidoras de las interacciones proteína-proteína indispensables para ensamblar los complejos de transducción de señales. Además, otros inhibidores de cinasas y de otras actividades catalíticas, como las de los factores que promueven la activación de las GTPasas de la familia de Rho, relacionadas con la migración celular. Asimismo, se considera que la terapia génica, que aún no tiene una repercusión clínica cotidiana, ofrece posibilidades de aplicaciones antiangiogénicas basadas en estrategias que interfieran con la expresión de las distintas proteínas relevantes en el proceso de angiogénesis tumoral, mediante el uso de sistemas de RNA de interferencia. O bien el empleo de genes suicidas en células progenitoras endoteliales, y otras poblaciones proangiogénicas obtenidas de la médula ósea, usadas como “caballos de Troya”. Su aplicación en modelos animales de cáncer ha dado resultados alentadores que sugieren que pueden ser empleadas como terapia antineoplásica debido a que se insertan específicamente en el tejido maligno y contribuyen a su destrucción.

En cuanto a los marcadores que permitirán monitorear el efecto de las diversas terapias antiangiogénicas, se considera que determinar los niveles circulantes de VEGF y otros factores angiogénicos, así como la presencia en sangre de células progenitoras endoteliales, es un indicador de un estado angiogénico y eventualmente servirá como un marcador para conocer la efectividad terapéutica de los agentes antiangiogénicos.

En general, los inhibidores angiogénicos actúan neutralizando a las proteínas angiogénicas producidas por las células tumorales, bloqueando la interacción de dichas proteínas con sus receptores, o bien actúan directamente sobre células endoteliales microvasculares del lecho vascular tumoral, inhibiendo su

migración y proliferación. Los inhibidores angiogénicos ahora están siendo aprobados e introducidos en la práctica médica, no sólo en el tratamiento del cáncer, sino también en varias enfermedades relacionadas con el proceso angiogenético, gracias al esfuerzo conjunto de investigadores de todo el mundo por encontrar estigmas moleculares que permitan diagnosticar cada vez más temprano las enfermedades angiogénesis dependiente y de esta manera diseñar terapias pro- y anti-angiogénicas que en las próximas décadas beneficien a millones de personas.

**Tabla 4. Tipos de inhibidores angiogénicos** [63]**.**

| Tipo | Mecanismo | Ejemplo |
|---|---|---|
| I | Bloquea 1 proteína angiogénica principal | **Avastin** (bloquea al VEGF)<br>**VEGF-Trap** (bloquea al VEGF) |
| II | Bloquea 2 ó 3 proteínas angiogénicas | **Sugen 11248** (regula a la baja al VEGFR2, PDGFR y c-kit-R)<br>**Iressa** (regula a la baja la producción de VEGF, bFGF y TGF-a por las células tumorales) |
| III | Bloquea un amplio espectro de reguladores angiogénicos. | **Endostatina** (regula a la baja al VEGF, bFGF, bFGFR, HIF1a, EGFR, ID-1, Neuropilina y regula a la alza a la Tromboespondina-1, Maspina, inhibidor de HIF1a y TIMP-2)<br>**HPMA-TNP-470** (amplio espectro anti-cáncer) |

*Tratamiento proangiogénico.*

En enfermedades donde el estímulo angiogénico es insuficiente, como en la isquemia miocárdica y la preeclampsia, se han desarrollado estrategias terapéuticas que promueven la revascularización de los tejidos isquémicos. Si bien los resultados han sido alentadores, hasta ahora no se ha obtenido el beneficio clínico esperado (factores angiogénicos como VEGF y FGF) [85]. El principal problema es causar angiogénesis tanto en el tejido isquémico como en el tejido sano, causando efectos indeseables. Este problema, ha sido abordado mediante la administración sistémica de nitritos que favorecen la formación de óxido nítrico, mismo que además de sus funciones clásicas como la vasodilatación, estimula selectivamente al tejido isquémico, promoviendo la

expresión de factores de factores angiogénicos que estimulan el crecimiento de vasos nuevos y/o inmaduros y promoviendo la estabilidad vascular, a través de reclutar células murales perivasculares [86, 87]. Además de la terapéutica proangiogénica basada en los factores angiogénicos, recientemente se evalúa la movilización de células progenitoras endoteliales (CPE) a partir de la médula ósea hacia los tejidos isquémicos como potencial estrategia inductora de neovascularización [88, 89]. El reclutamiento de las CPE a los sitios isquémicos, es un mecanismo mediado por moléculas como el factor derivado de células estromales-1 (SDF-1) y algunas integrinas. Además, el reclutamiento potencial de las CPE a las áreas isquémicas se puede aprovechar combinándolas con agentes farmacológicos que mejoren las condiciones isquémicas [90].

## B. Migración de células endoteliales.

La migración de células endoteliales vasculares es un proceso fundamental en la formación de vasos sanguíneos y puede ser vista como el resultado integrado de una serie de eventos discretos que dan lugar al desplazamiento neto del cuerpo celular. Inicialmente, las células adquieren un fenotipo polarizado constituido por una parte frontal y una parte trasera, se acompaña de una distribución asimétrica de moléculas de señalización y de una organización asimétrica del citoesqueleto. En el polo de avance celular, la polimerización de actina y la disminución localizada de la tensión membranal inducen la proyección de un lamelipodio. Este proceso es controlado por señales extracelulares que incluyen factores solubles (factores de crecimiento y quimiocinas) y a la matriz extracelular [91]. Varias moléculas de señalización, incluyendo las GTPasas de bajo peso molecular (Rho, Rac y Cdc42) y la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR, se han implicado en la migración de la célula endotelial en respuesta a factores de crecimiento (Figura 6).

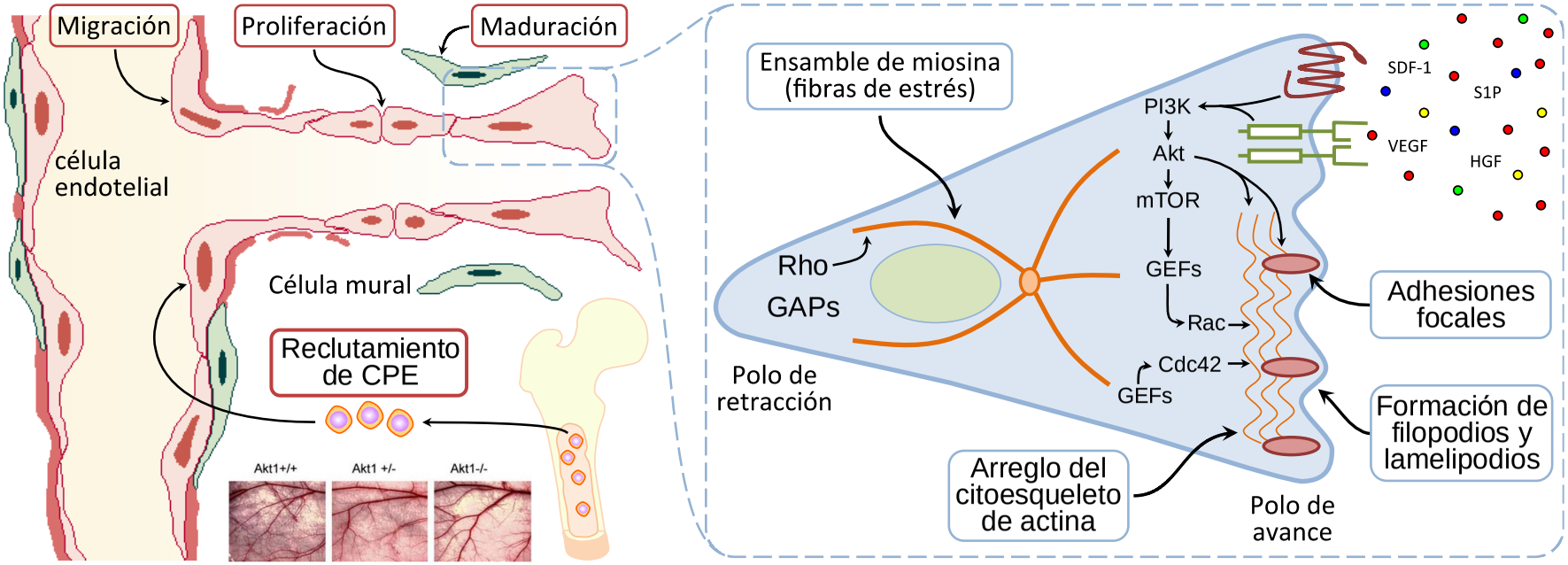

Migración
Proliferación
Maduración
célula endotelial
Célula mural
Reclutamiento de CPE
Akt1+/+
Akt1 +/-
Akt1-/-
Ensamble de miosina (fibras de estrés)
Rho
GAPs
Polo de retracción
PI3K
Akt
mTOR
GEFs
Rac
Cdc42
GEFs
SDF-1
S1P
VEGF
HGF
Adhesiones focales
Formación de filopodios y lamelipodios
Arreglo del citoesqueleto de actina
Polo de avance

**Figura 6. Participación de la vía PI3K-AKT-mTOR en la migración endotelial y angiogénesis.** La migración endotelial depende de la activación de GTPasas de la familia de Rho (Rho, Rac y Cdc42), las cuales se activan en respuesta a factores de crecimiento y quimiocinas (VEGF, HGF, SDF-1 y S1P). Estos factores actúan estimulando receptores con actividad de tirosina cinasa y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) a través del heterodímero Gβγ, que promueven la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios, filopodios y adhesiones focales en el polo de avance, así como la formación y acople de fibras contráctiles de actina-miosina por la estimulación de $GPCRa_{12/13}$ en el polo de retracción, llevando en conjunto al desplazamiento celular [53]. La vía PI3K-AKT-mTOR juega un papel clave en la regulación de la migración celular y en otros procesos importantes de la angiogénesis. En los procesos enmarcados en color azul (línea clara) como la formación de fibras de estrés [92-94], el arreglo del citoesqueleto de actina [95-97] y el establecimiento de adhesiones focales [95, 98], se ha demostrado contundentemente la participación de la vía PI3K-AKT-mTOR, además en los procesos enmarcados en color rojo (línea oscura) como la maduración vascular [99] y reclutamiento de células progenitoras endoteliales (CPE) [100], que contribuyen en la angiogénesis también existe clara participación de la vía PI3K-AKT-mTOR. El inserto hace referencia a que la ausencia de la cinasa AKT1, condiciona una disminución de la vasculatura en la piel de roedores [101].

## C. Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR.

La vía de señalización PI3K-AKT-mTOR constituye un punto de convergencia de diversos estímulos celulares río abajo de receptores tirosina cinasa y receptores acoplados a proteínas G. A través de esta cascada de señalización, dichos estímulos regulan numerosas funciones celulares que incluyen a la angiogénesis, el metabolismo, el crecimiento, la proliferación y sobrevivencia celular (Figura 3 y 7).

La vía PI3K-AKT-mTOR desempeña un papel importante tanto en la angiogénesis fisiológica como en la patológica, ocasionando efectos tanto en células endoteliales como en las células generadoras de señales angiogénicas. Esta vía es fuertemente activada por el VEGF contribuyendo en la sobrevivencia, metabolismo, crecimiento, proliferación y migración endotelial [102]. La desregulación de varios de sus componentes se asocia a un amplio abanico de enfermedades, principalmente cáncer. Es por ello que el estudio de la vía de transducción PI3K-AKT-mTOR constituye un frente de investigación intenso para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer (Figura 7).

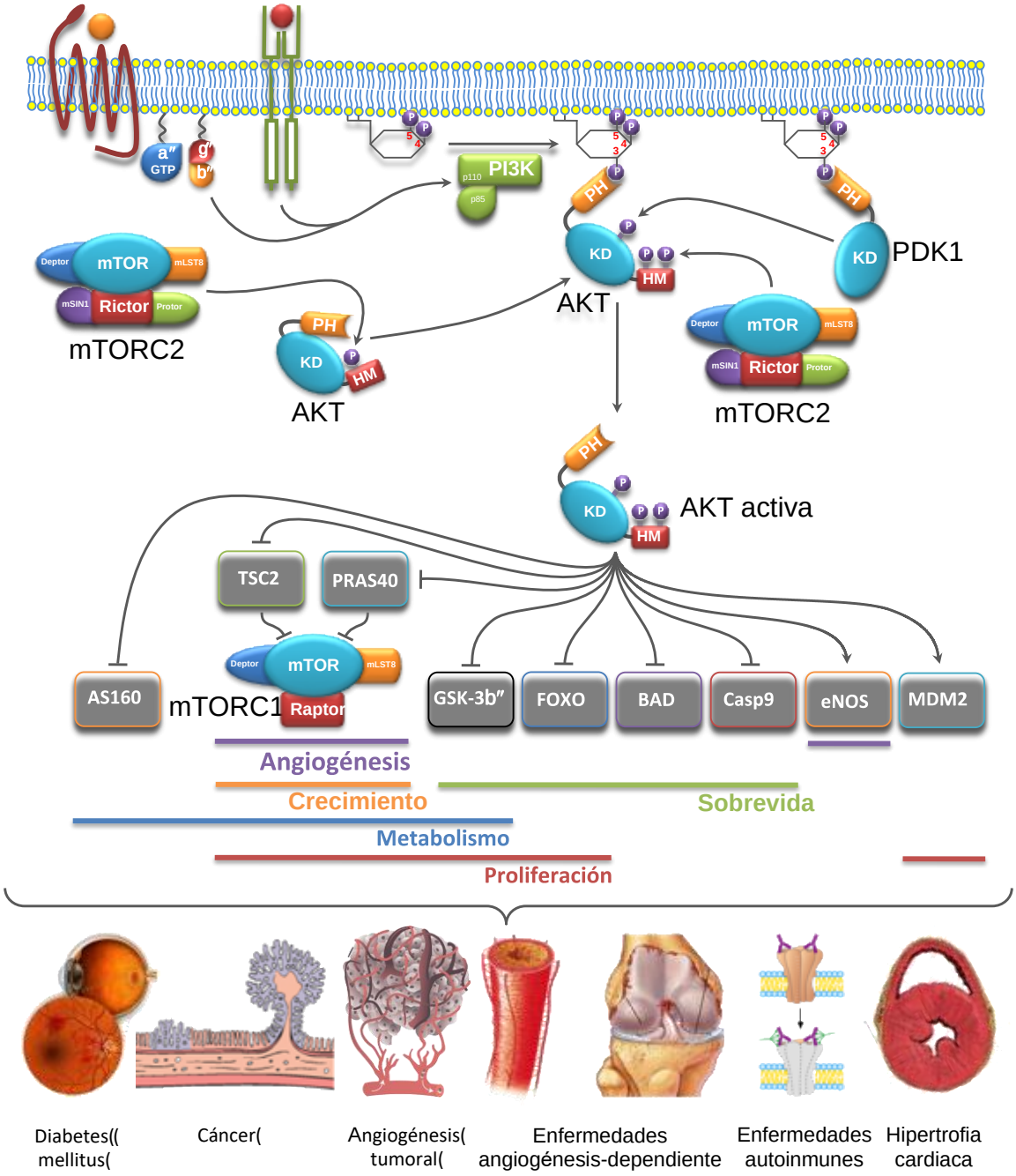



**Figura 7. Mecanismo de activación de la vía PI3K-AKT-mTOR.** En células no estimuladas AKT se localiza en el citoplasma. Cuando las células son estimuladas con un factor de crecimiento o una quimiocina, los dominios PH de AKT se une al fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) generado por la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la AKT es reclutada a la membrana plasmática. Posteriormente AKT es fosforilada secuencialmente, primero en la Thr308 y después en la Ser473, por cinasas río arriba conocidas como proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1) y la proteína cinasa 2 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK2), para producir una completa activación de la cinasa AKT. La función e PDK2 se ha atribuido recientemente al complejo 2 de la cinasa mTOR (mTORC2). AKT activa es capaz de

translocarse a diferentes compartimentos subcelulares para fosforilar a sus sustratos, induciendo activación (→) o inhibición (⊥). Los sustratos de AKT están agrupados de acuerdo a su función. La fosforilación inhibidora de las proteínas TSC2 y PRAS40, bloquea la habilidad inhibidora de ambas proteínas hacia el complejo 1 de mTOR, resultando en su activación. El desbalance en la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR contribuye en la patogénesis de numerosas enfermedades.

## 1. Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K).

La PI3K es un complejo heterodimérico que consiste de una subunidad reguladora de 50-101 kDa y una catalítica de aproximadamente 110 kDa que se encarga de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinosítidos: fosfatidilinositol-3-monofosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI(3,4)$P_2$) y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)$P_3$). Éstos promueven la translocación a la membrana de proteínas con dominios PH, FYVE, PX presentes en una gran variedad de moléculas de señalización como AKT/PKB y PDK1, alterando su actividad y localización subcelular. El supresor de tumor PTEN regula negativamente la acción de la PI3K desfosforilando en posición 3 al PIP3. Las fosfatidilinositol 3 cinasa se agrupan en tres familias acorde a la preferencia de sustrato y a la homología de la secuencia, además de tener diferentes funciones en la transducción de señales. La clase I se divide en dos subfamilias dependiendo del receptor que promueve su activación en A y B. La clase IA es activada por receptores tirosina cinasa para factores de crecimiento (RTKs), mientras que la clase IB es activada por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). La clase II consiste en una sola subunidad catalítica y se asocia al proceso de endocitosis. La clase III se integra por una unidad catalítica asociada al proceso de tráfico vesicular (endosomas, vesículas autofágicas y secretoras) [103-105].

## 2. La cinasa AKT/PKB.

La serina/treonina cinasa AKT, también conocida como PKB, desempeña un papel primordial en la señalización celular dependiente de factores de crecimiento y otros estímulos celulares. En células endoteliales, la mayoría de

las respuestas inducidas por factores de crecimiento están mediadas por la activación de la cascada de señalización PI3K-AKT [102, 106, 107]. AKT regula diversos procesos celulares como la migración, proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo y puede influenciar además, la expresión y/o actividad de factores pro- y antiangiogénicos. El incremento o disminución anormal de la activación de AKT contribuye en la patogénesis de numerosos desórdenes que incluyen la intolerancia a la glucosa, el cáncer y diferentes enfermedades angiogénicas, entre otros; de aquí que sus isoformas (AKT1, AKT2 y AKT3) se han propuesto como blancos terapéuticos para anomalías relacionadas con angiogénesis como el cáncer y el daño isquémico (figura 7).

La cinasa AKT fue originalmente identificada como un oncogén dentro del virus de leucemia murino AKT8 [108, 109]. Subsecuentemente, en 1991, tres grupos de investigación clonaron el cDNA de AKT con lo que revelaron su identidad como una nueva cinasa de serina/treonina [110-112]. Después de la identificación de AKT1 (PKB$\alpha$), dos miembros de la familia de AKT fueron también identificados, AKT2 (PKB$\beta$) y AKT3 (PKB$\gamma$) [113, 114].

Los genes AKT1 (PKB$\alpha$), AKT2 (PKB$\beta$) y AKT3 (PKB$\gamma$) [115] codifican proteínas que contienen, en el amino terminal, un dominio con homología a plekstrina (PH), un dominio central de cinasa, y un dominio regulatorio en el carboxilo terminal (figuras 7 y 8). De acuerdo al alineamiento de la secuencia del dominio de cinasa, los miembros de la familia de AKT pertenecen a la subfamilia AGC de proteínas cinasas [116]. Las tres isoformas comparten alto grado de homología y su expresión relativa es diferencial en tejidos de mamíferos: AKT1 es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos, AKT2 es la isoforma predominante en tejidos insulino-dependientes, y AKT3 es la isoforma predominante en cerebro y testículo. Estudios recientes, usando células endoteliales aisladas de ratones deficientes de AKT1 (AKT1$^{-/-}$), indican que esta isoforma es responsable de aproximadamente el 75% de la actividad total de AKT [117].

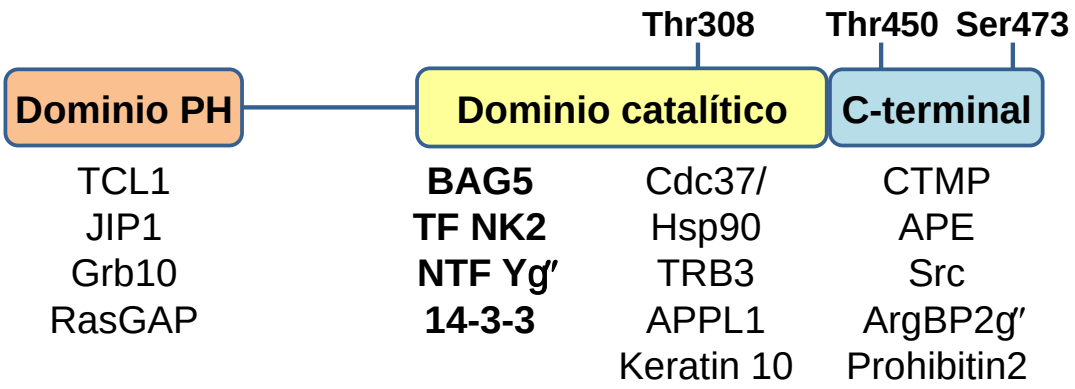



**Figura 8. Arreglo lineal de los dominios de AKT y proteínas con las que interactúan**. El esquema nos muestra los dominios de AKT, así como los sitios de fosforilación necesarios para su activación (Thr308 y Ser473) y estabilidad (Thr450). Se han identificado diferentes proteínas que se unen específicamente a los diferentes dominios de AKT, las cuales promueven o inhiben su activación [118]. En negritas destacan las proteínas que se encontraron en nuestro laboratorio mediante el ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando el dominio catalítico dominante negativo como carnada. BAG5 (BCL-2 associated athanogene 5); TF NK2 (factor de transcripción NK2); NTF Yγ (factor de transcripción nuclear Y gamma); 14.3.3 (proteína 14-3-3).

*Sustratos y acciones de AKT.*

La noción de que la cinasa AKT favorece la sobrevivencia celular es consistente con que varios de sus sustratos son proteínas reguladoras de la apoptosis, tal es el caso de Bad, FKHR, IKKα, survivina, FLIP y MEKK3 [106]. Sin embargo, otras funciones fundamentales de AKT están relacionadas a su influencia en el metabolismo de la glucosa, a través de modular a transportadores y cinasas (GLUT4 y GSK-3β), su papel en la regulación del ciclo celular (E2F, p21, MDM2 y hTERT), y sus efectos en la síntesis proteica (mTORC1-4E-BP1-S6K1) [106].

La motilidad celular es importantemente regulada por la cinasa AKT (Figura 6). La evidencia acumulada, ubica a la cinasa AKT como un regulador directo de la dinámica del citoesqueleto y el movimiento celular, a través de mecanismos relacionados con la regulación de la activación de Rac, el ensamble de miosina, el arreglo del citoesqueleto de actina, la formación de adhesiones focales [119, 120]. Por ello, la modulación de la vía representa una novedosa estrategia terapéutica para modular la migración celular en enfermedades como el cáncer y otras enfermedades relacionadas a la angiogénesis.

*AKT y angiogénesis.*

Las cascadas de transducción de señales angiogénicas frecuentemente coinciden en la activación de la cinasa AKT. Esta vía juega un papel central como promotora de la sobrevivencia celular y se le han atribuido funciones en eventos de proliferación y, de interés particular para nosotros, de migración endotelial y angiogénesis (Figura 6).

En ratones AKT1$^{-/-}$, la capacidad de las células endoteliales para formar brotes, a partir de anillos de aorta, se encuentra afectada [117]. Además, la pérdida genética de AKT1, pero no de AKT2, resultó en un defecto en la angiogénesis inducida por VEGF [121].

La complejidad de acciones mediante las que AKT contribuye a regular el crecimiento tumoral y la angiogénesis se ve evidenciada por su efecto modulador del ensamble de la matriz extracelular y la reducción en los niveles de proteínas de matriz extracelular, como las tromboespondinas 1 y 2, que se observa en el ratón AKT1$^{-/-}$ [117].

Adicionalmente, en un modelo de isquemia de los miembros traseros de ratón se demostró que la sintasa de óxido nítrico endotelial, un efector río abajo de AKT, es importante para la angiogénesis [121] y maduración de los vasos sanguíneos [99].

La cinasa AKT regula la migración celular vía un control preciso en la reorganización del citoesqueleto de actina [97], además se le ha localizado en el polo de avance celular, siendo esencial para promover la migración celular en respuesta a PDGF [122].

Algunos efectores de AKT como la ACAP1 [98], la integrina β3 [123, 124] y la Girdina/APE [95] han sido involucrados en la regulación de la migración celular. Este es un proceso filogenéticamente conservado. Por ejemplo, se ha demostrado en *Dictyostelium discoideum,* que la vía PI3K/AKT activa a la serina/treonina cinasa PAKa (cinasa activada por la GTPasa Rac p21), la cual regula el ensamble de miosina y la tensión cortical necesarios para el mantenimiento de la polaridad celular [92]. Más recientemente, la vía PDK1-AKT ha sido vinculada a la regulación de la estabilidad de microtúbulos en el

polo de avance de fibroblastos migrantes en respuesta a agentes quimiotácticos[93]. En este sentido, Primo y colaboradores [94] evidenciaron que esta vía es esencial para la motilidad de las células de endotelio vascular.

Por lo anterior, la participación de AKT en la regulación de la migración y polaridad celular es indudable, así como su papel central en el mantenimiento de la integridad vascular. Sin embargo, en el contexto de la migración endotelial, no se han caracterizado proteínas que puedan modular la función de AKT e influir en el proceso de angiogénesis dependiente de la acción de esta cinasa. En teoría, si se bloquea la migración de las células endoteliales, a través de proteínas que interaccionen con AKT, se podría frenar el crecimiento tumoral dependiente de angiogénesis.

*Regulación de la señalización de AKT.*

La cinasa AKT presenta varios sitios de fosforilación. La treonina 450 es fosforilada por la cinasa mTOR que forma parte del complejo mTORC2 y tal fosforilación le confiere estabilidad a la cinasa AKT recién sintetizada. Por otro lado, se conocen dos sitios de fosforilación que tienen una función reguladora positiva de la actividad de la cinasa, estos son la treonina 308 y la serina 473. La fosforilación de la treonina 308 es atribuida a la proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1), en tanto que la fosforilación de la serina 473 ha sido atribuida a varias cinasas, o bien a una actividad catalítica inicialmente llamada proteína cinasa 2 dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK2) cuya identidad ha sido motivo de intensa controversia, aunque se acepta que también en este caso, la cinasa mTOR como componente esencial del complejo mTORC2 es la responsable de dicha fosforilación [125-127].

La actividad y función de AKT es finalizada por diferentes mecanismos que incluyen la acción de fosfatasas, proteínas que bloquean competitivamente los sitios de unión a la membrana, la degradación de AKT por el sistema ubiquitina-proteosoma y el sistema de chaperonas moleculares y la degradación dependiente de caspasas.

Se han descrito múltiples fosfatasas que regulan la actividad de AKT. La fosfatasa PTEN (Phosphatase and tensin homolog) es una fosfatasa dual que

desfosforila residuos de tirosina, serina y treonina de proteínas específicas (no incluye a AKT), así como fosfolípidos de membrana. Su función como fosfatasa de lípidos se basa en la remoción del fosfato de la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)$P_3$), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI(3,4)$P_2$), fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P) e ilinositol-1,3,4,5-tetrafosfato (I(1,3,4,5)$P_4$), generando PI(4,5)$P_2$, PI(4)P, PI y I(1,4,5)$P_3$ respectivamente. PTEN es un potente inhibidor de AKT, que bloquea su fosforilación en Ser473 y Thr308, sin embargo no es directo sobre AKT, sino que lo hace indirectamente por la disminución de segundos mensajeros lipídicos de la membrana plasmática (PI(3,4,5)$P_3$ y PI(3,4)$P_2$) que activan a AKT [128-130]. La desfosforilación de la AKT activa es llevada a cabo por proteínas fosfatasas directas de AKT como PP2A y las PHLPPs [131, 132]. La fosfatasa PP2A desfosforila en ambos residuos activadores de AKT, Thr308 y Ser473 [133], mientras que las PHLPPs lo hacen sólo en Ser473 [132, 134, 135]. Las fosfatasas PHLPPs se componen de tres miembros: PHLPP1$\alpha$, PHLPP1$\beta$ y PHLPP2, que difieren en la selectividad para desfosforilar el motivo hidrofóbico de las diferentes isoformas de AKT. Así, las PHLPP1 desfosforila en Ser474 de AKT2 y en Ser472 de AKT3 y la PHPLP2 desfosforila en Ser473 de AKT1 y Ser472 de AKT3 [132, 134, 135].

El bloqueo de la activación de AKT por competir por los sitios de unión a la membrana es promovido por la proteína que contiene un dominio PH en su estructura, PHLDA3 (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 3). Esta proteína es capaz de unirse, por su dominio PH, a cualquier combinación de fosfoinosítidos de membrana mono- (3,4,5), bi- (3-4, 4-5, 3-5) o tri-fosforilados (3-4-5). De forma que bloquea la activación de AKT, por su unión de alta afinidad a los fosfolípidos de membrana, estableciendo una competencia por los dos únicos fosfolípidos a los que se puede unir AKT: PI(3,4,5)$P_3$ y PI(3,4)$P_2$ [136].

Aunque existen pocos reporte sobre la degradación de AKT por el sistema ubiquitina-proteosoma, está bien establecida su importancia en circunstancias y funciones celulares particulares. La activación de AKT dependiente de

mTORC2, por ejemplo, favorece su ubiquitinación y degradación. Además, las ligasas de ubiquitina Mulan  y mediante TTC3 (Tetratricopeptide repeat domain 3) promueven la degradación de la AKT activa [137, 138]. Por su parte, la ligasa de ubiquitina CHIP (Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein) induce la degradación de AKT en células modelo y en tejido cerebral de ratón [139]. Por otro lado, la degradación selectiva de AKT en las dendritas, mediante el sistema ubiquitina-proteosoma, es requerida para el establecimiento de la polaridad neuronal [140].

El papel del sistema de chaperonas moleculares juega un papel trascendental en la estabilidad de AKT. La interacción de AKT con Hsp90 (heat shock protein 90) estabiliza a AKT [141] y previene su inactivación por la fosfatasa PP2A [142], mientras que la interacción con Hsp70 (heat shock protein 70) promueve la degradación de AKT vía proteosoma [143].

La degradación de AKT dependiente de caspasas ha sido extensamente estudiada, lo cual ha derivado en la identificación de sitios de corte por las caspasas 3, 6 y 7. Dos de ellos entre el dominio PH y el dominio de cinasa de AKT: D108-G109 y D119-F120 y uno más en el dominio regulador carboxilo terminal: D434-T435. La acción de estas caspasas se asoció con el incremento en la apoptosis [144]. Además se ha reportado que el corte de AKT por parte de la caspasa 3, es dependiente del estado de fosforilación de AKT. De forma que la fosforilación de AKT resiste la degradación de AKT por la caspasa 3 en el sitio DAKE398, el cual se encuentra en el dominio catalítico [145]. Interesantemente, se describió un mecanismo de degradación de AKT vía la ubiquitinación dependiente de caspasas, el cual se revierte con la inhibición conjunta del sistema proteosomal y de las caspasas [146].

*Proteínas que interaccionan con AKT.*

La cinasa AKT, a través de sus diferentes dominios, establece interacciones con distintas proteínas, e incluso segundos mensajeros, que tienen un efecto regulador sobre la actividad de la cinasa o bien que la vinculan a cascadas de transducción específicas en distintos tipos celulares (Figura 8) [118]. El dominio

PH, ubicado hacia el extremo amino de AKT interacciona con diversas proteínas que contribuyen a regular las funciones de AKT. Así, la interacción con Tcl1 (T-cell leukemia/lymphoma induce la oligomerización de AKT y facilita su fosforilación en Ser473 por ella misma o por otras proteínas como mTORC2 [127], además provoca un cambio conformacional que facilita la fosforilación en Thr308 por PDK1 y favorecer su translocación al núcleo. La interacción con JIP1 (JNK interacting protein 1), resulta en la inhibición de la actividad de JNK por secuestro de JIP1. La interacción con Grb10 (Growth factor receptor-binding protein-10) y con RasGAP (Ras GTPase-activating protein) contribuyen a su activación por factores de crecimiento y suero respectivamente [118].

Por su parte, las proteínas que interaccionan con el dominio cinasa de AKT pueden proteger de la degradación vía proteosoma, facilitando la interacción con sustratos como la eNOS, mediante su interacción con la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), mientras que la interacción con TRB3 (Tribbles homolog 3) disminuye la activación de AKT por inhibir la fosforilación en Thr308 y Ser473 en respuesta a insulina y otros factores de crecimiento. En contraste, la interacción con APPL (Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif) aumenta la activación de AKT en respuesta a IGF-1 [118].

Finalmente la interacción con la región carboxilo terminal de AKT con la proteína moduladora del carboxilo terminal (CTMP), lleva a la inhibición de su actividad de cinasa, mientras que la asociación con Girdina/APE (AKT phosphorylation enhancer) aumenta su fosforilación dependiente de PI3K y favorece el rearreglo del citoesqueleto de actina. Existe evidencia sólida que plantea que la interacción de la tirosina cinasa Src (SH3 domain-containing proteins) con el carboxilo terminal de AKT, puede resultar en la fosforilación de la Tyr315 de AKT y consecuentemente la modulación de su función. Por otro lado, la proteína con dominios SH3, ArgBP2$\gamma$ (Arg-binding protein 2 gama) que interacciona tanto con PAK1 como con el carboxilo terminal de AKT, resulta en la fosforilación de ArgBP2$\gamma$ por AKT, la cual es necesaria para la activación de PAK1. Otra proteína que interacciona con el carboxilo terminal de AKT es la

prohibitina 2 (PBH2), cuya acción represora se ve inhibida por AKT, resultando en la diferenciación miogénica [118].

**3. mTOR (*mammalian Target Of Rapamaycin*).**

La cinasa mTOR tiene especificidad por residuos de serina y treonina. Esta cinasa está conservada evolutivamente y se expresa de forma ubicua. Desempeña un papel esencial como regulador del metabolismo celular, el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia en respuesta a nutrientes y otros estímulos. Estudios recientes han demostrado que mTOR también participa en la regulación de la motilidad celular. La Rapamicina inhibe algunas de estas funciones.

La vía de mTOR juega un papel fundamental en diversos procesos patológicos que incluyen la adipogénesis, la activación de linfocitos T, la formación de tumores, la motilidad de las células tumorales, la angiogénesis patológica y la resistencia a la insulina, lo cual ha generado un gran interés en el ámbito científico y clínico que ha generado una explosión de publicaciones que continúa en ampliación [120, 147-153]. Esto ha impulsado el uso y desarrollo de inhibidores de mTOR [Rapamicina y sus análogos (rapálogos)] para diferentes condiciones patológicas, incluyendo el tratamiento de tumores sólidos, trasplante de órganos, artritis reumatoide, re-estenosis coronaria, entre otros [120].

*La Rapamicina y mTOR (mammalian Target Of Rapamaycin).*

El navegante holandés Jacob Roggeveen descubrió la Isla de Pascua (nombre polinesio: Rapa Nui) el domingo de Pascua de 1722 [154]. Muchos años después, en la década de 1970, fue descubierto un antibiótico macrólido lipofílico producido por una cepa de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, aislado de una muestra de suelo obtenida de Rapa Nui (territorio chileno) por el Dr. Suren Sehgal, quien lo llamó "rapa" - micina (Rapamicina) [155, 156]. Aunque la Rapamicina (Rapamune, RAPA, Sirolimus, C51H79NO13) fue identificada por primera vez como un agente antifúngico, su potente poder

inmunosupresor y potencial actividad antitumoral fueron revelados posteriormente [157-159] identificándose además que su acción terapéutica reside en su efecto sobre una proteína clave, la cinasa mTOR , precisamente llamada así por ser el blanco de la Rapamicina (*mammalian target of rapamycin*).

El mecanismo de acción de la Rapamicina depende de la unión a sus receptores intracelulares, una familia de inmunofilinas llamadas proteínas de unión a FK506 (FKBPs) que actúan como isomerasas intracelulares de prolina. Los estudios bioquímicos y genéticos mostraron que la unión a la FKBP12 es más relevante para los efectos de la Rapamicina [160, 161].

La identificación del complejo TOR-FKBP12 (TOR1 y TOR2) fue posible gracias a estudios genéticos en mutantes de levadura resistentes a Rapamicina. Este hallazgo reveló la participación esencial de la cinasa blanco de la Rapamicina (en levaduras conocida como TOR) en la progresión de la fase G1 a la S durante el ciclo celular [162]. La identificación de genes TOR en levaduras condujo al descubrimiento posterior de los genes TOR en organismos eucariontes más complejos. Actualmente se sabe que cada genoma eucariota examinado (incluyendo algas, hongos, plantas, gusanos, moscas y mamíferos) contiene al menos un gen TOR. La homología a nivel de secuencia primaria de TOR de distintas especies es de alrededor de 40 a 60% [163-165]. Diferentes investigadores propusieron, de manera independiente, varios nombres para referirse al blanco de la Rapamicina, además de mTOR, esta proteína ha sido llamada FRAP (FKBP12-Rapamycin associated protein), RAFT (Rapamycin and FKBP12 target), RAPT (Rapamycin target) y SEP (Sirolimus effector protein) [165-169]. Más recientemente, se ha acuñado el termino *mechanistic target of rapamycin* con la intención de que el término mTOR sea aplicable a esta enzima en todas las especies que la contienen.

*mTOR (mammalian target of Rapamycin).*

La proteína mTOR es una cinasa de serina y treonina, tiene un peso de 289 kDa (2,549 aminoácidos) y su gen, en humanos, está localizado en el

cromosoma 1, en la región p36.2 [170]. Al igual que las proteínas TOR de levaduras, el dominio catalítico de mTOR está ubicado hacia el extremo carboxilo-terminal, consta de 600 aminoácidos y presenta homología con la subunidad catalítica p110 de la fosfatidilinositol 3-cinasa y de la fosfatidilinositol 4-cinasa de mamíferos. Esta característica ubica a mTOR dentro de un grupo no convencional de proteínas cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol 3-cinasa, conocidas como el grupo PIKK [169, 171, 172].

El complejo Rapamicina-FKBP12 interacciona con residuos aromáticos de la región FRB (FKBP12-Rapamycin Binding domain) ubicados hacia el lado amino del dominio de cinasa de mTOR. Esta región está constituida por un segmento hidrófobo de 133 aminoácidos que se encuentran inmediatamente antes del dominio de cinasa, por lo que se habla de un mecanismo alostérico mediante el cual el complejo Rapamicina-FKBP12 inhibe a mTOR [168, 173]. Así pues, mutaciones puntuales en la región FRB de mTOR evitan la unión del complejo FKBP12-Rapamicina confiriendo de este modo resistencia a la Rapamicina [174].

La cinasa mTOR cuenta además con regiones conservadas que comprenden 20 repeticiones en tándem de motivos HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of PP2A and TOR1). Estas regiones se extienden en una fracción amplia de la región amino de mTOR que se considera una superficie extensa de interacción proteína-proteína, de aproximadamente 1 200 aminoácidos; posteriormente se presenta un dominio FAT (FRAP, ATM, TRRAP), con una extensión aproximada de 500 aminoácidos, que puede actuar como un andamio estructural o un sitio de unión para las proteínas moduladoras de la actividad catalítica; luego sigue el ya descrito dominio FRB (FKBP12-Rapamycin Binding protein) de 133 aminoácidos dentro de la región central de mTOR, que, como se señaló previamente, proporciona un sitio de acoplamiento para el complejo FKBP12-Rapamicina; luego viene el dominio catalítico de cinasa, localizado cerca del extremo carboxilo terminal y que, reiteramos, comparte una homología significativa con las cinasas de lípidos y, finalmente, se localiza una región llamada FATC (FAT *carboxyl-terminal*) de sólo 35 aminoácidos de

longitud, los dominios FAT y FATC están presentes característicamente en la estructura de la familia de cinasas PIKK. Las regiones FAT y FATC pueden modular la actividad de cinasa de mTOR, aunque el mecanismo y función de tales efectos no están del todo esclarecidos [175-178]. Entre las posibilidades, se ha sugerido la presencia de un sensor de redox en el dominio FATC de la cinasa TOR de levaduras [179]. Esto está relacionado con descubrimientos recientes sobre la regulación de la actividad y ensamble del complejo 1 de mTOR por un mecanismo sensible a las condiciones redox [180, 181].

*mTOR, componente catalítico de dos complejos: mTORC1 y mTORC2.*

La cinasa mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos multiproteicos conservados evolutivamente, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2) de mTOR. Estos complejos son estructural y funcionalmente distintos, así mTORC1 tiene 4 componentes: RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*), PRAS40 (*40 kDa Proline-Rich AKT Substrate*), DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR interacting-protein*) y mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*, también conocida como GβL, *G-protein β-subunit Like protein*); y mTORC2 se constituye de cinco proteínas, dos de las cuales son comunes a ambos complejos: RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian Stress-activated map kinase-INteractin protein 1*), PROTOR (*PROTein Observed with Rictor*), DEPTOR y mLST8 [147, 151]. Además, se han identificado otras proteínas que interaccionan con ambos complejos de mTOR, reflejando la diversidad en las cascadas de señalización en las que mTOR interviene y la necesidad de estudios que clarifiquen las funciones de tales proteínas en la señalización de mTOR y su potencial implicación en los estados fisiológicos y patológicos (Figura 9).

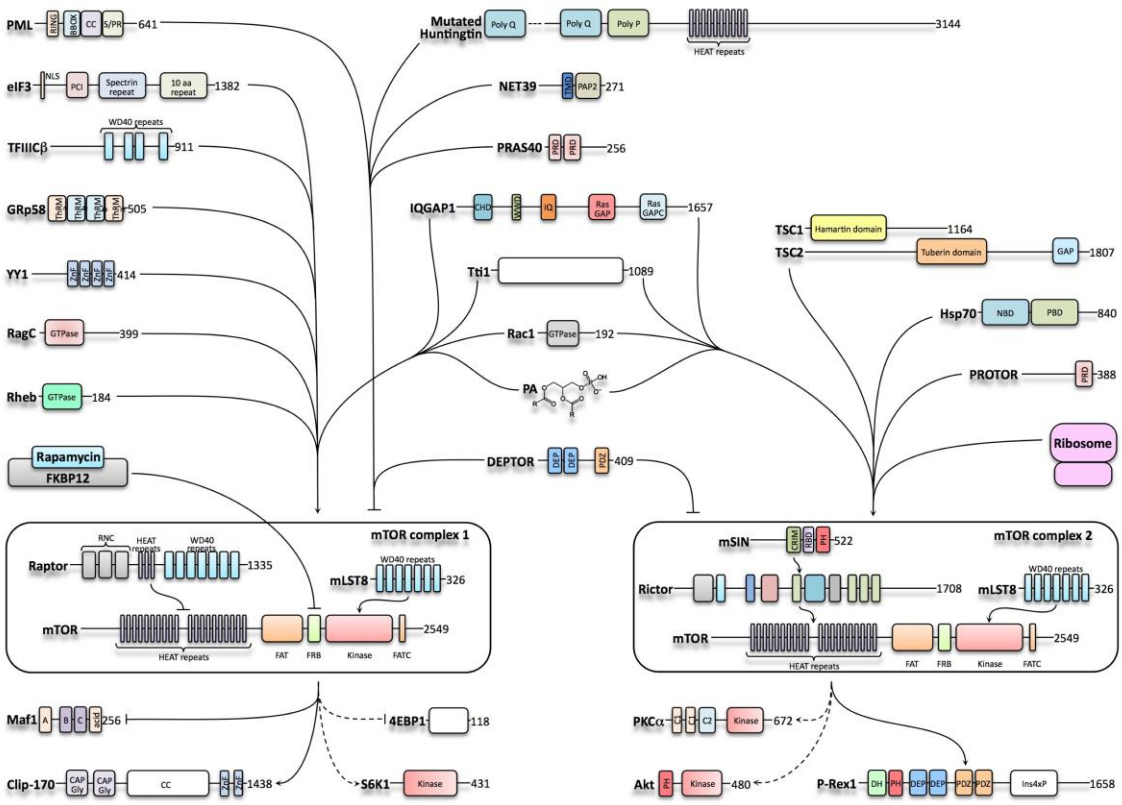



**Figura 9. Los complejos de mTOR y las proteínas con las que estos establecen interacciones funcionales.** La serina/treonina cinasa mTOR constituye la subunidad catalítica de dos complejos conservados evolutivamente, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2) de mTOR. La proteína Raptor, componente que define al mTORC1, ayuda en el reconocimiento de sustratos. Las proteínas Rictor y mSIN1 son los componentes que definen a mTORC2. mSIN1 se une al complejo a través de Rictor y contiene un dominio de unión a Ras (RBD) y un dominio homólogo a Pleckstrina (PH) que muy probablemente están involucrados en la regulación de mTORC2 por Ras y fosfolípidos. Ambos complejos comparten a mLST8, una proteína similar a la subunidad Gβ de las proteínas G heterotriméricas. Sólo consideramos como componentes esenciales de ambos complejos de mTOR a aquellas que están filogenéticamente conservadas y constituyen complejos equivalentes en levaduras y otros organismos modelo. Se han identificado muchas proteínas que interaccionan con los complejos de mTOR, en la figura se muestran las interacciones entre proteínas endógenas que afectan la función de mTOR. Están agrupadas según su habilidad para promover (→) o inhibir (⊥) los complejos de mTOR. Además, se muestran las interacciones que funcionan como efectores río abajo de mTOR [120].

A diferencia de mTORC1, el complejo mTORC2 es insensible a Rapamicina. Al respecto se ha sugerido que el dominio FRB se encuentra enmascarado por algunas de las subunidades de mTORC2. Consistente con esto, el tratamiento crónico con Rapamicina disminuye los niveles de mTORC2 por competir con el

mTOR recién sintetizado, previniendo el ensamble de ambos complejos [182]. Recientemente se describió una isoforma de splicing de mTOR, mTORβ que carece de las repeticiones HEAT y el domino FAT. Esta isoforma, de aproximadamente 80 kDa, es capaz de formar complejos con Raptor y Rictor y de fosforilar sustratos conocidos de la cinasa mTOR como S6K1, 4E-BP1 y AKT. Además, mTORβ promueve transformación celular y mantenimiento tumoral, lo que la ubica como un proto-oncogen, situándola como un blanco terapéutico potencial [183].

*Sustratos y acciones de mTOR.*

Los sustratos fosforilados por mTOR en respuesta a diferentes estímulos intra y/o extracelulares, así como los sustratos indirectos que están río abajo de los efectores de mTORC1 (S6K) y mTORC2 (AKT), ejercen diversas acciones que contribuyen a explicar las funciones de mTOR en la regulación de procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, el metabolismo, la supervivencia y la migración (Figura 10).

La fosforilación de 4E-BP1 [*eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E)-Binding Protein 1*] y p70S6K (*p70 ribosomal S6 Kinase*), los dos principales efectores río abajo de mTORC1, regula la iniciación y progresión de la traducción, controlando la síntesis proteica [184] y la biogénesis del ribosoma [185]. La síntesis colesterol y otros lípidos también es regulada positivamente por mTORC1, modulando la actividad de factores transcripcionales como SREBP1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*) y PPARγ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ*) [186-188]. La autofagia es también un proceso regulado por mTORC1, en este caso de forma inhibitoria, lo que contribuye al efecto anabólico de mTORC1. El mecanismo por el cual mTORC1 inhibe la autofagia consiste en la fosforilación de elementos claves en la formación del autofagosoma, el ATG13 (*autophagy-related gene 13*) y el ULK1 (*unc-51-like kinase 1*). Estas proteínas se asocian con FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*) y la ATG101 para formar el complejo de iniciación del autofagosoma [189-191].

La señalización de mTORC2 involucra la regulación de varios procesos como sobrevivencia, metabolismo, proliferación y arreglo del citoesqueleto. Existen reportes que demuestran el papel de mTORC2 en la regulación de cinasas de la familia AGC como SGK, PKC y AKT [125, 127, 192, 193].

La activación máxima de la cinasa AKT depende de que esta sea fosforilada en dos sitios: en la treonina 308 (por la cinasa PDK1) y en la serina 473, por una cinasa cuya identidad has sido controversial, aunque generalmente se acepta al complejo 2 de mTOR. Una vez fosforilada, la cinasa AKT a su vez fosforila a numerosos sustratos mediante los cuales regula múltiples procesos fundamentales, incluyendo la supervivencia celular, el metabolismo, el crecimiento, la proliferación, el movimiento celular y, en el caso de sus efectos en tejidos específicos destaca, en nuestro campo de interés, su papel como regulador de la angiogénesis [102]. El eje de señalización mTORC2-AKT-mTORC1 se integra de forma paradójica, ya que la cinasa AKT es un efector de mTOR (el complejo 2) requerido para activar mTOR (el complejo 1). Sin duda, la capacidad de AKT para fosforilar e inhibir a reguladores negativos de mTORC1, tales como TSC2 y PRAS40, representa un aspecto esencial en la integración de esta cascada. Sin embargo, los mecanismos que regulan la disponibilidad de estos complejos en la célula, y los aspectos moleculares responsables de mantener el equilibrio en la cascada de señalización en el cual la cinasa AKT parece ser el fiel de la balanza, distan mucho de ser completamente conocidos. Considerando la existencia de proteínas adaptadoras y de andamiaje que regulan la especificidad de otras vías de transducción, como la de la cascada de las MAP cinasas, se especula que proteínas que se asocien a mTOR y AKT, así como aquellas que regulen el ensamble de los distintos complejos y su localización subcelular, tendrán un efecto en la definición de los mecanismos efectores que prevalecerán ante la integración de señales en que intervienen los elementos de esta vía. De particular interés para nosotros son aquellas con un efecto regulador de la migración celular.

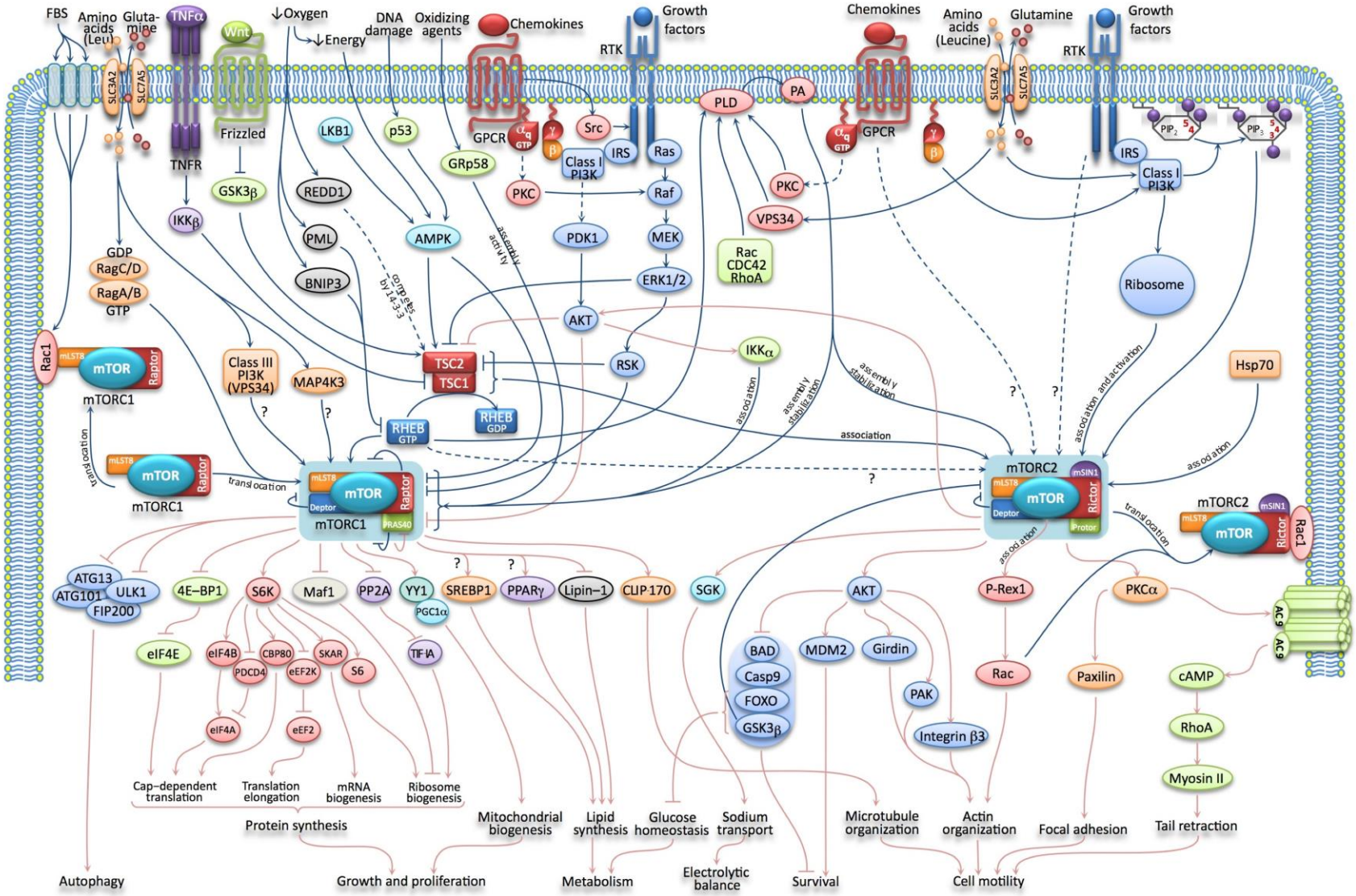

FBS
Amino acids (Leu)
Gluta-mine
SLC3A2
SLC7A5
TNFα
TNFR
Wnt
Frizzled
GSK3β
IKKβ
↓Oxygen
↓Energy
DNA damage
Oxidizing agents
Chemokines
GPCR
Growth factors
RTK
Src
IRS
Ras
Class I PI3K
PKC
Raf
MEK
ERK1/2
PDK1
AKT
RSK
IKKα
LKB1
p53
REDD1
PML
BNIP3
AMPK
GRp58
PLD
PA
VPS34
Rac
CDC42
RhoA
Amino acids (Leucine)
Glutamine
PIP2
PIP3
Ribosome
Hsp70
GDP
RagC/D
RagA/B
GTP
Rac1
mLST8
mTOR
Raptor
mTORC1
Class III PI3K (VPS34)
MAP4K3
TSC2
TSC1
RHEB GTP
RHEB GDP
Deptor
PRAS40
mTORC2
mSIN1
Rictor
Protor
translocation
association
assembly activity
assembly stabilization
association and activation
ATG13
ATG101
ULK1
FIP200
4E–BP1
S6K
Maf1
PP2A
YY1
PGC1α
SREBP1
PPARγ
Lipin–1
CLIP170
SGK
eIF4E
eIF4B
PDCD4
CBP80
eEF2K
SKAR
S6
eIF4A
eEF2
TIFIA
BAD
Casp9
FOXO
GSK3β
MDM2
Girdin
PAK
Integrin β3
P-Rex1
Rac
PKCα
Paxilin
AC9
cAMP
RhoA
Myosin II
Cap–dependent translation
Translation elongation
mRNA biogenesis
Ribosome biogenesis
Protein synthesis
Mitochondrial biogenesis
Lipid synthesis
Glucose homeostasis
Sodium transport
Microtubule organization
Actin organization
Focal adhesion
Tail retraction
Autophagy
Growth and proliferation
Metabolism
Electrolytic balance
Survival
Cell motility

**Figura 10. Vías de señalización de los complejos 1 y 2 de mTOR.** Los complejos mTORC1 y mTORC2 integran señales extracelulares mediadas por receptores y señales intracelulares, a las que responden regulando varios procesos celulares como metabolismo, crecimiento, proliferación, sobrevivencia y migración. Las señales río arriba se muestran en líneas oscuras, mientras que las rutas río abajo en líneas claras. Las flechas (→) indican una regulación positiva y las barras (⊥) denotan regulación negativa. Los reguladores positivos de mTOR incluyen aminoácidos, ácido fosfatídico, agentes oxidantes y factores de crecimiento [120].

La polimerización de actina se controla mediante la formación de sitios de nucleación que promueven la formación de microfilamentos. Estos resultan de la interacción entre proteínas de transducción de señales, segundos mensajeros y proteínas capaces de atrapar monómeros de actina y promover su polimerización. En este proceso, el complejo mTORC2 ha sido revelado como un regulador positivo del citoesqueleto de actina, afectando varios reguladores del citoesqueleto vía fosforilación o interacción directa. La activación de AKT, promovida por mTORC2, conduce a que esta fosforile sustratos como la cinasa PAK (p21 Activates Kinase), la proteína adaptadora Girdina/APE y a la integrina β3, subunidad de un receptor de adhesión a matriz extracelular, entre otras, las cuales estimulan la migración celular y el rearreglo del citoesqueleto de actina [107]. Además, mTORC2 fosforila a la cinasa PKCα (*Protein Kinase Cα*), la cual fosforila a Paxilina y promueve su localización en las adhesiones focales [194, 195]. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró la interacción entre mTORC2 y P-Rex1 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1*), un GEF para Rac, promoviendo la migración celular [196]. Otro estudio puso en evidencia el papel de mTORC2 en la retracción neutrófilos durante la quimiotaxis, en este caso mediante un mecanismo independiente de AKT pero dependiente de la fosforilación de miosina [197] (Figura 10).

*Reguladores de la señalización de mTOR.*

La cinasa mTOR actúa como un integrador de señales, ya que es capaz de detectar una variedad de estímulos extra o intracelulares y responder mediante la regulación de diversos procesos celulares como el metabolismo, el

crecimiento, la proliferación, la supervivencia y el movimiento celular. La confluencia de estos estímulos, que bien pueden ser sinérgicos o, incluso antagónicos, da lugar a una regulación fina de la actividad de mTOR (Figura 10).

La regulación mejor establecida de mTOR, es la conformada por el asa de regulación entre AKT y mTOR [120]. En ella, la cinasa AKT promueve la activación de mTORC1 mediante diversos mecanismos, dentro de los que destaca la fosforilación inhibitoria de proteínas bloqueadoras de la actividad de mTORC1, como el complejo TSC2/TSC1 y PRAS40. A su vez, la acción de AKT es favorecida por mTORC2, el cual fosforila a AKT en la Thr450 y en la Ser473, promoviendo su estabilidad y activación respectivamente. De esta manera se integra una compleja relación entre la señalización de ambas cinasas, en la cual mTORC2 lleva a la activación de AKT y ésta, a la activación de mTORC1.

Los factores de crecimiento, como la insulina y otros estímulos activan a mTOR. Estos factores activan receptores tirosina cinasa y receptores acoplados a proteína G y estimulan a mTOR a través de la activación de la vía de PI3K-AKT y la vía de Ras-ERK-RSK [150, 151, 185, 198]. La estimulación de estas vías induce la fosforilación inhibitoria de TSC2 (*tuberous sclerosis 2*, también conocida como tuberina) por AKT [199-201], ERK1/2 (*Extracellular-signal-Regulated Kinase 1/2*) [202, 203] y RSK1 (*p90 Ribosomal S6 Kinase 1*) [202, 204]. TSC2 tiene un dominio GAP y junto con TSC1 (*tuberous sclerosis 1*, también conocida como hamartina) forma el complejo TSC1-TSC2 que actúa como un GAP (GTPase activating protein) para la GTPasa pequeña RHEB, que la convierte a su forma inactiva unida a GDP [205-207]. RHEB es un miembro de la superfamilia Ras de proteínas que unen GTP, que se une directamente a un pequeño lóbulo de la porción amino-terminal del dominio catalítico de mTOR. Cuando RHEB está cargado con GTP (conformación activa) potencia la actividad de cinasa de mTORC1 [208, 209]. Adicionalmente, RSK fosforila inhibitoriamente a TSC2 y a Raptor, promoviendo la actividad de cinasa de mTORC1 [210].

La señalización de mTORC1 es activada por AKT mediante mecanismos independientes, uno de ellos depende de evitar el efecto negativo de PRAS40, un compañero de unión de mTORC1 que en ausencia de estímulos mantiene inhibido a este complejo. La activación de AKT lleva a la activación de mTORC1 al fosforilar a PRAS40 e inducir su disociación de mTORC1, evitando así su efecto inhibitorio [211-213]. Existen reportes que muestran la fosforilación inhibitoria de PRAS40, por parte del que la propia mTORC1 [214, 215]. La activación de la vía de Wnt activa a mTORC1 por inhibición de la GSK-3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*). Esto es consistente con la observación de que GSK-3β fosforila a TSC2 estimulando su actividad de GAP sobre RHEB y la subsecuente inhibición de mTORC1 [216, 217].

Los aminoácidos son reguladores positivos de mTORC1 y hay evidencias que también de mTORC2. Entre los aminoácidos esenciales, la leucina parece ser más eficaz para inducir la señalización de mTORC1 y puede funcionar independiente de insulina o factores de crecimiento [218, 219]. La leucina es transportada a las células de una manera dependiente de la glutamina, a través de un sistema heterodimérico compuesto de los acarreadores SLC7A5 [*Solute Carrier family 7* (*cationic amino acids transporter*) *member 5*] y SLC3A2 [*Solute Carrier family 3* (*activators of dibasic and neutral amino acids transporter*) *member 2*] [220]. Se han propuesto diferentes mecanismos por los que los aminoácidos conducen a la activación de mTORC1, incluyendo a la VPS34 (*Vacuolar Protein-Sorting-associated protein 34*, también conocida como la subunidad catalítica PI3K class III)[221], la *Sterile20* (STE20) de la familia cinasas MAP4K3 (*mitogen-acivated protein Kinase Kinase Kinase Kinase 3*) [222] y las proteínas Rag, una familia de cuatro GTPasas pequeñas [223, 224].

Irantzu Tato y colaboradores [225] demostraron recientemente la activación del complejo 2 de mTOR por aminoácidos. El mecanismo de activación implica a la PI3K clase I que induce la fosforilación de AKT en la serina 473 y la posterior fosforilación de FOXO3a, un sustrato de AKT, evidenciando la importancia de los aminoácidos en la regulación de ambos complejos de mTOR. Otros

activadores de mTORC1 son el TNF$\alpha$ (*Tumour Necrosis Factor-$\alpha$* [226] el IKK$\beta$ [*inhibitor of nuclear factor-$\kappa$B*(NF-$\kappa$B)][227] y el ácido fosfatídico [228, 229].

Aunque se conoce poco de los activadores del complejo 2 de mTOR, se acepta a los factores de crecimiento como señales que ejercen un efecto estimulante de este complejo, puesto que promueven la fosforilación de AKT en serina 473 de una manera dependiente de mTORC2. Evidencia reciente indica que la activación de mTORC2 en respuesta a factores de crecimiento es directamente estimulada por PIP3 [230] y dependiente de su asociación con el complejo TSC1-TSC2 [231]. Martin y colaboradores identificaron a la Hsp70 (Heat Shock Protein of 70 kDa) como una proteína de unión a Rictor, que regula el ensamble y la actividad de mTORC2 [232].

La energía celular tiene un efecto indirecto en la actividad de mTOR. Cuando la energía celular disminuye, la actividad de cinasa de mTOR resulta inhibida, esto ocurre al disminuir los niveles de ATP y aumentar los de AMP. El incremento en los niveles de AMP o la proporción AMP:ATP inducen a la activación de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*), llevando a la reducción del consumo de ATP por la célula, en este caso a través de inhibir la traducción dependiente de mTOR [217, 233-235] (Figura 10).

## D. Familia de proteínas con dominios BAG.

La familia de proteínas BAG (*Bcl-2 associated athanogene*) modula la función proteica promoviendo el reclutamiento de chaperonas moleculares a sus proteínas blanco llevando a la alteración de su conformación. De esta manera se ha involucrado en la regulación de diversos eventos bioquímicos como la actividad de proteínas cinasas, la señalización de receptores y la actividad de factores de transcripción, que modulan funciones celulares que incluyen la división, la migración, la diferenciación y la muerte celular [236-239].

Diversos reportes sugieren la participación de la familia de proteínas BAG en diferentes condiciones patológicas como la carcinogénesis, la infección por VIH

y la enfermedad de Parkinson [238]. Las proteínas BAG son distinguidas por la presencia del dominio BAG, el cual media la interacción directa con el dominio ATPasa de la proteína de choque térmico de 70 KDa (Hsp70). El dominio BAG consiste en tres alfa-hélices anfipáticas [240, 241] y se ha sugerido que la unión de Hsp70 ocurre en la segunda y tercer alfa-hélices, basados en diferentes modelos de interacción[240-244], mientras que otros compañeros de unión se unen en la primera y segunda alfa-hélices[236].

La consecuencia funcional de esta interacción es el intercambio de nucleótido de la Hsp70, favoreciendo su activación y consecuentemente el plegamiento de sus proteínas sustrato [241, 245].

El nombre atanogen (del Griego *athánatos*, que significa “sin muerte”) fue escogido para estas proteínas ya que las células transfectadas responden menos drásticamente a los estímulos apoptóticos [246]. La familia BAG, en el humano, está comprendida por seis miembros, que incluyen BAG1 (RAP46/HAP46/HAP50), BAG2, BAG3 (CAIR-1, Bis), BAG4 (SODD), BAG5 y BAG6 (Scythe, BAT3). El gen de BAG5 se encuentra en el cromosoma 14 y codifica para una proteína que tiene 4 dominios BAG [236], aunque se ha descrito la presencia de un quinto dominio BAG corto [240]. Actualmente se reconocen tres variantes de splicing y dos isoformas (BAG5a y BAG5b) (Figura 11).

Reportes recientes denotan la interacción de BAG5 con ella misma (homodímeros), con el dominio ATPasa de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y con las ligasas de ubiquitina Parkina y CHIP. En ellos describen que BAG5 aumenta la degeneración neuronal dopaminérgica a través de la inhibición de la actividad chaperona de Hsp70 y la actividad de ligasas E3 de Parkina y CHIP, aumentando el secuestro de Parkina y la $\alpha$-sinucleína dentro de agregados proteicos. Esto contrasta con las funciones anti-muerte adscritas para los miembros de la familia de BAG y sugiere un potencial papel de BAG5 en la promoción de la neurodegeneración en un modelo de enfermedad de Parkinson [247, 248].

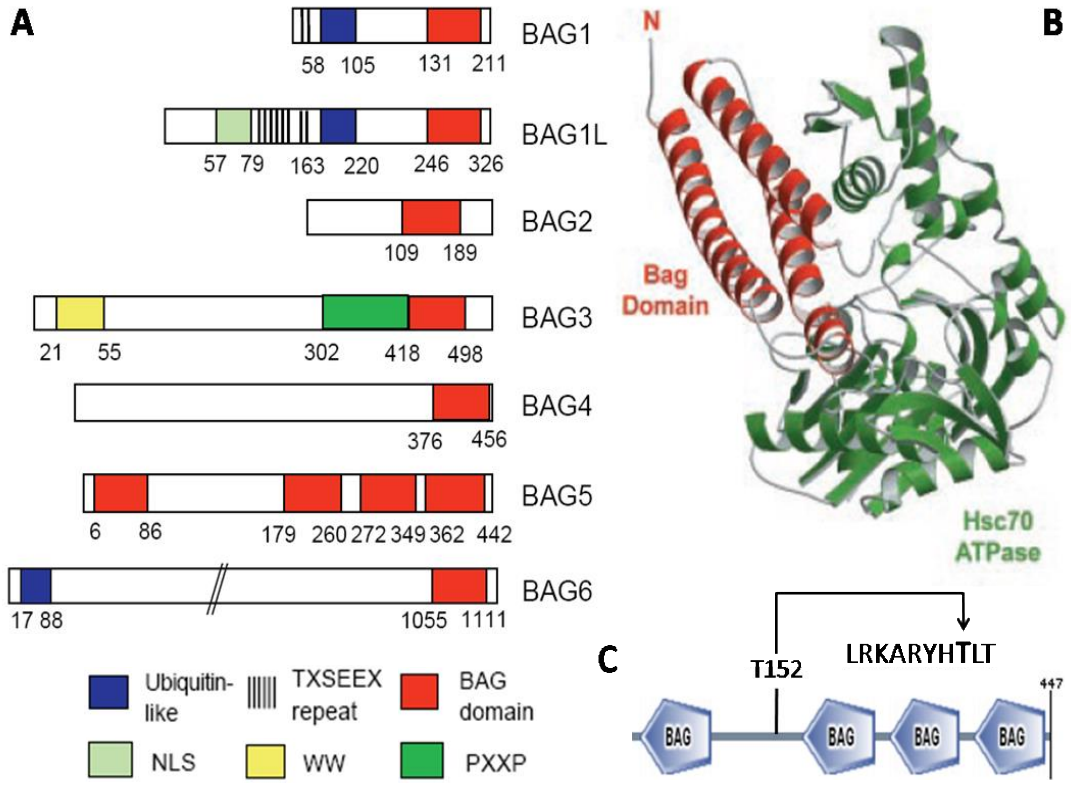



**Figura 11. La familia de proteínas BAG**. A) Arreglo lineal de los dominios de los miembros de la familia de proteínas BAG, incluye al domino BAG característico, así como otros dominios, tales como los dominios parecidos a ubiquitina (Ubiquitin-like), repeticiones TXSEEX, motivos ricos en prolina (PXXP), señal de localización nuclear (NLS) y dominios WW. BAG5 es el único miembro de la familia que contiene múltiples dominios BAG. B) Complejo formado entre el dominio BAG y el dominio ATPasa de la Hsc70. C) Estructura lineal de los dominios de BAG5 donde se indica la existencia de un sitio de fosforilación para AKT1 identificado por la herramienta bioinformática Scansite (condiciones poco estrictas) disponible en la World Wide Web (http://scansite.mit.edu.), según el sitio consenso de fosforilación por AKT1 (RXRXXS/T) [236, 241].

En contraste, otra línea de evidencia demostró que BAG5 funciona como un factor intercambiador de nucleótidos para Hsp70, promoviendo el plegamiento de sus proteínas sustratos [245]. Consistente con este planteamiento, BAG5 que se encuentra sobreexpresado en el cáncer prostático, interacciona e incrementa la actividad de ATPasa de la chaperona GRP78, favoreciendo el plegamiento de sus proteínas sustratos, lo cual inhibe la apoptosis inducida por el estrés del retículo endoplásmico [249]. Además, evidencia reciente propone a BAG5 como un supresor de tumor por estabilizar a PTEN en la línea celular de

cáncer de mama MCF-7 [250]. Las funciones de BAG5, u otros miembros de esta familia, son desconocidas en el proceso de migración celular.

Considerando que clonamos a BAG5 por interacción con el dominio catalítico mutante dominante negativo de AKT, proponemos que la asociación de BAG5 y AKT podría tener un efecto modulador de las acciones de esta cinasa, lo cual pudiera tener relevancia en el control que AKT ejerce en procesos tales como migración celular y angiogénesis. Además la secuencia de BAG5 contiene sitios consensos para fosforilación por AKT1 [251] (Figura 11C).

## E. Chaperonas moleculares.

La viabilidad y función celular dependen del correcto balance entre el plegamiento y la degradación de proteínas. Las chaperonas moleculares son miembros de diversas familias de proteínas caracterizadas por la habilidad de unirse a las proteínas que se encuentran en una conformación no nativa y favorecer el correcto plegamiento de las mismas, el ensamble oligomérico, el transporte a diferentes compartimientos subcelulares, así como la degradación de polipéptidos que no adquirieron un plegamiento adecuado, favoreciendo entonces su selección para ser enviados al sistema ubiquitina-proteosoma, estableciéndose una cooperación entre ambos sistemas.

### 1. Hsp70 (70 kDa Heat shock protein).

La familia de chaperonas Hsp70 se encuentra asociada con ribosomas, mitocondrias y el retículo endoplásmico, entre otros organelos. Dos formas principales de Hsp70 están presentes en el citosol: la forma expresada constitutivamente Hsc70 (*70 kDa heat shock cognate protein*) y la forma inducible Hsp70. Las proteínas Hsp70 actúan como monómeros en el reconocimiento y estabilización de polipéptidos no nativos. La estructura de dominios de las proteínas Hsp70 comprenden un dominio ATPasa amino terminal, un dominio de unión a péptidos y un dominio carboxilo terminal que

funciona como tapa permitiendo la entrada y liberación de los polipéptidos sustrato. La apertura y cierre del dominio carboxilo terminal es regulada por ciclos de unión a ATP y su hidrólisis por el dominio ATPasa. La conformación de Hsp70 unido a ATP, en donde el sitio de unión se encuentra expuesto, permite la unión del péptido sustrato. La conformación cerrada que estabiliza la unión con el péptido sustrato, es inducida por la hidrólisis de ATP y la consecuente adquisición de una conformación unida a ADP. Los ciclos de unión e hidrólisis al ATP son la base para la interacción dinámica entre Hsp70 y los polipéptidos no nativos [252].

Debido a la hidrólisis sumamente ineficiente del ATP por parte de las proteínas Hsp70, son requeridas proteínas reguladoras llamadas cofactores de chaperonas o co-chaperonas para inducir de manera relevante el ciclo unión-hidrólisis del ATP (unión y liberación de los polipéptidos sustratos) y estimular el intercambio de nucleótidos. La familia de proteínas BAG pertenece a este grupo de cofactores de chaperonas, estimulando el intercambio de nucleótidos requerido para establecer un ciclo funcional. Las proteínas BAG actúan como factores intercambiadores de nucleótidos que inducen la descarga del péptido sustrato a partir de las proteínas Hsp70 en diversos procesos como plegamiento, ensamble y degradación [236, 238, 241].

La señalización y estabilidad de AKT está íntimamente ligada a su interacción con chaperonas moleculares como Hsp90 y Hsp70. Mientras que Hsp90 estabiliza a AKT, Hsp70 facilita su degradación [143, 253] en gran medida por su cooperación con el sistema ubiquitina-proteosoma [139]. Considerando la interacción descrita en este trabajo entre AKT y BAG5 y la interacción reportada de BAG5 con la chaperona Hsp70 y la ligasa de ubiquitina Parkina [245, 247], BAG5 pudiera funcionar como el enlace entre los sistemas de chaperona y ubiquitina-proteosoma con su sustrato, representado por la cinasa AKT. Además la regulación de AKT, repercutiría directamente sobre la activación de mTORC1, sin perder de vista que BAG5 podría también regular la estabilidad y activación de AKT favorecida por mTORC2.

**2. GRp58 (Glucose-Regulated protein 58).**

La proteína GRp58 (también conocida como ERp57) es una chaperona miembro de una familia de isomerasas de disulfuro, que está presente principalmente, aunque no de manera exclusiva, en el retículo endoplásmico. GRp58 contiene dos motivos Tioredoxina, que le permiten actuar como una tiol oxidoreductasa para catalizar la formación de enlaces disulfuro de glicoproteínas sustrato (Figura 12), actuando como una reguladora de procesos redox celulares. El nombre GRp58 es indicativo de que es una proteína de respuesta a estrés, cuya expresión se incrementa después de la depleción de glucosa [254, 255].

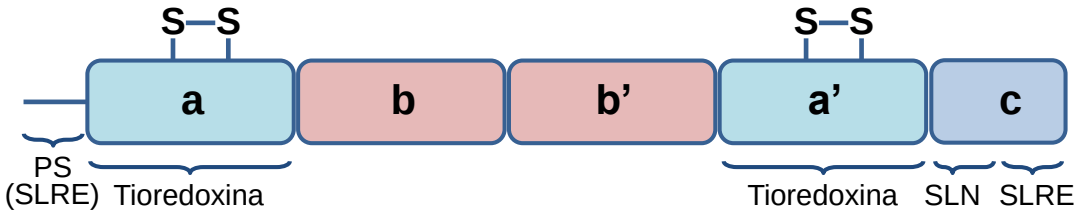



**Figura 12. Estructura de GRp58/ERp57.** La isomerasa de disulfuro GRp58/ERp57 que es codificada por el gen *PDIA3* ubicado en el cromosoma 15, se forma de 505 aminoácidos. Los primeros 24 aminoácidos constituyen un péptido señal de localización en el retículo endoplásmico (SLRE), y el carboxilo terminal contiene una secuencia clásica de retención en el retículo endoplásmico (SLRE), además de una señal de localización nuclear (SLN). En la estructura central se identifican 4 dominios llamados a, b, b', a' caracterizados por un plegamiento parecido a tioredoxinas, y los dominios a y a' además contienen una secuencia Cys-Gly-His-Cys que le confiere sus propiedades redox.

En el retículo endoplásmico GRp58 participa en el plegamiento y control de calidad de diversas glicoproteínas y en el ensamble del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (MHC1) [256]. Sin embargo, las funciones que desempeña GRp58 en otras diversas localizaciones subcelulares no están del todo claras, aunque se ha involucrado primariamente en la regulación de las interacciones proteína-proteína. GRp58 se ha localizado en el núcleo, formando parte de complejos multiproteicos o asociado directamente al DNA, esto se ha explicado por la presencia de una señal de localización nuclear en su extremo carboxilo terminal. La relevancia funcional de esta localización está por

describirse, aunque existen evidencias que sugieren la regulación de la expresión de genes a través de promover la actividad del factor transcripcional Ref1 [257]. Además, GRp58 y STAT3 pueden formar complejos tanto en el citosol como en el núcleo, teniendo esto efectos reguladores sobre la señalización de STAT3 [258, 259].

Conociendo que la vía de transducción AKT/mTOR es regulada por las condiciones redox de la célula y que GRp58, una chaperona sensible al estado redox que fue identificada en nuestro laboratorio por su afinidad con el dominio de cinasa de mTOR, consideramos interesante explorar la posibilidad de que la vía AKT/mTOR fuera regulada por la asociación entre GRp58 y el dominio catalítico de la cinasa mTOR.

## F. Sistema ubiquitina-proteosoma.

El sistema ubiquitina-proteosoma se integra por un conjunto de proteínas que regulan numerosas funciones celulares, a través de marcar a las proteínas blanco con ubiquitina, un péptido de 76 aminoácidos que se transfiere con alta especificidad, mediante el proceso de ubiquitinación. El marcaje con ubiquitina se asoció inicialmente a la degradación vía proteosoma, sin embargo actualmente se describen múltiples funciones que incluyen la regulación del tráfico proteico, el ensamble de complejos de señalización y la activación enzimática. Mientras que la monoubiquitinación y algunos tipos de poliubiquitinación (ensambladas vía la lisina 63 de la ubiquitina) inducen una alteración en la función de la proteína sustrato por cambio en su estructura, interacción con otras proteínas y cambio en la localización), la poliubiquitinación ensamblada vía la lisina 48 de la ubiquitina direcciona a la proteína sustrato a degradación vía proteosoma [260, 261].

La ubiquitinación es una modificación postraduccional que consiste en la transferencia de una o varias ubiquitinas a los substratos, mediante la sucesión de tres reacciones enzimáticas: 1) activación de la ubiquitina, llevada a cabo por

la enzima activante de ubiquitina (E1), 2) transferencia de la ubiquitina activada a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y 3) transferencia de la ubiquitina de la E2 a los residuos de lisina de la proteína substrato, catalizado por la enzima ligasa de ubiquitina (E3). Las ligasas E3 de ubiquitina desempeñan una función primordial ya que se unen a proteínas substratos específicas y promueven su ubiquitinación, discriminando las proteínas que van a ser sujetas a regulación.

Parkina es una E3 ubiquitina ligasa que actúa sobre una variedad de sustratos, resultando en la poliubiquitinación y degradación vía proteosoma o monoubiquitinación y regulación de la actividad biológica [262-265]. Mutaciones en el gen *parkin* son causa común de parkinsonismo juvenil autosómico recesivo, de ahí que inicialmente se vinculó a Parkina como una ligasa de ubiquitina relacionada con la degeneración de las neuronas de la sustancia negra, causante de dicha patología. Estudios recientes muestran a Parkina como una Ligasa E3 multipropósito que participa en muchos otras funciones biológicas diferentes a su papel en el mantenimiento de la integridad o sobrevida de neuronas dopaminérgica [266-268].

## II. Planteamiento del problema.

La angiogénesis es un proceso fundamental para el desarrollo de diversas funciones fisiológicas como el crecimiento y desarrollo, la reproducción y la reparación. Alteraciones en los mecanismos de este proceso contribuyen en la patogenia de numerosas enfermedades de carácter neoplásico, inflamatorio, isquémico e inmune, entre otros. Conocer las bases moleculares que regulan las diferentes etapas del proceso angiogénico, en particular la migración endotelial, favorecerá el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de dichas enfermedades.

La participación de la vía de transducción de señales PI3K-AKT-mTOR está sólidamente fundamentada en el proceso de migración endotelial y angiogénesis, sin embargo, se desconocen los mecanismos efectores que la modulan. Considerando que las acciones de la vía PI3K-AKT-mTOR son fuertemente reguladas por la interacción de sus componentes con proteínas que facilitan o inhiben su actividad, nos propusimos caracterizar nuevos componentes moduladores de la vía PI3K/AKT/mTOR a partir de su afinidad por los dominios catalíticos de las cinasas de proteínas de esta vía (AKT y mTOR) y, dado que como elemento común identificamos proteínas con función de chaperonas o co-chaperonas, nos propusimos caracterizar los efectos de estas interacciones bajo la premisa de que la interacción con proteínas chaperonas pudiera representar un mecanismo regulador común en la cascada de AKT/mTOR, particularmente relevante en el contexto de la migración endotelial y angiogénesis.

## III. Hipótesis.

La vía de transducción PI3K/AKT/mTOR es regulada por proteínas co-chaperonas y chaperonas con afinidad por los dominios catalíticos de las cinasas AKT y mTOR, manteniendo atenuada la cascada de transducción en condiciones de estrés nutricional y favoreciendo sus efectos moleculares y celulares, tales como migración, en condiciones de estímulo celular.

## IV. Objetivo general.

Evaluar el efecto de proteínas co-chaperonas y chaperonas (BAG5 y GRp58), identificadas por su afinidad por los dominios catalíticos de las cinasas AKT y mTOR (respectivamente), en la actividad de estas cinasas que forman parte integral de diversas cascadas de transducción de señales angiogénicas moduladoras de la migración endotelial.

## V. Objetivos particulares.

1. Caracterizar la interacción de nuevos reguladores de las cinasas AKT y mTOR que presenten afinidad por sus dominios catalíticos (BAG5 y GRp58 respectivamente).
2. Determinar la participación de BAG5 y GRp58 en la estabilidad y señalización de las cinasas AKT y mTOR en respuesta a estímulos que promueven la activación de esta vía.
3. Evaluar la influencia de BAG5 en eventos celulares dependientes de la activación de AKT y la regulación recíproca entre AKT y BAG5.

## VI. Estrategia experimental.

La figura 13 muestra la estrategia experimental global con la que abordamos los objetivos planteados. La identificación de proteínas con afinidad por el dominio catalítico de AKT se realizó mediante un tamizaje en una librería de cDNAs comercial por medio del ensayo de doble híbrido en levaduras. Las clonas positivas fueron secuenciadas e identificadas usando el algoritmo BLAST que compara la secuencia con bases de datos disponibles públicamente. De las proteínas obtenidas del tamizaje, la proteína BAG5 resultó particularmente interesante debido a las funciones con las que se han asociado los miembros de la familia de proteínas a la que pertenece, dentro de las que destacan la modulación de la función proteica por modular su conformación y estabilidad. Además, las proteínas de la familia BAG, están involucradas en la sobrevivencia celular, función en la que AKT tiene una participación demostrada. Debido a ello la proteína BAG5 fue seleccionada para caracterizar la interacción en células de mamífero y evaluar los efectos de dicha interacción.
La caracterización de los efectos de la interacción AKT-BAG5 se llevó a cabo en células modelo de mamífero (HEK293, HEK293T, HeLa, PAE) auxiliándonos de factores angiogénicos que inducen la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR como el VEGF, HGF, S1P y SDF-1 y del inhibidor de la vía wortmanina.
La interacción entre BAG5 y AKT se confirmó en células de mamífero por medio de inmunoprecipitación y ensayos de purificación por afinidad (pull-down), donde se emplearon construcciones de BAG5 y AKT para determinar la región mínima de interacción y el factor angiogénico HGF para determinar el efecto del estímulo. Además se visualizó la colocalización de AKT y BAG5 con ensayos de inmunofluorescencia analizados con microscopía confocal.
Con el objeto de evaluar el efecto de BAG5 sobre la estabilidad y activación de AKT en respuesta a factores angiogénicos, inhibimos la expresión mediante el uso de un shRNA de interferencia o sobreexpresamos a BAG5 y detectamos, por medio de inmunoblot, la forma activa (fosforilada en Ser473) y no activa de AKT y de algunos de sus sustratos, así como para la cinasa ERK como control.

Además, para determinar los efectos de BAG5 sobre la estabilidad de AKT, empleamos el inhibidor del proteosoma MG132 y evaluamos la influencia de Hsp70 y Parkina, compañeros de unión conocidos para BAG5.

La participación de BAG5 en la migración celular dependiente de la activación de AKT en respuesta al factor angiogénico HGF, se observó mediante ensayos de quimiotaxis en cámara de Boyden y ensayos de cierre de herida, donde se utilizó una construcción de BAG5 fusionada a la proteína verde fluorescente. La migración de las células fluorescente se analizó mediante microscopía de fluorescencia en célula viva.

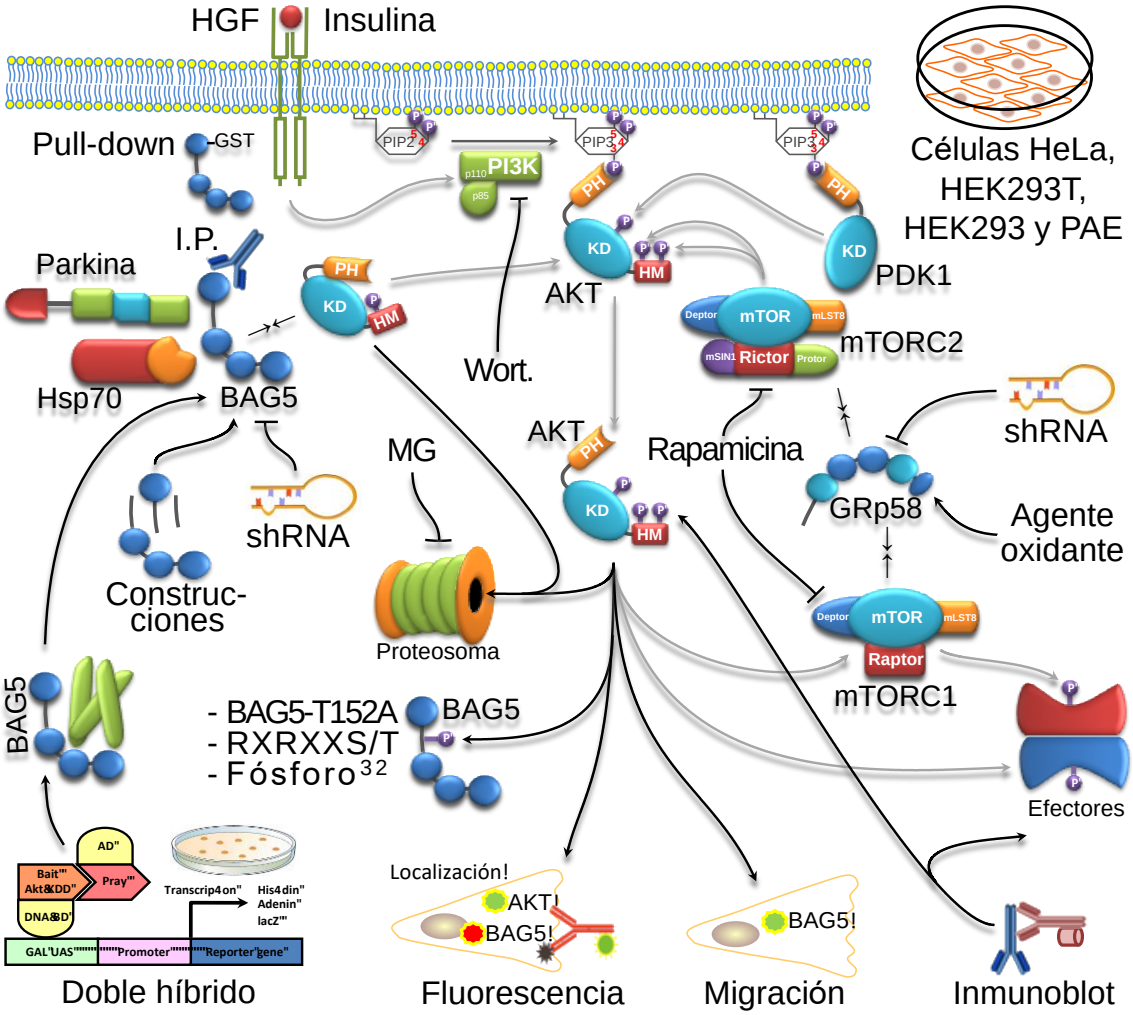


**Figura 13. Estrategia experimental**. Con el propósito de caracterizar el efecto de co-chaperonas (BAG5) y chaperonas (GRp58) con afinidad por los dominios catalíticos de las cinasas AKT y mTOR, componentes esenciales de diversas cascadas de transducción de señales angiogénicas, empleamos el sistema de doble híbrido a partir de una librería de cDNAs comercial. A partir del tamizaje de doble híbrido, seleccionamos la proteína BAG5 para confirmar la interacción en células de mamífero (HEK293, HEK293T, HeLa, PAE) por medio de inmunoprecipitación, pull-down e inmunofluorescencia, la cual se caracterizó en células estimuladas con HGF y con el empleo de construcciones de ambas proteínas. El efecto de BAG5 sobre la estabilidad y actividad de AKT se determinó inhibiendo su expresión mediante el uso de shRNA o sobreexpresando a BAG5, detectando por inmunoblot la AKT total y la fracción fosforilada, así como alguno de sus efectores. Los eventos celulares dependientes de la activación de AKT se evaluaron en ensayos de migración en respuesta al factor angiogénico HGF, con ayuda de la cámara de Boyden y microscopía de fluorescencia. La wortmanina y el MG132 se emplearon para inhibir la activación y la degradación de AKT respectivamente. La fosforilación de BAG5 en respuesta a estímulos que activan AKT se detectó en ensayos de fosforilación con fósforo radiactivo ($^{32}P$) y por el anticuerpo que reconoce sustratos fosforilados de AKT (RxRxxS/T), utilizando mutantes de AKT que inhiben (AKT-K179M, dominante negativa) o exacerban (myr-AKT, constitutivamente activa) su función y una mutante de BAG5 carente del sitio de fosforilación por AKT (BAG5-T152A). En cuanto el efecto de GRp58, que previamente había sido identificada en el laboratorio por su afinidad por el dominio catalítico de mTOR, sobre la actividad de AKT que se ubica río arriba del complejo mTORC1 y es un sustrato del complejo mTORC2, utilizamos estrategias equivalentes, consistentes en la inhibición de su expresión mediante un shRNA especifico y además empleamos una estrategia de sobreexpresión. Las células incubadas con Rapamicina se estimularon con el factor de crecimiento insulina o el agente oxidante PAO (óxido de fenilarsina) y posteriormente se determinó la activación de los complejos de mTOR, detectando la fosforilación de sus efectores río abajo mediante inmunoblot.

La visualización de BAG5 como un posible sustrato de AKT se abordó detectando la fosforilación de BAG5 mediante ensayos de fosforilación con fósforo$^{32}$ y con un anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas por AKT en su motivo consenso (RxRxxS/T), empleando construcciones constitutivamente activa (myr-AKT) y dominante negativa (AKT-K179M) de AKT, así como una mutante de BAG5 en el sitio consenso de fosforilación por AKT previsto por la herramienta bioinformática Scansite (BAG5-T152A).

Considerando que en diversas cascadas de transducción de señales angiogénicas las cinasas AKT y mTOR forman parte integral de una misma vía y que previamente habíamos identificado en el laboratorio a la proteína GRp58 como una chaperona con afinidad por el dominio catalítico de mTOR, con un efecto regulador del ensamble del complejo mTORC1, decidimos explorar el

elemento común representado por la función de chaperonas como reguladoras de la cascada PI3K/AKT/mTOR. En cuanto al papel de GRp58 como reguladora de la vía, éste lo exploramos mediante estrategias comunes tales como el uso de shRNA y, en este caso, además utilizamos un estímulo que altera las condiciones redox, ya que había sido previamente reportado que estas afectan diferencialmente al complejo mTORC1, ubicado río abajo de la cinasa AKT. El estudio de las interacciones entre estas proteínas se hizo por medio de inmunoprecipitación en células HEK293T estimuladas con el agente oxidante PAO. La influencia de GRp58 sobre la señalización de los complejos de mTOR en respuesta a Insulina (un factor que activa la vía PI3K-AKT-mTOR) y al agente oxidante PAO (activador de mTORC1), se estudió inhibiendo la expresión por medio de un shRNA o sobreexpresando a GRp58 y detectando por inmunoblot la fosforilación de AKT, un sustrato del complejo mTORC2 y, asimismo, un activador del complejo mTORC1, así como de los sustratos de éste. En paralelo, se determinó, como control, la fosforilación de la cinasa ERK, valorando, además, la sensibilidad a Rapamicina, un inhibidor de la cinasa mTOR.

# VII. Metodología experimental.

La mayor parte de las técnicas que se requirieron para el desarrollo de este proyecto son de uso rutinario en el laboratorio y algunas se describen en detalle por Vázquez-Prado y colaboradores en la colección de *Methods in Enzymology* [269].

## A. Ensayo de doble híbrido.

El dominio de cinasa desprovisto de su actividad de cinasa de AKT1 murino (AKT1-K179M) se subclonó en el vector de expresión en levaduras que contiene la secuencia que codifica para el dominio de unión al DNA del factor de transcripción Gal4 (pGB3) y se usó como carnada para tamizar una librería de cDNA de cerebro fetal humano (Clontech) por el sistema de doble híbrido en levaduras, siguiendo las instrucciones técnicas del sistema Matchmaker III (Clontech) con las modificaciones descritas en Vázquez-Prado y colaboradores en la colección de *Methods in Enzymology* [269]. Las clonas positivas se seleccionaron en medios restrictivos carentes de Histidina, Leucina y Triptófano y por el indicador cromogénico de actividad de la $\alpha$-galactosidasa.

### 1. Principio del sistema de doble híbrido.

El sistema de doble híbrido se utiliza para identificar nuevas interacciones proteína-proteína, valiéndose de cepas de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* como receptoras de los plásmidos que contienen la secuencia que codifica para las proteínas que eventualmente interaccionan entre si. El sistema de doble híbrido en levaduras se fundamenta en la reconstitución del factor de transcripción Gal4, el cual consta del dominio de unión al ADN (DNA-BD) y el dominio de activación (AD), para activar la transcripción de genes reporteros como *HIS3* (Histidina), *ADE2* (Adenina) y *lacZ* ($\alpha$-galactosidasa). El vector de expresión en levaduras portador del dominio de unión al DNA (pGB3) contiene

además, la secuencia de cDNA de la proteína de nuestro interés (dominio de cinasa dominante negativo de AKT en este caso). Mientras que el vector de expresión en levaduras portador del dominio de activación (pACT2) contiene la librería de cDNA en la que se identificaría la proteína de interacción.

La interacción entre la proteína de interés y la proteína de identidad desconocida proveniente de la librería tamizada, supone la suficiente aproximación de los dominios de unión al DNA y activador, reconstituyéndose el factor transcripcional GAL4 y activando la transcripción de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* que le permiten crecer en medios restrictivos carentes de Histidina, Adenina y la capacidad de que la $\alpha$-galactosidasa hidrolice a el sustrato X-$\alpha$-Gal, que torna de color azul las colonias de levaduras (Figura 14). Complementariamente, los vectores de expresión en levadura contienen la secuencia que codifica para la sintasa de Triptófano (pGB3) y la sintasa de Leucina (pACT2). Así, las colonias de levaduras que contengan ambos plásmidos pueden crecer en medios carentes de Triptófano y Leucina (Figuras 14 y 15).

El crecimiento de las levaduras en medios desprovistos de Triptófano, Leucina y al menos uno de los siguientes: Adenina e Histidina, así como la coloración azul en presencia del sustrato cromogénico X-$\alpha$-Gal, indica que existe interacción entre la proteína de fusión de interés y la proteína de fusión proveniente de la librería. Las clonas positivas (levaduras que crecen en medio -L, -T, -H/-A y X-$\alpha$-Gal+), se secuencian y se identifican usando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) que compara la secuencia con bases de datos disponibles públicamente (Figuras 14 y 15).

**2. Obtención de levaduras que expresan la carnada.**

El dominio catalítico de AKT1 dominante negativo (AKT1-KDD) subclonado en el vector de expresión en levaduras pGB3, se introdujo en levaduras de la cepa AH109 mediante transformación de levaduras. Para ello, levaduras AH109 congeladas se sembraron en medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) agar

suplementado con Adenina y se incubaron a 30ºC durante 48 horas (incubadora Forma Scientific, Inc.), con el objeto de optimizar su metabolismo.

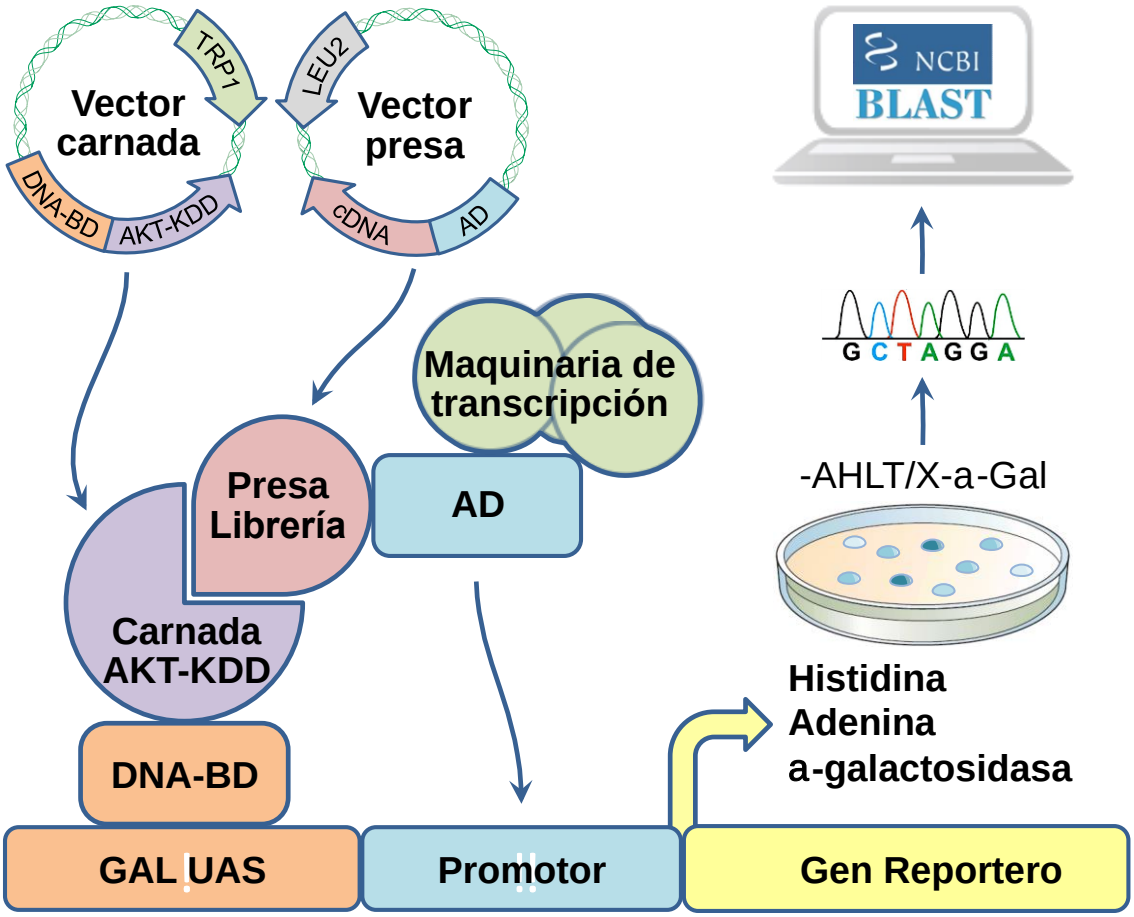



**Figura 14. Fundamento del sistema de doble híbrido en levaduras.** El dominio de unión al ADN (DNA-BD, por sus siglas en inglés) del factor de transcripción GAL4 de levaduras, se une a las secuencias de activación de la transcripción GAL4 UAS (*Upstream Activating Sequences*) río arriba de los genes reporteros. Este dominio se encuentra fusionado al dominio catalítico de AKT dominante negativo usado como carnada. La interacción de la carnada con una proteína proveniente de la librería de cDNA, denominada presa, la cual está fusionada al dominio activador (AD, por sus siglas en inglés) del factor transcripcional GAL4 de levaduras, provoca que el dominio de activación se sitúe contiguamente al sitio de inicio de la transcripción, lo cual activa la transcripción de genes reporteros y la síntesis de Histidina, Adenina y α-galactosidasa. Esto permite el crecimiento de las levaduras en medios carentes de Histidina y Adenina (-AH) y que la colonia obtenga una coloración azul por la acción α-galactosidasa sobre el sustrato cromogénico X-α-Gal. El crecimiento en el medio desprovisto de Leucina y Triptófano indica la presencia de ambos plásmidos (vector carnada y vector presa) en las levaduras (-LT). Las clonas positivas fueron secuenciadas e identificadas usando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que compara la secuencia con bases de datos disponibles públicamente.

Las colonias recién crecidas (2-3 mm de diámetro) se picaron con un asa estéril y se crecieron en 15 ml de medio YPDA líquido a 30ºC durante toda la noche (16-18 horas) en agitación continua (200-250 rpm). Posteriormente se centrifugan a 2000 rpm por 5 minutos y se decanta el sobrenadante. Para eliminar los restos del medio, se lava la pastilla de levaduras de color rosa, resuspendiéndola en 20 ml de agua estéril y se centrifugan por 5 minutos a 2000 rpm. y se decanta el sobrenadante. Se desecha el sobrenadante y la pastilla se vuelve a resuspender en 3 ml Acetato de Litio (100mM) los cuales se transfieren a 2 tubos eppendorf y se centrifugan a 6000 rpm por 30 segundos. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende gentilmente en 600 μl de Acetato de Litio (100mM).

A continuación, se prepara la mezcla de transformación, para la cual se agregan en un tubo eppendorf 240 μl de PEG (Polietilenglicol) al 50 % p/v, 36 μl de Acetato de Litio 1M, 0.1-10 μg de plásmido pGB3-AKT-KDD (2-4 μl), 50 μl de DNA de cadena simple de esperma de Salmón (transportador) y agua estéril c.b.p. 360 μl. Posteriormente, agregamos 50 μl de las levaduras preparadas con anterioridad y se mezcla en vortex de manera gentil. La mezcla se incuba a 30 ºC por 30 minutos, mezclando por inversión cada 10 minutos; consecutivamente se incuba a 42 ºC por 30 minutos. Luego, se centrifuga a 6000 rpm durante 30 segundos, se descarta el sobrenadante y se resuspende gentilmente en 1 ml de agua estéril.

Las levaduras ahora transformadas se plaquean (10 μl) en cajas con medio DOBA (*Drop Out Base Agar*, QBIO-gene) carente de Triptófano (-T) y se incuban a 30 ºC durante 48 a 72 horas.

**3. Ensayo de doble híbrido.**

Después de evaluar que el plásmido pGB3-AKT-KDD no fuera capaz de activar el sistema de doble híbrido de manera inespecífica, revelado por la ausencia de crecimiento de levaduras en medios que restringen el crecimiento sólo para los casos en que exista interacción, se realiza el tamizaje por el ensayo de doble híbrido.

Las levaduras con pGB3-AKT-KDD se crecieron en medio líquido DOB (BIO 101, Inc.) sin Triptófano (-T) a 30ºC durante toda lo noche en agitación continua (200 rpm). Luego, se escala el crecimiento de las levaduras agregando 1 ml de la suspensión de levaduras con pGB3-AKT-KDD a cada uno de los tres frascos de 50 ml con medio DOB-T y se dejan crecer por 48-72 horas a 30ºC y 200 rpm, con el objeto de obtener 1 ml de levaduras con la carnada. Transcurrido ese tiempo se centrifugan a 2000 rpm por 5 minutos y se lavan con agua estéril en dos ocasiones. Finalmente las levaduras se resuspenden en 10 ml de medio YPD.

Con el objeto de encontrar proteínas (presas) con afinidad por el dominio catalítico de AKT (carnada), las levaduras AH109 con el vector pGB3-AKT-KDD que contiene la sintasa de Triptófano (TRP1), el dominio de unión al ADN del factor transcripcional GAL4 (DNA-BD) y nuestra carnada (AKT-KDD), se mezclaron con levaduras Y187 pretransformadas con el vector pACT2 que contiene la sintasa de Leucina, el dominio de activación del GAL4 y una librería de cDNA de cerebro fetal humano (Clontech). A las levaduras AH109 se les agregaron 1 ml de las levaduras Y187 y 38 ml de medio YPD, posteriormente se incubaron a 30ºC durante toda la noche en agitación lenta (20 rpm) para promover la conjugación de las levaduras. Después, las levaduras conjugadas se centrifugan a 2000 rpm por 5 minutos y se realizan dos lavados con agua estéril, resuspendiendo finalmente en 10 ml de agua estéril. En cajas de 25 cm con medio DOBA/-HLT (20 cajas) y DOBA/-AHLT (20 cajas), se sembraron alícuotas de 250 μl y se esparcieron con perlas estériles para plaquear. Las cajas se incubaron a 30ºC durante aproximadamente 1 mes, valorando el crecimiento de colonias cada 7 días (Figura 15).

La eficiencia de conjugación se determinó comparando el número de colonias por ml de levaduras que crecieron a las 72 horas después de sembrar 10 μ□ a partir de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10’000, 1:100’000 de levaduras que contenían la carnada, de levaduras que contenían la librería de cDNA y de las levaduras conjugadas en medios DOBA/-T, DOBA/-L y DOBA /-LT respectivamente.

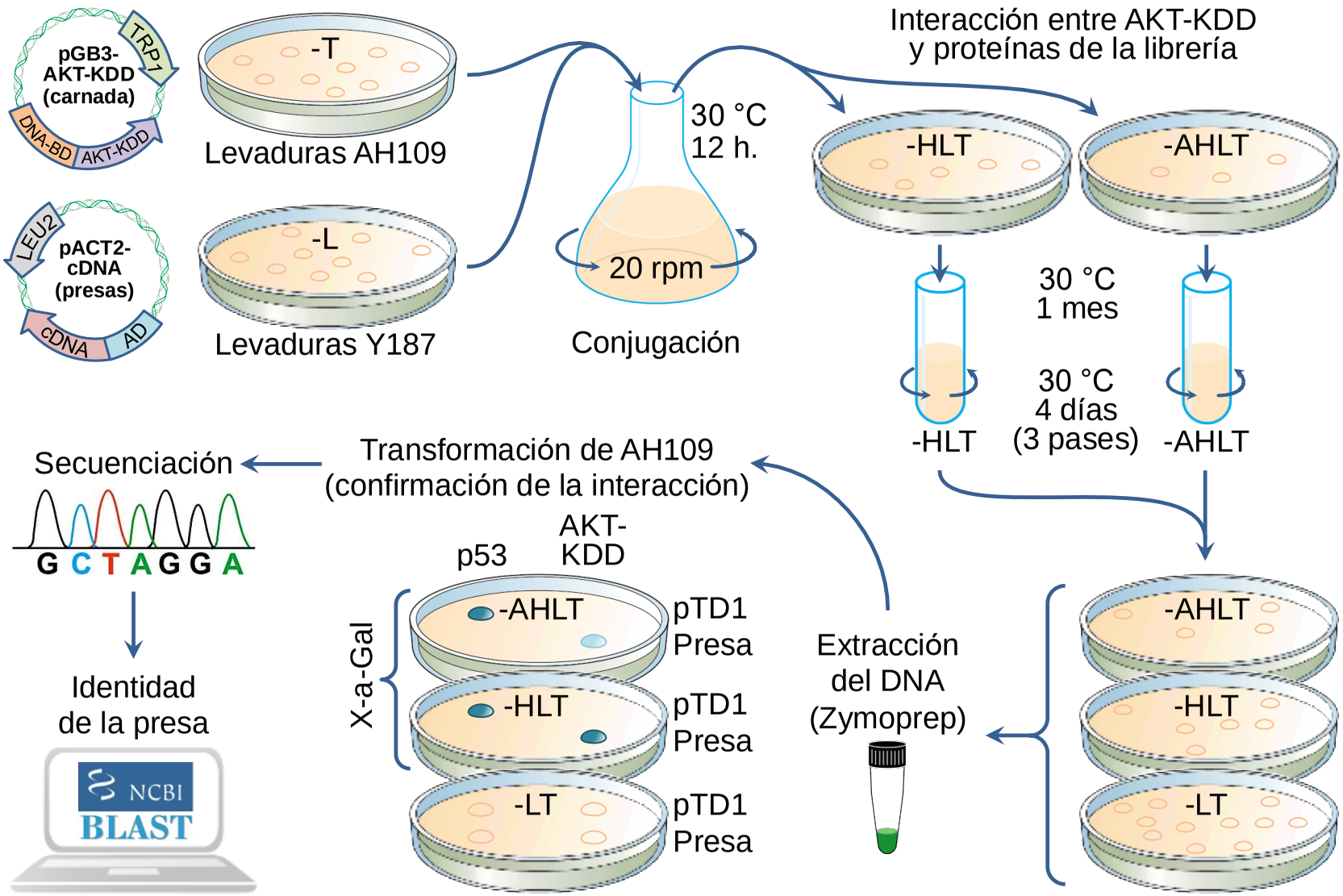

pGB3-
AKT-KDD
(carnada)
TRP1
DNA-BD
AKT-KDD
-T
Levaduras AH109
LEU2
pACT2-
cDNA
(presas)
cDNA
AD
-L
Levaduras Y187
30 °C
12 h.
20 rpm
Conjugación
Interacción entre AKT-KDD
y proteínas de la librería
-HLT
-AHLT
30 °C
1 mes
30 °C
4 días
(3 pases)
-HLT
-AHLT
-AHLT
-HLT
-LT
Extracción
del DNA
(Zymoprep)
Transformación de AH109
(confirmación de la interacción)
p53
AKT-
KDD
X-a-Gal
-AHLT
pTD1
Presa
-HLT
pTD1
Presa
-LT
pTD1
Presa
Secuenciación
G C T A G G A
Identidad
de la presa
NCBI
BLAST

**Figura 15. Ensayo de doble híbrido en levaduras.** Las levaduras AH109 transformadas con el vector de expresión en levaduras pGB3 que contiene nuestra carnada (AKT-KDD) fusionada al dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 y la sintasa de Triptófano, que les permite crecer en ausencia de Triptófano, se conjugan con levaduras Y187 pretransformadas con el vector de expresión en levaduras pACT2 que contiene el cDNA de la librería de cerebro fetal humano fusionado al dominio de activación del factor transcripcional GAL4 y la sintasa de Leucina, que les permite crecer en ausencia de Leucina. El crecimiento de las levaduras en medios restrictivos carentes de Leucina, Triptófano, Histidina (-HLT) y Adenina (-AHLT) sugiere la interacción entre la carnada AKT-KDD y proteínas de la librería. A partir de las clonas que mantuvieron su crecimiento tras varios pases en medio líquido y el goteo en medio sólido, se obtiene el cDNA de la proteína proveniente de la librería (Presa), que potencialmente interacciona con nuestra carnada. El cDNA de la Presa se cotransforma con la carnada (AKT-KDD) y se gotea en medios restrictivos (-AHLT, -HLT y LT) en presencia de X-$\alpha$-Gal como se indica. El crecimiento de las levaduras en medio -LT indica la presencia de ambos plásmidos, pero el crecimiento de las levaduras en los medios -HLT y -AHLT, así como la coloración azul de las colonias confirman la interacción entre la carnada (AKT-KDD) y la Presa. La interacción conocida entre p53 y pTD1 (antígeno T grande de SV40) se utilizó como control positivo. Además, las presas que interactuaron con p53 y las clonas que no mantuvieron su crecimiento en al menos el medio restrictivo -HLT o que no indujeron la coloración azul, se descartan. El cDNA de las clonas seleccionadas se secuencia y la identidad de la Presa se determina realizando un análisis bioinformático mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que compara la secuencia de la Presa con una base de datos de secuencias de DNA disponibles públicamente.

El crecimiento de levaduras en medios restrictivos de histidina y adenina, sugiere la interacción de la carnada con alguna proteína de la librería. Para confirmar esta posibilidad, las colonias más grandes se picaron y se crecieron en medio líquido -HLT o -AHLT por cuatro días a 30 ºC en agitación continua. Las levaduras que mantuvieron el crecimiento se les realizaron otros dos pases en el medio líquido de restricción. Cuando las clonas conservaron su crecimiento después de tres pases en medio restrictivo, se consideró que había interacción verdadera y se seleccionaron para crecerlos en medios sólidos restrictivos. Se puso una gota (5 $\mu$□) de cada clona en medios sólidos restrictivos -HLT y -AHLT en presencia de X-$\alpha$-Gal y se incubaron a 30 ºC durante 7 días (Figura 15).

Las clonas se pueden seleccionar en base a la astringencia de la interacción, así menor astringencia, incrementa el número de falsos positivos, mientras que alta astringencia reduce el número de falsos positivos, pero se pueden perder

interacciones débiles o resultar en falsos negativos. Las condiciones de alta astringencia incluyen el crecimiento de clonas en medio -AHLT y que muestren coloración azul, indicando una interacción estable de alta afinidad. Las condiciones de astringencia media, consideran el crecimiento en medio -HLT y coloración azul o solamente el crecimiento en el medio -HLT, denotando una interacción menos estable. Las condiciones de baja astringencia manifestado por el crecimiento en medio -LT, revelan una posible interacción de muy baja afinidad o solamente la presencia de los plásmidos cotransformados. Se seleccionaron las clonas que mostraron crecimiento al menos en condiciones de astringencia media, con las dos características de selección, crecimiento en -HLT y coloración azul de la colonia (Figura 15).

**4. Obtención del cDNA de las levaduras.**

Las clonas elegidas en base a su astringencia, se les extrajo el cDNA, empleando el Kit *Zymoprep, Yeast Plasmid Minipreparation*™ (Zymo Research, No. Cat. D2001). Las levaduras crecidas en medio líquido -HLT a 30 ºC por 24 horas se centrifugaron a 2000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende suavemente en 150 μ□ de buffer de digestión. Luego se agrega 1 μ□ de Zymolasa, se agitan gentilmente realizando varias versiones y se incuba a 30 ºC por 1 hora, mezclando por inversión cada 10 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionan 150 μ□ de buffer de lisis, se mezcla bien y enseguida se agregan 150 μ□ de buffer de neutralización mezclando vigorosamente. Después se centrifugan a 13200 rpm por 2 minutos y el sobrenadante se transfiere a tubos nuevos, donde se le añaden 400 μ□ de isopropanol. Posteriormente los tubos se centrifugan a 13200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se aspira y se vuelve a dar una centrifugación corta (13200 rpm x 30 segundos) para eliminar el sobrenadante excedente. Finalmente la pastilla se resuspende con 35 μ□ de buffer TE. Con los plásmidos obtenidos se transforman bacterias y el plásmido se aísla mediante el Kit *GeneElute™ Plasmid Miniprep* (SIGMA, No. Cat. PLN350) (Figura 15).

**5. Confirmación de la interacción e identidad de la presa.**

Con el objeto de comprobar la especificidad de la interacción recién encontrada, se cotransformaron levaduras con el plásmido con el cDNA de la proteína (presa) de la probable interacción y el plásmido de la carnada (AKT-KDD). Además se cotransformaron levaduras AH109 con plásmidos que codifican para proteínas que presentan una interacción conocida [p53 como carnada y el antígeno T grande de SV40 (pTD1) como presa], como control positivo y las combinaciones entre las distintas carnadas y presas no relacionadas, como control negativo. Las combinaciones carnada-presa quedan de la siguiente manera: p53-pTD1, p53-presa de la librería, AKT-KDD-pTD1 y AKT-KDD-presa de la librería. Una vez obtenidas las colonias de levaduras cotransformadas en medio DOBA/-LT, se pican las colonias con asas estériles y se resuspende en 1 ml de agua estéril. Posteriormente se dejan caer gotas de 5 $\mu$l en cajas con medios restrictivos -LT, -HLT y -AHLT, en presencia de X-$\alpha$-Gal en los dos últimos y se incuban a 30ºC hasta que aparezcan las colonias, usualmente en los primeros cuatro días. El crecimiento de las levaduras que contenían los plásmidos considerados como control negativo (p53-presa de la librería) descarta la selección de la colonia.

Las clonas positivas, que mostraron interacción específica con la carnada AKT-KDD, se secuenciaron y analizaron bioinformáticamente (análisis *in silico*) para conocer su identidad. El análisis bioinformático se realizó con el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), herramienta que compara la secuencia obtenidas a partir del ensayo de doble híbrido, con bases de datos de secuencias de DNA disponibles públicamente. A partir del alineamiento de secuencias realizadas mediante la herramienta BLAST, se seleccionaron las secuencias de identidad conocida que presentaron el 100% de homología con la secuencias obtenidas a partir del doble híbrido. De esta manera se reveló a identidad de las proteínas prevenientes de las clonas que presentaron interacción con la dominante negativa del dominio catalítico de AKT (AKT-KDD) (Figura 15).

**6. Soluciones empleadas.**

- *YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) Agar:* Para preparar 1 litro, disolver 10 g de extracto BactoYeast (concentración final 1 %) (Becton, Dickinson and Company, No. Cat. 212750), 20 g de BactoPeptona (concentración final 2 %) (Becton, Dickinson and Company, No. Cat. 211705), 20 g de Dextrosa (concentración final 2 %) (JT Baker, No. Cat. 1916-01) y 20 g de Agar (concentración final 2 %) (Becton, Dickinson and Company, No. Cat. 215000) en 500 ml de agua desionizada (MilliQ), y aforar a 1 litro. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121 ºC y 15 psi durante 15 minutos. Esperar que se enfríe a una temperatura cercana a la corporal (≈37 ºC) y verter aproximadamente 10 ml a cajas Petri estériles de 10 cm. Una vez frías guardar a 4 ºC. El medio YPD líquido consiste en los mismos ingredientes pero sin el agar. Se esteriliza de la misma manera y una vez fría se almacena a 4 ºC.
- *YPDA (YPD suplementado con Adenina):* Para 1 litro de YPD agregar 15 ml de Adenina hemisulfatada (Sigma, No. Cat. A-3159) al 2 % esterilizados por filtración (Filtro Millex GS de 0.22 μM, Millipore, No. Cat. SLGS033SB), para una concentración final de 0.003%.
- *PEG (Polietilenglicol):* Se disuelve Polietilenglicol (Fluka BioChemika, No. Cat. 81253) en gua desionizada (milliQ) para que quede al 50 % p/v. Se esteriliza por filtración (Filtro Millex GS de 0.22 μM, Millipore, No. Cat. SLGS033SB) y se almacena a temperatura ambiente bien tapado para evitar la evaporación del agua.
- *Acetato de Litio 1 M:* Se disuelve la cantidad necesaria de Acetato de litio (Sigma, No. Cat. L6883) en agua desionizada (milliQ) para obtener una concentración de 1 molar. Se esteriliza por filtración (Filtro Millex GS de 0.22 μM, Millipore, No. Cat. SLGS033SB) o en autoclave para ciclo líquido y se almacena a temperatura ambiente. Para preparar 100 ml de Acetato de Litio 100 mM, tomamos 10 ml de la solución de Acetato de Litio 1 M y lo aforamos a 100 ml con agua desionizada (milliQ), se almacena en botella de vidrio a temperatura ambiente.

- *DNA de cadena simple (2 mg/L):* Disolver 200 mg de DNA de esperma de Salmón (Sigma, No. Cat. D1626) en 100 ml de buffer TE estéril y mezclar vigorosamente con barra magnética durante toda la noche a 4 ºC hasta disolverlo completamente. Alicuotar y almacenar a -20 ºC; antes de su utilización hervir durante 5 minutos y colocarlo rápidamente en hielo, con esto se consigue su esterilización.
- *Buffer TE (Tris-EDTA):* A partir de una solución stock de Tris [(hidroximetil) aminometano] (Bio-Rad, No. Cat. 161-0719) 1 M con pH de 8 ajustado con HCL, tomar la cantidad necesaria para obtener una concentración final 10 mM. A partir de una solución stock de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Research Organics Inc, No. Cat. 3002E) 0.5 M con pH de 8 ajustado con NaOH, tomar la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 1 mM. Mezclar adecuadamente por 5 minutos, ajustar pH a 8 con HCL y aforar al volumen deseado con agua desionizada (milliQ). Almacenar a 4 ºC.
- *DOB (Drop Out Base) sin aminoácidos*: Para preparar 1 litro pesar 27 gramos de DOB (BIO 101, Inc., No. Cat. 4025-032), que contiene 1.7 g de base nitrogenada de levadura, 20 g de dextrosa y 5 g de sulfato de amonio, agregar la mezcla de aminoácidos que se requiera, aforar a 1 litro de agua desionizada (milliQ) y mezclar perfectamente. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4 ºC, correctamente rotuladas (-T, -L, -LT, -HLT, -AHLT).
- *DOBA (Drop Out Base Agar) sin aminoácidos*: Para preparar 1 litro pesar 43.7 g de DOBA (QBIO-gene, No. Cat. 4026-032), que contiene base nitrogenada de levadura, dextrosa, sulfato de amonio y agar, añadir la mezcla de aminoácidos que se requiera y disolver perfectamente los componentes en 100 ml de agua desionizada (milliQ). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Permitir que se enfríe a temperatura ambiente, lo suficiente para poder manipular la botella. En la campana donde se manipulan las levaduras y bacterias (Nuaire, modelo 126-300), se adiciona la cantidad adecuada en las cajas de cultivo antes de que se gelifiquen. Una vez que se gelifican y enfrían completamente, se colocan

boca abajo dentro de bolsas de plástico, se rotulan adecuadamente (-T, -L, -LT, -HLT, -AHLT) y se almacenan a 4ºC.

- *Mezcla de aminoácidos carente de Leucina (-L)*: Pesar 0.69 gramos de -Leu DO Supplement (Clontech, No. Cat. 8605-1) por cada litro de medio preparado.
- *Mezcla de aminoácidos carente de Triptófano (-T)*: Pesar 0.74 gramos de -Trp DO Supplement (Clontech, No. Cat. 8604-1) por cada litro de medio preparado.
- *Mezcla de aminoácidos carente de Leucina y Triptófano (-LT)*: Pesar 0.64 gramos de -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, No. Cat. 8608-1) por cada litro de medio preparado.
- *Mezcla de aminoácidos carente de Histidina, Leucina y Triptófano (-HLT)*: Pesar 0.62 gramos de -His/-Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, No. Cat. 8610-1) por cada litro de medio preparado.
- *Mezcla de aminoácidos carente de Adenina, Histidina, Leucina y Triptófano (-AHLT)*: Pesar 0.60 gramos de -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, No. Cat. 8619-1) por cada litro de medio preparado.
- *X-α-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosida):* Disolver 10 mg de X-α-Gal (Clontech, No. Cat. PT3352-2) por cada mililitro de dimetilformamida (DMF) y almacenar en frasco de cristal ámbar o de polipropileno protegido de la luz a -20 ºC. Esparcir 30 mL sobre cajas de 10 cm con ayuda de una pala o perlas de vidrio y dejar secar por 15 minutos a temperatura ambiente en campana.

## B. Transformación de bacterias.

### 1. Transformación de bacterias *E. coli* DH5 alfa.

Obtener las bacterias competentes (*Escherichia coli* DH5α) a partir del tanque de nitrógeno y descongelarlas en hielo durante aproximadamente 15 minutos. Mientras, rotular correctamente los tubos eppendorf con el nombre del plásmido

a transformar. Tomar 50 μl de la suspensión de bacterias competentes y verterlos en los tubos eppendorf que se encuentran en hielo, tratando de no manipular el vial de bacterias con las manos para no someterlas a un cambio térmico brusco con la temperatura de nuestras manos. Posteriormente agregar entre 1 y 5 μl de plásmido a los tubos con bacterias competentes correspondientes, mezclarlos suavemente e incubarlos durante 30 minutos a 4ºC (en hielo). Durante este periodo de incubación revisar la temperatura del termoblock (Barnstead, Thermolyne, Type 17600 Dri-Bath) y de ser necesario ajustarla a 42ºC; además, agregar agua desionizada (milliQ) a las ranuras del termoblock donde se van a colocar los tubos con la mezcla de transformación. Luego proporcionar un "choque térmico" a las bacterias, pasando súbitamente los tubos con la mezcla de transformación del hielo al termoblock a 42ºC durante 50 a 60 segundos e inmediatamente regresarlos al hielo e incubarlos ahí por 10 minutos. Después se recuperan a las bacterias agregando 300 μl de medio enriquecido Terrific Broth (Sigma, No. Cat. T-5574) o medio S.O.C (Invitrogen, No. Cat. 15544-034) e incubarlas a 37°C durante 1 hora a 150 rpm (Orbital Shaker Incubator, Mrc, modelo: TU-400). Si no se dispone de los medios enriquecidos anteriores, se pueden emplear los medios para cultivo de bacterias LB o Super Broth sin antibióticos. Durante este tiempo, las cajas petri con LB o Super Broth agar suplementados con el antibiótico adecuado para la resistencia del plásmido (ampicilina 100 μg/ml o kanamicina 50 μg/ml), se colocan en la campana para bacterias (Veco), se rotulan correctamente y se le agregan 4-6 perlas de vidrio. Cumplido el tiempo de recuperación de las bacterias, los tubos se centrifugan a 6000 rpm durante 1 minuto, en la campana de bacterias se retiran 200 μl del sobrenadante y se resuspende la pastilla de bacterias con el medio remanente. Agregar de 10 a 30 μl de la suspensión de bacterias a la caja correspondiente, dispersarlos con movimientos suaves y dejar que se reabsorba por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, colocar las cajas boca abajo y en un movimiento súbito golpearlas suavemente para despegar las perlas del agar. Enseguida se

colocan en la incubadora de bacterias (Bio-Rad, No. Modelo BR-150) a 37ºC durante 8 a 14 horas.

Pasado este tiempo, ya se observan colonias de bacterias lo suficientemente aisladas para picarlas y crecerlas en medio líquido, para lo cual, se retiran las cajas de la incubadora, se recuperan las perlas de vidrio y se colocan a temperatura ambiente en el interior de la campana. Se rotulan tubos de ensaye o tubos plásticos de aproximadamente 15 ml con tapa y se le agregan entre 5 y 7 ml de medio de cultivo para bacterias LB o Super Broth con el antibiótico en el que crecieron las bacterias (al que el plásmido confiere resistencia). El medio líquido debe estar a temperatura ambiente, por lo que debe retirarse de refrigeración con anterioridad y atemperarse en la campana para bacterias. Luego, se pican las colonias de bacterias y se disuelven en el medio de cultivo para bacterias, se tapan y se colocan en una gradilla a 45 grados en el interior del agitador de bacterias (Orbital Shaker Incubator, Mrc, modelo: TU-400) incubándolas a 37ºC, durante 8 a 14 horas, en agitación continua (150 rpm). Transcurrida la incubación el medio adquiere un aspecto turbio por el crecimiento de las bacterias. En este punto, de manera opcional, se pueden congelar las bacterias que incorporaron el plásmido, tomando 500 μl de la suspensión de bacterias, mezclarlas con 500 μl de glicerol al 30 % y almacenarlas en el ultracongelador (Forma Scientific, modelo 8559) a -70ºC. El resto de las bacterias se centrifugan a 2000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos (Sorvall, RT 6000D) y a partir de la pastilla de bacterias se aísla el DNA.

**2. Purificación de plásmidos por Miniprep.**

La suspensión de bacterias que se obtiene de picar las colonias de bacterias que crecieron en el agar, se centrifuga a 2000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y a partir de la pastilla de bacterias se aísla el DNA siguiendo las instrucciones del kit *GenElute Plasmid Miniprep* (Sigma, No. Cat. PLN350). La pastilla de bacterias se resuspende en 200 μl de la solución de resuspensión la cual está suplementada con RNAasa

A, con ayuda de una micropipeta y se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 ml adecuadamente rotulados. Posteriormente se agregan 200 μl de la solución de lisis, se realizan varias inversiones suavemente (4-6) durante las cuales se vuelve claro el lisado. Antes de que transcurran 5 minutos se agregan 350 μl de la solución de neutralización y se mezclan gentilmente mediante 4 a 6 inversiones. Luego los tubos se centrifugan a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf, modelo 5415 R).

Mientras transcurre la centrifugación se preparan las columnas de unión del DNA, para lo cual las columnas se colocan en tubos colectores de 2 ml correctamente rotulados, se agregan 500 μl de la solución de preparación de columnas y se centrifugan a 13200 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf, modelo 5415 D). El efluente, es decir, el líquido que cruzó el filtro de la columna y que se colectó en el fondo del tubo colector se descarta, quedando preparadas las columnas para unir el DNA plasmídico.

Finalizada la centrifugación del lisado de bacterias, el sobrenadante se transfiere a las columnas y se centrifuga a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se descarta el efluente, se agregan 750 μl de la solución de lavado que contiene etanol para remover contaminantes y se centrifuga a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se descarta el efluente y se centrifuga a 13200 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto para secar la columna.

Luego las columnas se transfieren a nuevos tubos colectores de 1.5 ml adecuadamente rotulados y se agrega la solución de elución (buffer TE o agua estéril Pisa) en un volumen comprendido entre 50 y 100 μl, si se requiere el DNA concentrado o diluido respectivamente). La solución de elución, no debe añadirse en las paredes de la columna, debe hacerse justo en el filtro de la columna.

La concentración y pureza del DNA se verifica haciendo una dilución 1:50 (2 μl de DNA más 98 μl de agua PISA) y leyendo la muestra en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 650) con luz UV a 260/280 nm de longitud de onda.

**3. Preparación de bacterias *E. coli* DH5 alfa competentes.**

Para poder introducir DNA foráneo a las bacterias con alta eficiencia, es necesario llevarlas a un "estado de competencia". El tratamiento de cultivos bacterianos frescos, en fase logarítmica de crecimiento, con agentes químicos permite debilitar la estructura de su pared celular haciendo que se puedan introducir en las células DNAs de diversos orígenes. Durante y después del proceso, la manipulación de las bacterias debe ser con extremo cuidado, ya que la alteración la pared por el tratamiento con químicos aumenta el grado de fragilidad de las bacterias.

A partir del cultivo de bacterias *Escherichia coli* DH5 alfa en cajas de LB agar a 37ºC durante toda la noche, se picaron de 10 a 12 colonias grandes y se crecieron en 250 ml de solución SOB en botellas de vidrio de 1 litro a 19 ºC en agitación vigorosa (Shaker bath, Forma Scientific, modelo 2564) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm (Espectrofotómetro Beckman, modelo DU 650), la cual comúnmente se obtuvo entre 24 y 36 horas. Posteriormente el frasco se colocó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 4000 rpm a 4ºC durante 10 minutos (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifugue). Después de descartar el sobrenadante, la pastilla se resuspendió suavemente en 80 ml de solución TB enfriada a 4ºC en hielo y se incubó en hielo durante 10 minutos. Luego se volvió a centrifugar a 4000 rpm a 4ºC durante 10 minutos y la pastilla se resuspendió en 20 ml de solución TB enfriada en hielo y 1.4 ml de DMSO (Sigma) que se enfrió en refrigeración a -20ºC previo a su uso. Finalmente se realizaron alícuotas de 200 μl en viales de criopreservación de 1.8 ml (Nunc, No. Cat. 368632) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

**4. Soluciones empleadas.**

- *Medio líquido LB (Lysogeny Broth)*: Para preparar 1 litro disolver 10 g de Bactotriptona (Becton Dikinson, No. Cat. 211705), 5 g de Extracto de levadura (Becton Dikinson, No. Cat. 212750) y 5 g de Cloruro de sodio (NaCl, Sigma, No. Cat. S-7653) en 950 ml de agua desionizada (milliQ). Ajustar el pH a 7.2-7.4 con Hidróxido de sodio 1N (NaOH, JT Baker, No. Cat. 3722),

aforar a 1 litro y esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y 15 psi. De ser necesario se agrega el antibiótico requerido, para lo cual se debe dejar enfriar el medio a 40ºC pare evitar la inactivación del mismo. En la campana de flujo controlado para bacterias se agregar la cantidad necesaria de ampicilina, kanamicina o gentamicina para que queden a una concentración final de 100 μg/ml, 50 μg/ml o 10 μg/ml respectivamente. Así, se deben agregar 1 ml de ampicilina (100 μg/μl), 500 μl de kanamicina (100 μg/μl) y 200 μl de gentamicina (50 mg/ml). Se almacena a 4ºC.

- *Medio líquido SB (Super Broth)*: Para preparar 1 litro disolver 32 g de Bactotriptona (Becton Dikinson, No. Cat. 211705), 20 g de Extracto de levadura (Becton Dikinson, No. Cat. 212750) y 5 g de Cloruro de sodio (NaCl, Sigma, No. Cat. S-7653) en 900 ml de agua desionizada (milliQ). Ajustar el pH a 7.2-7.4 con Hidróxido de sodio 1N (NaOH, JT Baker, No. Cat. 3722), aforar a 1 litro y esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y 15 psi. De ser necesario se agrega el antibiótico requerido, para lo cual se debe dejar enfriar el medio aproximadamente a 40ºC pare evitar la inactivación del mismo. En la campana de flujo controlado para bacterias se agregar la cantidad necesaria de ampicilina, kanamicina o gentamicina para que queden a una concentración final de 100 μg/ml, 50 μg/ml o 10 μg/ml respectivamente. Así, se deben agregar 1 ml de ampicilina (100 μg/μl), 500 μl de kanamicina (100 μg/μl) y 200 μl de gentamicina (50 mg/ml). Se almacena a 4ºC.
- *Agar LB (Lysogeny Broth) o SB (Super Broth)*: Para preparar 1 litro, se debe seguir el procedimiento descrito anteriormente para preparar LB o SB líquido pero agregando 12 g de Bacto agar (Beckton Dickinson, No. Cat. 2115000). Una vez agregado el antibiótico requerido y antes de que se enfríe (40ºC), se distribuye en las cajas de Petri para bacterias correctamente rotuladas, en el interior de la campana de bacterias, agregando la cantidad necesaria por caja de 10 cm para cubrir 2/3 partes de la caja. Una vez solidificado el agar (30-60 minutos), las cajas se colocan boca abajo dentro de bolsas de plástico. Se almacenan a 4ºC y son viables hasta por 2 meses.

- *Ampicilina*: Para preparar 10 ml, se disuelve 1 gramo de ampicilina (Sigma, No. Cat. A-0166) en 10 ml de agua desionizada (milliQ) para obtener una concentración final de 100 μg/μl. Se realizan alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se almacenan a -20ºC y se descongela en hielo (4ºC) para su uso.
- *Kanamicina*: Para preparar 10 ml, se disuelve 1 gramo de kanamicina (Gibco, No. Cat. 11815-024) en 10 ml de agua desionizada (milliQ) para obtener una concentración final de 100 μg/μl. Se realizan alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se almacenan a -20ºC y se descongela en hielo (4ºC) para su uso.
- *Gentamicina*: Empleamos la concentración de trabajo de 10 μg/ml, así, tomamos 20 μl de la solución de gentamicina 50 mg/ml (Gibco, No. Cat. 15750-060) por cada 100 ml de medio de cultivo de bacterias (líquido o agar).
- *Solución SOB*: Se disuelven en agua desionizada (milliQ) las cantidades necesarias para obtener las concentraciones indicadas de Extracto de levaduras (Becton, Dickinson and Company, No. Cat. 212750) 0.5%, Triptona (Becton, Dickinson and Company, No. Cat. 211705) al 2%, Cloruro de sodio (NaCl, Sigma, No. Cat. S-7653) 10 mM, Cloruro de potasio (KCl, Prod. Quím. Monterrey SA de CV) 2.5 mM, Cloruro de magnesio ($MgCl_2$, Q.B. Inc., No. Cat. 340-034-060) 10 mM y Sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 10 mM. Se disuelve adecuadamente y se esteriliza mediante autoclave.
- *Solución TB*: Se disuelven en agua desionizada (milliQ) las cantidades necesarias para obtener las concentraciones indicadas de PIPES (Sigma, No. Cat. P8203) 10 mM, Cloruro de calcio ($CaCl_2$) 15 mM y Cloruro de potasio (KCl, Prod. Quím. Monterrey SA de CV) 250 mM. Se disuelve adecuadamente, se ajusta el pH 6.7 con Hidróxido de sodio (NaOH, JT Baker, No. Cat. 3722) o Ácido clorhídrico (HCl, JT Baker, No. Cat. 9535-05) y se agrega la cantidad necesaria de Cloruro de manganeso ($MnCl_2$) para obtener la concentración de 55 mM. Finalmente se ajusta al volumen final, se

esteriliza por filtración con filtro de 0.45 μm y se almacena a 4ºC en botella de vidrio.

## C. Plásmidos y construcciones.

La construcción dominante negativa del dominio catalítico de AKT murino (AKT1-K179M) empleada como carnada en el ensayo de doble híbrido se subclonó a partir del plásmido pCEFL-AKT-KDD en el vector pGB3 de expresión en levaduras por PCR con los siguientes oligonucleótidos: AKT kdom-5'-BamHI ataGGATCCtttgagtacctgaaactact, AKT kdom-3'-EcoRI ataGAATTCaaagaaccggtgctgcatga, que permiten la inserción de sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.

El análisis de secuencia de las presas obtenidas del tamizaje por doble híbrido reveló a BAG5 completa como un compañero de unión de la cinasa AKT. Enseguida el cDNA que codifica para la proteína BAG5 se subclonó en los vectores de expresión en células de mamífero pCMV-HA, pCMV-Myc y pCEFL-EGFP a partir del vector de expresión en levaduras pACT2-BAG5 (presa en el doble híbrido). Finalmente se obtiene a BAG5 subclonada en vectores de expresión de mamífero marcada con los epítopes HA, Myc y EGFP.

Para los experimentos de precipitación por afinidad se utilizaron BAG5 completa y construcciones de BAG5 que incluyen la región linker sola (BAG5 N87-P181), la región linker extendida hacia el extremo amino terminal que contiene el primer dominio BAG (BAG5 M1-P181) y la región linker extendida hacia el extremo carboxilo terminal que contiene los tres dominios BAG restantes en tándem (BAG5 N87-Y447). Tanto BAG5 completo como las distintas construcciones se subclonaron por PCR en marco de lectura con la secuencia que codifica para GST en el vector de expresión en células de mamífero pCEFL-GST, empleando los siguientes primers:

- BAG5-5'-BamHI ataGGATCCatggatatgggaaaccaacatcc
- BAG5-5'N87-BamHI ataGGATCCaaccacccacaccggattg

- BAG5-3'P181-EcoRI ataGAATTCtcaaggatgtgcatcctcggaaagcg
- BAG5-3'-EcoRI ataAATTCtcagtactcccattcatcag

El shRNA (*short Hairpin RNA*) de BAG5 se generó en base a la secuencia shRNAhBAG5-669-HP_63610_TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGGTATCACAC-TTTAACCAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTGGTTAAAGTGTGATACCTTT GCCTACTGCCTCGGA, obtenida a partir de la base de datos disponible en la web RNAi Codex (http://codex.cshl.org). Se clonó por PCR en el vector pENTR con los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y XhoI.

A partir de la organización Addgene (www.addgene.org) se obtuvieron los plásmidos pEGFP-Hsp70 (No. 15215) y pRK5-Myc-Parkin (No. 17612), provistos por Lois Greene, Ph.D. NHLBI, NIH, Bethesda, MD USA [270] y Ted Dawson, M.D./Ph.D, Johns Hopkins University Institute for Cell Engineering, Baltimore, MD USA [271] respectivamente.

Como parte del trabajo de tesis doctoral de Iliana Ramírez Rangel, se describió a la proteína GRp58 como un nuevo compañero de unión de la cinasa mTOR, la cual se subclonó en el vector de expresión en células de mamífero pCEFL-3XFlag a partir del vector de expresión en levaduras pACT2-GRp58, empleando las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. De esta manera se obtuvo a GRp58 en un vector de expresión en células de mamífero marcado con el epítope 3XFlag. El shRNA de GRp58 se generó en base a la secuencia TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGACCCATATGGGAATTATTATAGTGAAGC-CACAGATGTATAATAATTCCCATATGGGTCCTTGCCTACTGCCTCGGA, obtenida a partir de la base de datos disponible en la web (http://katahdin.mssm.edu), la cual se clonó secuencialmente en los vectores pENTR, pEN_EmiRc3 y pDSL_hpIP; este último permite la selección con puromicina.

El resto de los plásmidos (pCEFL-HA-AKT, pCEFL-HA-myr-AKT, pCEFL-EGFP-AKT-K179M y pCEFL-EGFP) fueron donados por J. Silvio Gutkind Ph.D. OPCB, NIH, Bethesda MD USA [272].

## D. Cultivo celular y transfección.

### 1. Cultivo celular.

Las líneas celulares HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), HEK293T (HEK293 transformadas con el antígeno T grande) y HeLa (Células de adenocarcinoma cervicouterino) se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10% y la mezcla de antibióticos Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B (Gibco) en una incubadora (Nuaire, modelo UN-4750) que mantiene una temperatura de 37 ºC y una atmósfera humedecida con $CO_2$ al 5%. Las células HEK293T son sembradas en cajas pretratadas con 1 a 2 ml de Poli-D-Lisina por 10 minutos y lavadas con PBS 1X estéril.

### 2. Transfección celular.

Las células fueron transfectadas transitoriamente por 48 ó 72 horas con el reactivo Polyfect (Qiagen) o Lipofectamine Plus reagent (Invitrogene) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. El shRNA-GRp58 se transfectó con Lipofectamine Plus reagent y las células fueron seleccionadas con Puromicina 0.5 μg/ml (Clontech) durante 5 días. La transfección de células se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (Nuaire class II type A2, modelo UN-425-300) cuando estas se encuentran en buen estado general y tienen una confluencia entre 60 y 80 %.

*Transfección con Lipofectamine Plus reagent (Invitrogene).*

La transfección de las células por el método de Lipofectamine Plus reagent en una caja Petri de 10 cm consiste en preparar, en tubos de polipropileno, una mezcla "A" que contiene 750 μl de medio DMEM sin suero y sin antibióticos, 10 μl de reactivo Plus y 4 μg de DNA total que se quiera transfectar y una mezcla "B" que contiene 750 μl de medio DMEM sin suero y sin antibióticos y 12 μl de Lipofectamina. Ambas mezclas se incuban por separado a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se combinan y se incuban a

temperatura ambiente por otros 15 minutos. Durante este tiempo se retira el medio en que se encuentran las células, se lavan con PBS 1X estéril (≈ 1 ml) y se les agregan 5 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos. Una vez culminado el tiempo de incubación de la mezcla, se agrega a las células y se incuban durante toda la noche (≈ 8 horas) a 37 ºC y 5% de $CO_2$. Posteriormente, se retira el medio de transfección y se agregan 10 ml de DMEM suplemetado con SFB al 10% y antibióticos. Pasadas 48 a 72 horas después de la transfección las células se procesan. Las cantidades de los componentes de las mezclas cambian en dependencia del tamaño de las cajas de los cultivos celulares y consecuentemente de la cantidad de células cultivadas (Tabla 5).

**Tabla 5. Cantidad de los componentes de las mezclas A y B dependiendo del tamaño de la caja Petri en la transfección con Lipofectamine Plus reagent.**

| Caja Petri | 100 mm | 60 mm | 35 mm |
|---|---|---|---|
| Mezcla A | | | |
| DMEM -SFB y -antibióticos | 750 ml | 450 ml | 262.5 ml |
| Reactivo Plus | 10 ml | 6 ml | 3.5 ml |
| DNA | 4 mg | 2.5 mg | 1.5 mg |
| Mezcla B | | | |
| DMEM -SFB y -antibióticos | 750 ml | 450 ml | 262.5 ml |
| Lipofectamina | 12 ml | 7.5 ml | 4.5 ml |
| Volumen que se agrega a las células antes de añadir la mezcla de transfección | | | |
| DMEM -SFB y -antibióticos | 5 ml | 3 ml | 1.5 ml |
| Volumen que se agrega a las células para su recuperación | | | |
| DMEM SFB 10% y antibióticos | 10 ml | 6 ml | 2.5 ml |

*Transfección con Polyfect (Qiagen).*

La transfección de las células por el método de Polyfect para una caja Petri de 10 cm, consiste en preparar la mezcla de 300 μl de DMEM desprovisto de SFB y antibióticos, 25 μl de Polyfect y 4 μg de DNA total que se quiera transfectar en tubos de polipropileno, agitar gentilmente e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Mientras se preparan las células retirándoles el medio en el que se encuentran, lavándolas con PBS 1X estéril y añadiéndoles 7 ml de DMEM con

SFB al 10% y antibióticos. Después de transcurridos los 10 minutos de incubación de la mezcla, se le agrega 1 mL de DMEM con SFB al 10% y antibióticos, se mezcla gentilmente, se decantan en la caja con células a transfectar y se incuban a 37 ºC y 5% de $CO_2$. Las células se procesan 48 a 72 horas postransfección. Las cantidades de los componentes de la mezcla cambian en dependencia del tamaño de las cajas de los cultivos celulares y consecuentemente de la cantidad de células cultivadas (Tabla 6).

**Tabla 6. Cantidad de los componentes de la mezcla en dependencia del tamaño de la caja Petri en la transfección con Polyfect.**

| Caja Petri | 100 mm | 60 mm | 35 mm |
|---|---|---|---|
| Mezcla | | | |
| DMEM -SFB y -antibióticos | 300 ml | 150 ml | 100 ml |
| Polyfect | 25 ml | 15 ml | 10 ml |
| DNA | 4 mg | 2.5 mg | 1.5 mg |
| DMEM SFB 10% y antibióticos | 1 ml | 1 ml | 0.6 ml |
| Volumen que se agrega a las células antes de añadir la mezcla de transfección | | | |
| DMEM SFB 10% y antibióticos | 7 ml | 3 ml | 1.5 ml |

Los medios de cultivo empleados deben estar tibios al momento del contacto con las células. Como medida rutinaria para transfectar varias cajas con un mismo DNA, se realizó primeramente un “pool” con la cantidad total de DNA a transfectar y posteriormente se tomó del pool la cantidad necesaria para cada caja.

### 3. Pretratamientos y estímulos celulares

Una vez transfectadas las células que lo requirieron, dependiendo del objetivo del experimento, las células se incubaron con diferentes pretratamientos y se estimularon con diversos factores. Así, para favorecer la desestabilización de AKT en los experimentos de estabilidad de AKT, las células se incubaron con las condiciones que nosotros llamamos condiciones desestabilizantes de AKT (CDA) que consisten en exponer a las células durante 6, 12 o 24 horas a medio de ayuno (sin suero) suplementado con el inhibidor de la síntesis de proteínas

Cicloheximida (CHX, Sigma) a 5 μM, y el inhibidor de la chaperona Hsp90, 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, Sigma) a 1 μM. Para los experimentos de ubiquitinación de AKT, las células se pretrataron con medio de ayuno suplementado con el inhibidor del proteosoma, MG132 (Calbiochem) a una concentración de 20 μM durante 6 horas. Con el objeto de impedir la activación de AKT en respuesta a HGF, en experimentos de interacción endógena entre AKT y BAG5, las células se incubaron en medio de ayuno en presencia del inhibidor de la PI3K, Wortmanina (Calbiochem) a concentración de 300 nM durante dos horas. Para evitar la proliferación celular, cuando se evaluó el papel de BAG5 sobre la migración celular dependiente de AKT mediante experimentos de cierre de herida, se empleó el inhibidor de la proliferación celular Mitomicina C (Sigma) a una concentración de 12 μM. En los experimentos de interacción entre mTOR y GRp58, así como en el estudio de la participación de GRp58 en la activación de mTORC1, se empleó Rapamicina (SIGMA) a una concentración de 20 ng/ml durante 1 hora (para inhibir a mTORC1) o 24 horas (para inhibir a mTORC2). Con el objeto de enriquecer el pool de las células que tuvieran el shRNA contra GRp58, las células se incubaron con Puromicina (Clontech) a concentración de 0.5 μg/ml durante 5 días.

La activación de la vía PI3K-AKT-mTOR se obtuvo mediante la estimulación de las células con diferentes factores. Previo al estímulo las células se ayunaron de suero empleando DMEM sin suero y sin antibiótico durante 8 a 12 horas.

En los experimentos de estabilidad de AKT, en los que se evaluó el efecto de la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR sobre la degradación de AKT inducida por BAG5, las células se mantuvieron en medio DMEM con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%, que consiste en una mezcla de factores que promueven el crecimiento. En los experimentos de interacción entre AKT y BAG5, el efecto de la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR se observó, estimulando células con el Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, R&D Systems) a una concentración final de 10 ng/ml durante 15 minutos, para la interacción entre AKT y BAG5 recombinantes. Mientras que para los experimentos de interacción entre las

proteínas endógenas se empleó el HGF (R&D Systems) a concentración de 10 ng/ml durante 5, 15 ó 30 minutos, como se indica.

El efecto de BAG5 sobre la activación de AKT se estudió estimulando las células durante 15 minutos con 1, 10, 25 y 50 ng/ml de HGF (R&D Systems). En los experimentos de quimiotaxis en cámara de Boyden y cierre de herida, el efecto de BAG5 sobre la migración de celular dependiente de la vía PI3K-AKT-mTOR, se observó estimulando células con HGF (R&D Systems) 10 ng/ml y SFB (Gibco) al 10 % durante 6 horas para los experimentos de quimiotaxis y durante 24 horas para los experimentos de cierre de herida.

El efecto de la estimulación de la vía PI3K-AKT-mTOR en la interacción entre mTOR y GRp58, las células se estimularon con Insulina (Sigma) a 100 nM durante 15 minutos y con el agente oxidante PAO (Sigma) a 5 μM durante 15 minutos.

El papel de GRp58 sobre la activación de mTOR se evidenció estimulando a las células con Insulina (Sigma) a concentración de 50 nM durante 5 minutos o el agente oxidante PAO (Sigma) a durante 15 minutos. La concentración y el tiempo empleados para PAO, se determinaron realizando previamente curvas de tiempo y concentración, para las cuales las células se expusieron a PAO (Sigma) durante 5, 15, 30 y 60 minutos, y 2.5, 5 , 10 y 15 μM para tiempo y concentración respectivamente.

**4. Lisados celulares totales.**

Los lisados celulares totales se obtuvieron a partir de células que se encontraban en las condiciones requeridas, para lo cual las cajas Petri en que se encuentran las células colocadas sobre una cama de hielo, se les retiró el medio y se lavaron con PBS 1X (pH 7.4). Enseguida se les agregó el Buffer de lisis adecuado, seleccionado en base a la proteína a estudiar. Así, para valorar la interacción entre AKT y BAG5, así como la trascendencia funcional de la interacción, se utilizó el Buffer de lisis Tritón al 1% con un mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, Aprotinina y Leupeptina) y fosfatasas (Ortovanadato de sodio, Fluoruro de sodio y β-Glicerol fosfato); mientras que para evaluar la

interacción entre mTOR y GRp58 y los efectos de la misma sobre la función de mTOR, se empleó el Buffer de lisis CHAPS al 0.3% en presencia de la mezcla de inhibidores de proteasas y fofatasas.

En dependencia del tamaño de la caja Petri y consecuentemente de la cantidad de células a lisar, se agregaron 1 mL (para cajas de 100 mm), 400 μL (para cajas de 60 mm) o 200 μL (para cajas de 35 mm) de Buffer de lisis frío recién preparado y se dejó incubando durante 15 a 20 minutos. Cumplido el tiempo de incubación se raspan las cajas con ayuda de una pala de teflón y se transfiere el lisado celular a tubos eppendorf adecuadamente rotulados con una micropipeta que permite además homogenizar el lisado succionándolo y liberándolo en varias ocasiones. Posteriormente los tubos se centrifugan a 13200 rpm en una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5415 R) durante 10 minutos a 4ºC y se recupera el sobrenadante.

Los lisados celulares totales recién obtenidos se utilizan en la realización de experimentos de inmunoprecipitación, pull down (precipitación por afinidad) y para inmunoblot (Western Blot), para el cual previamente se determina la concentración de proteínas mediante el Kit DC protein assay (Bio-Rad, No. Cat. 500-0116).

**5. Soluciones empleadas.**

- *DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium):* Para preparar 4 litros de medio se disuelve todo el contenido del DMEM (Sigma, Cat. No. D-7777) en 3500 ml de agua estéril (PiSA, No. Cat. 4000253) y Bicarbonato de sodio (Sigma, No. Cat. S-5761) 3.7 g/L (HEK293T) o 1.8 g/L (HEK293 y HeLa). Posteriormente se ajusta el pH a 7.2 con HCL (JT Baker, No. Cat. 9535-05) concentrado, se afora a 4 litros y se esteriliza por filtración con vacío y una membrana de 0.22 μm (Corning, No. Cat. 430758) en la campana de flujo laminar. Se coloca Parafilm alrededor de la tapa, se rotulan la fecha y línea celular y se almacena a 4 ºC.
- *DMEM suplementado con SFB al 10% y antibióticos:* Para cada 450 ml de DMEM se agregan 5 mL de antibióticos Penicilina, sulfato de Estreptomicina

y Anfotericina B (Gibco, No. Cat. 15240-062) y 50 mL de Suero Fetal Bovino (Gibco, No. Cat. 10437-028) para una concentración final del 10%.

- *Poli-D-Lisina:* Diluir 5 mg de Poly-D-Lysine hydrobromide (Sigma, No. Cat. P7280) en 500 ml de agua estéril (PISA) y almacenar en botella de plástico a 4ºC. A partir de esta solución se toma 1 ml y se afora a 1 litro con PBS 1X para cultivo y se almacena a 4ºC en botella de plástico.
- *PBS (Phosphate Buffered Saline) para cultivo*: Para 1 litro de PBS 1X, disolver todo el contenido del vial Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (Sigma, No. Cat. 5773) en 900 ml de agua estéril (PiSA, No. Cat. 4000253). Posteriormente se afora a 1 litro y se esteriliza por filtración con vacío por medio de una membrana de 0.22 μm (Corning, No. Cat. 430758) en la campana de flujo laminar. Se almacena a 4ºC en recipiente de plástico o vidrio.
- *PBS (Phosphate Buffered Saline) para lavados 10X*: Para preparar 2 litros se disuelven 160 g de Cloruro de sodio (NaCl Sigma, No. Cat. S-7653), 4 g de Cloruro de potasio (KCL Prod. Quím. Monterrey SA de CV), 28 g de Fosfato de sodio, dibásico anhidro ($Na_2HPO_4$, JT Baker No. Cat. 3828) y 5.44 g de Fosfato de potasio monobásico ($KH_2PO_4$, JT Baker No. Cat. 3246) en 1800 ml de agua desionizada (milliQ). Ajustar el pH a 7.3 con ácido clorhídrico concentrado (HCl, JT Baker No. Cat. 9535-05) y aforar a 2 litros. Esterilizar la solución por filtración usando una membrana de 0.22 μm de poro dentro de la campana de flujo laminar y almacenar en botella de vidrio a temperatura ambiente.
- *PBS (Phosphate Buffered Saline) para lavados 1X*: Para 1 litro, tomar 100 ml de la solución PBS 10X y aforar a 1 litro con agua estéril (PISA, No. Cat. 4000253). Almacenar a temperatura ambiente en botella de vidrio o en el recipiente de plástico del agua estéril (PISA).
- *Buffer de lisis CHAPS 0.3%*: Para preparar 1 litro, en campana de flujo lamiar y empleando pipetas estériles, disolver en 800 ml de agua desionizada (milliQ) 20 ml de Tris-HCl 1M pH 7.5 para una concentración final de 20 mM, 30 ml de Cloruro de sodio 5M (NaCl, Sigma, No. Cat. S-7653) para

concentración final 0.15 M, 2 ml de EDTA 0.5 M (Research Organics Inc., No. Cat. 3002E) para una concentración final de 1 mM y 3 g de CHAPS (Sigma, No. Cat. C-3023) para una concentración final de 0.3%. Posteriormente aforar a 1 litro y almacenar a 4ºC en recipiente de plástico o vidrio.

- *Buffer de lisis Tritón X-100 1% (TNTE)*: Para preparar 1 litro, en campana de flujo lamiar y empleando pipetas estériles, disolver en 800 ml de agua desionizada (milliQ) 20 ml de Tris-HCl 1M pH 7.5 para una concentración final de 20 mM, 30 ml de Cloruro de sodio 5M (NaCl, Sigma, No. Cat. S-7653) para concentración final 0.15 M, 2 ml de EDTA 0.5 M (Research Organics Inc., No. Cat. 3002E) para una concentración final de 1 mM y al final 10 ml de Tritón X-100 (HyCel, No. Cat. 6517) para obtener una concentración final de 1%. El tritón debe agregarse con micropipeta con la punta trunca, mientras el resto de los componentes se están agitando con una barra magnética, evitando la formación de espuma. Posteriormente aforar a 1 litro y almacenar a 4ºC en recipiente de plástico o vidrio.
- *PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) 0.1 M*: Pesar 435 mg de PMSF (Sigma, No. Cat. P7626) y disolverlo en 25 ml de Isopropanol (SIGMA, No. Cat. I9516). Este reactivo es de elevada toxicidad, su manejo debe ser con guantes y cubreboca. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente. La concentración de trabajo es 1 mM, por lo que se agrega 10 μl de PMSF (0.1 M) por cada mililitro de buffer de lisis. Una vez que se agrega al buffer de lisis se vuelve inestable, por ello debe agregarse justo antes de agregar el buffer de lisis a las células.
- *Aprotinina 10 μg/μl*: Se disuelven 10 mg de Aprotinina de pulmón bovino (Sigma, No. Cat. A1153) en 1 ml de agua desionizada (milliQ). Se realizan alícuotas de 100 μl y se almacenan a -20ºC. La concentración de trabajo es 0.01 μg/μl por lo que se agrega 1 μl de Aprotinina (10 μg/μl) por cada mililitro de buffer de lisis.
- *Leupeptina (Acetyl-Leu-Leu-Arg-al) 10 μg/μl*: Se disuelven 10 mg de Leupeptina (Sigma, No. Cat. L2884) en 1 ml de agua desionizada (milliQ). Se

realizan alícuotas de 100 μl y se almacenan a -20ºC. La concentración de trabajo es 0.01 μg/μl por lo que se agrega 1 μl de Leupeptina (10 μg/μl) por cada mililitro de buffer de lisis.

- *Ortovanadato de sodio ($Na_3VO_4$) 1 M*: Disolver 2.755 g de $Na_3VO_4$ (Sigma, No. Cat. S6508) en 15 ml de agua desionizada (milliQ). Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20ºC. La concentración de trabajo es 1 mM, por lo que se agrega 1 μl de $Na_3VO_4$ (1 M) por cada mililitro de buffer de lisis. Para su empleo las alícuotas deben descongelarse hasta que tome una coloración clara, de ser necesario se puede incubar por unos minutos a 37ºC a baño maría.
- *Fluoruro de sodio (NaF) 1 M*: Disolver 625 mg de NaF (Sigma, No. Cat. S7920) en 15 ml de agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de vidrio. La concentración de trabajo es 1 mM, por lo que se agrega 1 μl de NaF (1 M) por cada mililitro de buffer de lisis.
- *β-Glicerol fosfato 1M*: Disolver 3.24 g de β-Glicerol fosfato (Sigma, No. Cat. G6251) en 15 ml de agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de vidrio. La concentración de trabajo es 10 mM, por lo que se agrega 10 μl de β-Glicerol fosfato (1 M) por cada mililitro de buffer de lisis.
- *Cicloheximida (CHX, 3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl] glutarimide) 10mM*. Para preparar 10 ml de una solución de CHX 10 mM, se disuelven 28.14 mg de CHX (Sigma, No. Cat. C7698) en 10 ml de agua desionizada (milliQ). Se hacen alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se almacenan a 4ºC. La concentración de trabajo es de 5 μM, para preparar 10 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con Cicloheximida 5 μM, se toman 5 μl de la solución de CHX 10 mM y se lleva a 10 ml con el medio DMEM sin suero y sin antibióticos.
- *17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) 1 mM*: Diluir 1 mg de 17-AAG (Geldanamicina de *Streptomyces hygroscopicus*, Sigma, No. Cat. G3381) en 1.78 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D2650), disolver adecuadamente y

almacenar a -20ºC protegido de la luz. La concentración de trabajo es de 1 μM, para preparar 10 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con 17-AAG 1 μM, se toman 10 μl de la solución de 17-AAG 1 mM y se lleva a 10 ml con el medio DMEM sin suero y sin antibióticos.

- *MG132 (Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal) 5 mM*: Para preparar la solución stock los 5 mg contenidos en el frasco de MG132 (Calbiochem, No. Cat. 474790), se disolvieron en 2.1 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D-2650) para obtener una concentración de 5 mM. Se realizaron alícuotas de 100 μl que se almacenaron a -20ºC en tubos eppendorf recubiertos de parafilm. La concentración de trabajo es de 20 μM, para preparar 1 ml de medio DMEM con MG132 a una concentración de 20 μM, se agregan 4 μl de MG132 (5 mM), descongelados a 4ºC, a 996 μl de medio DMEM.
- *Wortmanina 1 mM*: Se disuelve 1 mg de Wortmanina (Calbiochem, No. Cat. 681675) en 2.33 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D2650), se hacen alícuotas de 50 μl y se almacenan a -20ºC. La concentración de trabajo es 300 nM y se obtiene diluyendo primeramente 10 μl de la solución stock (1 mM), descongelada a 4ºC, en 90 μl de PBS 1X para cultivo para obtener una solución de Wortmanina 100 μM, a partir de la cual se toma la cantidad necesaria para obtener la concentración de trabajo. Para preparar 1 ml de medio DMEM con Wortmanina a una concentración de 300 nM, se agregan 3 μl de la solución de Wortmanina 100 μM a 997 μl de medio DMEM.
- *Mitomicina C 2 mM*: Se disuelven 5 mg de Mitomicina C *de Streptomyces caespitosus* (Sigma, No. Cat. M-0440) en 7.48 ml de agua estéril (PISA) y se almacena a -20ºC en frasco ámbar cubierto con parafilm. La concentración de trabajo es de 12 μM, así, para preparar 1 ml de medio DMEM con Mitomicina C a una concentración de 12 μM, se agregan 6 μl de Mitomicina C (2 mM), descongelados a 4ºC, a 996 μl de medio DMEM.
- *Rapamicina 200 μg/ml*: Se disuelve 1 mg de Rapamicina (Sigma, No. Cat. R0395) en 5 ml de PBS 1X estéril para obtener el stock de Rapamicina 200 μg/ml, el cuál se almacena a -20ºC en alícuotas de 1 ml. A partir del stock

(200 μg/ml), tomamos 10 μl y le agregamos 90 μl de DMSO (Sigma, No. Cat. D2650) y 900 μl de PBS 1X estéril para obtener 1 ml a concentración de 2 μg/ml, que también se almacena a -20ºC. La concentración de trabajo que empleamos fue de 20 ng/ml, por lo que tomamos 10 μl del stock de Rapamicina 2 μg/ml más 990 μl de medio (con o sin SFB y antibióticos) por cada mililitro requerido.

- *Puromicina 1mg/ml*: Se pesan 10 mg de Puromicina (Clontech, No. Cat. 631306) y se disuelven en 10 ml de agua estéril (PISA) para obtener una concentración de 1 mg/ml. Se realizan alícuotas de 1 ml y se almacenan a -20ºC. Para obtener la concentración de trabajo (0.5 μg/ml), se toma 1 μl por cada 2 ml de medio DMEM.
- *PAO (Phenylarsine oxide) 0.5 mM*: Se disuelven 8.4 mg de PAO (Sigma, No. Cat. P3075) en 5 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D2650) para obtener una concentración de 10 mM, se realizan alícuotas de 1 ml y se almacenan a -20ºC. Para preparar 1 ml de PAO a 0.5 mM, se toman 50 μl de la solución de PAO 10 mM y se lleva a 1 ml con agua estéril (PISA). A partir de la solución de PAO 0.5 mM se toman 5, 10, 20 y 30 μl y se lleva a 1 ml con medio DMEM para estimular las células con las concentraciones de trabajo 2.5, 5, 19 y 15 μM respectivamente.
- *Insulina 1 mM*: Disolver 1 vial de 250 mg de Insulina (Sigma, No. Cat. I5500) en 50 ml de agua estéril (PISA) y agregar 14 gotas de HCl 1 N. El pH debe ser de 3. Filtra con filtro de 0.22 μM (Millex GS, Millipore, No. Cat. SLGS033SB). Distribuir en alícuotas de 5 ml y almacenar a -20°C. Para preparar las concentraciones de trabajo 50 ó 100 nM, primeramente se toman 10 μl de la solución stock de Insulina (1mM) y se le adicionan a 990 μl de PBS 1X estéril para obtener una solución de insulina a una concentración de 10 μM. A partir de este stock (10 μM) se toman 10 μl + 1990 μl de medio sin suero y sin antibiótico ó 20 μl + 1980 μl de medio sin suero y sin antibiótico para obtener 2 ml una concentración de 50 ó 100 nM, respectivamente.

- *Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 1 μg/ml*: Se disuelven 5 μg de HGF recombinante humano (R&D Systems, No. Cat. 294-HGN-005) en 5 ml de PBS estéril para cultivo al 0.1 % con albúmina de suero bovino (ASB, Sigma, No. Cat. A9647). Se disuelven bien, se hacen alícuotas de 200 μl y se almacena a -20ºC. Las concentraciones de trabajo que empleamos son 1, 10, 25 y 50 ng/ml, para lo cual se requieren 1, 10, 25 y 50 μl de HGF 1 μg/ml por cada ml de medio DMEM sin suero y in antibiótico. Para los experimentos de quimiotaxis se empleó la concentración de 10 ng/ml en DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con ASB al 0.1%.
- *Suero fetal bovino (SFB) al 10%*: Se agregan 100 μl de suero fetal bovino (Gibco, No. Cat. 10437-028) por cada mililitro de medio DMEM. Para los experimentos de quimiotaxis se empleó 100 μl de SFB por cada mililitro de DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con ASB al 0.1%.

## E. Inmunoprecipitación, Pull-down e Inmunoblot.

### 1. Inmunoprecipitación.

A partir del lisado celular obtenido, se toman 150 μL para preparar el lisado celular total, para ello se le agregan 50 μL de Buffer de muestra 4X con β-mercaptoetanol y se hierven durante 5 minutos. El resto (≈1 mL) se incubó con el anticuerpo específico durante toda la noche (≈ 8 horas) en agitación continua a 4ºC en un carrusel giratorio (Glas-Col, Terre Haute, USA) dentro del cuarto frío. Se empleó 1 μL de los anticuerpos contra AKT, BAG5, HA y Myc en una dilución 1:1000 y 5 μL del anticuerpo contra mTOR para una dilución 1:200. El inmunoprecipitado se obtuvo por incubación con una mezcla de perlas de proteína A agarosa (Millipore, No. Cat. 16-125) y proteína G agarosa (Millipore, No. Cat. 16-266) durante 2 horas en agitación continua (carrusel giratorio) a 4ºC (cuarto frío). Posteriormente se realizan 5 lavados con buffer de lisis, para ello, se centrifugan las muestras a 6000 rpm durante 2 minutos a 4ºC en una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, Modelo 5415 R), se descarta el

sobrenadante por succión, se agrega 1 mL de Buffer de lisis y se resuspenden las perlas vigorosamente con ayuda del vortex para nuevamente centrifugar las muestras. En el último lavado se trata de descartar lo mas posible de sobrenadante (Buffer de lisis) tratando de conservar íntegras las perlas de proteína A/G agarosa. Subsiguientemente se agregan 100 μL de Buffer de muestra 1X con β-mercaptoetanol, se hierven durante 5 minutos y se centrifugan a 6000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. De esta manera las muestran quedan preparadas para realizar el inmunoblot. De no continuar con el inmunoblot enseguida de la obtención del inmunoprecipitado y el lisado total celular, las muestras se almacenan a -20ºC.

**2. Pull down (Precipitación por afinidad).**

A partir del lisado celulares obtenidos de los cultivos que expresan a BAG5 completa y/o las diferentes construcciones de BAG5 fusionadas a GST, se separan 150 μL para preparar el lisado celular total, a los que se le agregan 50 μL de Buffer de muestra 4X con β-mercaptoetanol y se hierven durante 5 minutos. El resto (≈1 mL) se empleó para aislar a BAG5 o sus construcciones fusionadas a GST mediante su incubación con 30 μL de perlas de glutatión sefarosa (Amersham Bioscience, No. Cat. 71-0243-00-08) durante 2 horas en agitación continua (carrusel giratorio) a 4ºC (cuarto frío). Posteriormente se realizan 5 lavados con buffer de lisis, centrifugando las muestras a 6000 rpm durante 2 minutos a 4ºC en una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, Modelo 5415 R), se descarta el sobrenadante por succión, se agrega 1 mL de Buffer de lisis y se resuspenden las perlas vigorosamente con ayuda del vortex para nuevamente centrifugar las muestras. En el último lavado se trata de descartar lo mas posible de sobrenadante (Buffer de lisis) tratando de conservar íntegras las perlas de glutatión sefarosa. Después se agregan 100 μL de Buffer de muestra 1X con β-mercaptoetanol, se hierven durante 5 minutos y se centrifugan a 6000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente, quedando preparadas para la realización del inmunoblot. De no continuar con el

inmunoblot enseguida de la obtención del inmunoprecipitado y el lisado total celular, las muestras se almacenan a -20ºC.

### 3. Inmunoblot (Western Blot).

Las muestras recién obtenidas a partir de los experimentos de inmunoprecipitación, precipitación por afinidad (pull-down) y los lisados totales, se sometieron a corrimiento electroforético para separar las proteínas en base a su peso (si las muestras se encontraban congeladas, previamente se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 6000 rpm por 2 minutos). Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida y se cargaron 5 ó 10 μL de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, No. Cat. 161-0374), dependiendo de las dimensiones del gel y entre 10 y 20 μg de proteína total o el volumen deseado de precipitado (generalmente 50 μL). Los geles de poliacrilamida se constituyen de un gel concentrador (5%) y un gel separador, cuya concentración de la mezcla de acrilamidas varía en función del peso de la proteína a separar del 6 al 12% (Tabla 7).

**Tabla 7. Soluciones requeridas para preparar geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las cantidades y concentraciones referidas son para preparar un gel pequeño (7.5 x 8.5 cm) o grande (12.5 x 13.5 cm).**

| Soluciones | Gel concentrador | | Gel separador | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5% | | 6% | | 10% | | 12% | |
| | 3 ml | 6 ml | 10 ml | 20 ml | 10 ml | 20 ml | 10 ml | 20 ml |
| $H_2O$ MilliQ | 2.1 | 4.1 | 5.3 | 10.6 | 4 | 7.9 | 3.3 | 6.6 |
| Acrilamida-Bis-acrilamida 30% | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 3.3 | 6.7 | 4 | 8 |
| Tris-HCl 1 M, pH 6.8 | 0.38 | 0.75 | - | - | - | - | - | - |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | - | - | 2.5 | 5 | 2.5 | 5 | 2.5 | 5 |
| SDS 10% | 0.03 | 0.06 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| Agitar suavemente | | | | | | | | |
| Persulfato de amonio 10% | 0.03 | 0.06 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 |
| TEMED | 0.003 | 0.006 | 0.008 | 0.016 | 0.004 | 0.008 | 0.004 | 0.008 |

SDS, dodecil sulfato de sodio; TEMED, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida; SDS-PAGE, Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio

Los geles se corrieron a 120 Volts por alrededor de 3 horas en buffer de corrida 1X y en cámaras de electroforesis para geles pequeños de 7.5 x 8.5 cm (Hoefer, SE 250) y geles grandes de 12.5 x 13.5 cm (Sigma, No. Cat. Z375039). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (Polyvinylidene fluoride, Immobilon-P Membrane, Millipore, No. Cat. IPVH 00010) en un sistema de transferencia húmedo (Sigma, modelo: B5036) (Figura 16).

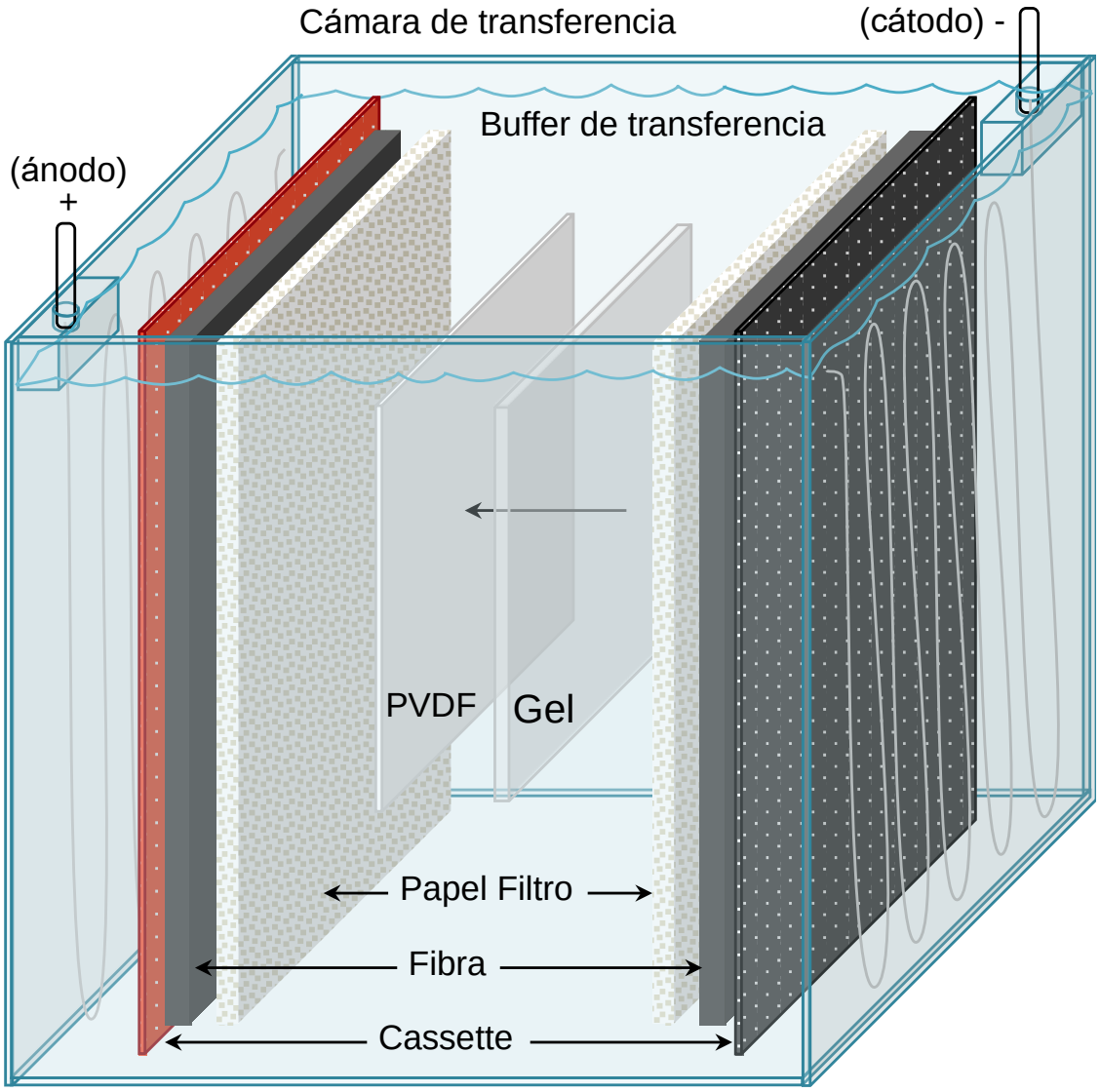



**Figura 16. Sistema de transferencia húmedo.** Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) empleando un sistema de transferencia húmedo (Sigma) a 320 mAmp durante 2.5 horas. La membrana, el gel y el resto de los componentes se colocaron dentro de un cassette de transferencia dentro de la cámara sumergidos en buffer de transferencia dispuestos de la manera indicada.

Para evitar el contacto entre las manos y la membrana, en los pasos subsiguientes se emplearon guantes o pinzas. La membrana de PVDF se humedeció con metanol absoluto (JT Baker) por 1 minuto, después se equilibró en buffer de transferencia junto al gel en que se separaron las proteínas por 10 a 15 minutos. Posteriormente, se armó el cassette de transferencia a manera de sándwich, procurando eliminar las burbujas entre sus componentes rodando una pipeta limpia sobre la superficie de sus componentes. El cassette con el sándwich de transferencia se sumergió en buffer de transferencia dentro de la cámara y se transfirió a 320 mAmp durante 2.5 horas (Figura 16).

Una vez concluida la transferencia, las membranas se enjuagaron con buffer de lavado (TBS-Tween 0.05%) y se bloquearon con buffer de bloqueo [TBS-Tween 0.05%-Leche libre de grasa 5% o TBS-Tween 0.05%-Albúmina de suero bovino (ASB) 2.5-5%] en agitación continua, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó la solución de bloqueo y se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05% (TBS-T) durante 5 a 10 minutos cada vez. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBS-T en las condiciones apropiadas para la proteína a detectar como se indica en la Tabla 8. Finalizada la incubación se recupera el anticuerpo primario, el cual se puede volver a emplear alrededor de 3 veces más y se almacena a -20ºC. Después las membranas se lavaron en 3 ocasiones con TBS-T de 5 a 10 minutos cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano adecuado, diluido en buffer de bloqueo (TBS-Tween 0.05% más leche libre de grasa 5% o ASB al 2.5%), según se indica en la Tabla 8. Enseguida se descartó el anticuerpo secundario, se enjuagó con agua bidestilada, se realizaron 3 lavados con TBS-T de 5 a 10 minutos cada uno y un lavado más con TBS de 5 minutos. Luego las membranas se incubaron con el sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa de rábano (*Immobilon Western Chemiluminescent Substrate*, Millipore, No. Cat. WBKL S0500) siguiendo las recomendaciones del fabricante, durante 1 a 1.5 minutos a temperatura ambiente.

**Tabla 8. Condiciones del inmunoblot para las diferentes proteínas detectadas.**

| Proteína | PM (kDa) | Gel (%) | Bloqueo | *Ab 1º | Ab 2º |
|---|---|---|---|---|---|
| BAG5 | ≈ 50 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| GRp58 | ≈ 61 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| AKT | ≈ 60 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| pAKT (T450) | ≈ 60 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| pAKT (S473) | ≈ 60 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| GSK-3b | 46 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| pGSK-3b | 46 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| mTOR | 289 | 6 | TBST-ASB (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-ASB(2.5%), 1h, TA |
| p-mTOR | 289 | 6 | TBST-ASB (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-ASB(2.5%), 1h, TA |
| Raptor | 150 | 6 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| Rictor | 200 | 6 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| S6K | 70/85 | 10 | TBST-ASB (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-ASB(2.5%), 1h, TA |
| pS6K | 70/85 | 10 | TBST-ASB (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-ASB(2.5%), 1h, TA |
| S6 | 32 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| pS6 | 32 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:5000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:5000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| 4E-BP1 | 15-20 | 12 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:20 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| p4E-BP1 | 15-20 | 12 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| ERK | 42/44 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, C | a-C, 1:20 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| pERK | 42/44 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| Rac1 | 21 | 10 | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| HA | ≈ 1 | - | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:20 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| Myc | ≈ 1 | - | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:20 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| GST | ≈ 26 | - | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| EGFP | ≈ 27 | - | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:20 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |
| 3xFlag | ≈ 2.7 | - | TBST-Leche (5%), 1h, TA | 1:10 000, TBST, TN, 4ºC, R | a-R, 1:10 000, TBST-Leche(5%), 1h, TA |

PM, peso molecular; ABS, albúmina de suero bovino; TBST, buffer TBS-Tween (0.05%); C, fuente: conejo; R, fuente: ratón; TN, toda la noche (8-12 horas); TA, temperatura ambiente (≈24°C). *Ab 1º se puede incubar 2 horas a temperatura ambiente.

El sustrato quimiolumiscente se preparó combinando volúmenes iguales del reactivo luminol y la solución de peróxido (1:1). La mayoría de las ocasiones empleamos 500 μL de cada solución, volumen final de 1 mL para una membrana grande (8 x 12 cm). Consecutivamente, se retiró el exceso de sustrato de la membrana con un papel absorbente, se cubrió con una envoltura de plástico limpio y transparente y se fijó a un cassette (Amersham Biosciences, No. Cat. 11649) ensamblado con una pantalla intensificadora de imagen (Hyperscreen™, Amersham Biosciences) procurando no dejar burbujas de aire y arrugas. Dentro del cuarto oscuro se expuso la película (Ortho CP-GU medical X-ray film, AGFA, y Kodak medical film, No. Cat. 6040331) entre 5 segundos y 5 minutos en la mayoría de las ocasiones (Figura 17).

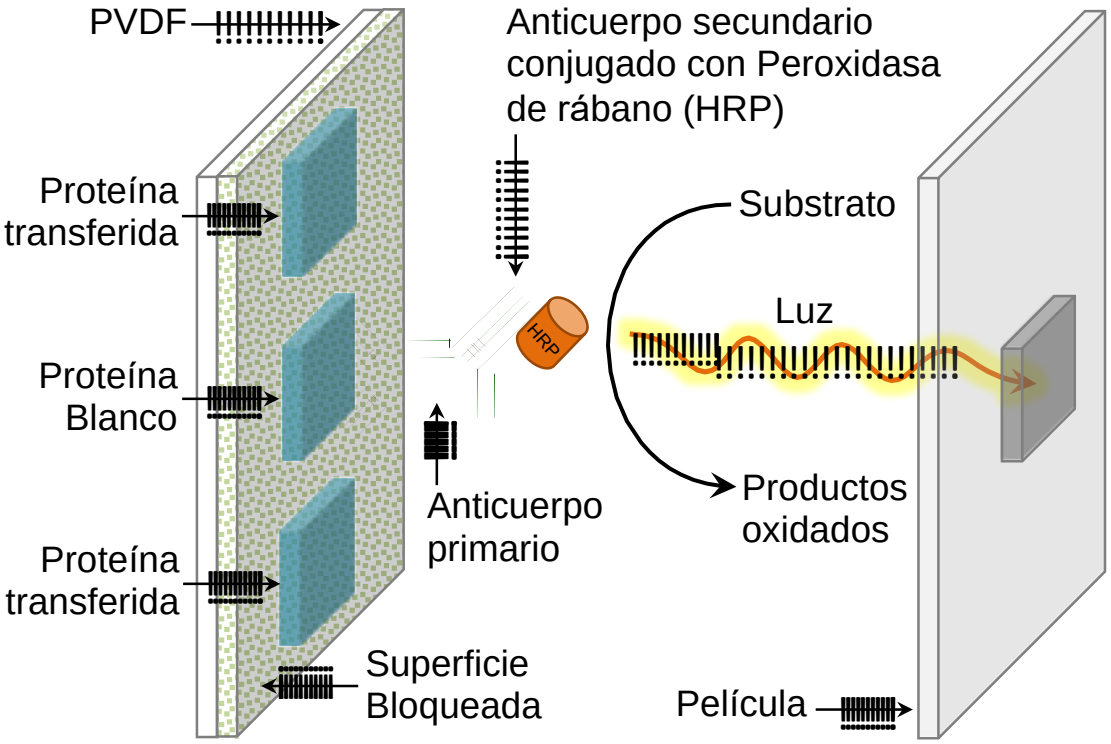


**Figura 17. Principio de detección por inmunoblot.** El anticuerpo primario se une específicamente a la proteína blanco la cual está unida a la membrana de PVDF, que une proteínas con alta afinidad. Para evitar que el anticuerpo primario se una a la membrana de PVDF, se incubó con un agente bloqueante (leche libre de grasa). El anticuerpo primario es reconocido por un anticuerpo secundario que está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxide), la cual cataliza una reacción que resulta en la generación de luz visible. Cuando se aplica el sustrato de la HRP luminol y peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) la enzima se activa generando luminol oxidado y la emisión de luz, la cual puede ser detectada usando una película sensible a la luz.

A continuación la película se reveló en la solución reveladora (Agfa o Kodak) de 30 segundos a 1 minuto, se detuvo la reacción en un baño de paro con agua del grifo, se fijó con la solución fijadora (Agfa o Kodak), se enjuagó con agua del grifo y se dejó secar. Las películas secas se digitalizaron en un escáner (Epson Perfection V330 Photo) y la intensidad de las bandas se determinó mediante un análisis densitométrico empleando el software de análisis y procesamiento de imagen de dominio público ImageJ 1.47u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. http://imagej.nih.gov/ij).

**4. Denudación de la membrana de PVDF (stripping).**

La membrana de PVDF se puede incubar en varias ocasiones con diferentes anticuerpos primarios, una vez que se denude la membrana del anticuerpo primario anterior. El proceso de denudación (stripping) consiste en romper la interacción antígeno-anticuerpo por exposición a detergentes, calor o a pH bajos. Es particularmente útil cuando la cantidad de muestra es insuficiente. En nuestro método incubamos a la membrana húmeda en Glicina (Sigma) 25 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Subsecuentemente, desechamos la Glicina y agregamos SDS (Sigma) 1% e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación continua. Posteriormente, desechamos el SDS y realizamos dos lavados con TBS-Tween 0.05% de 10 minutos cada uno. A partir de este momento se realiza el inmunoblot en la manera descrita anteriormente, comenzando del bloqueo de la membrana.

**5. Soluciones empleadas.**

- *Buffer de muestra 4X*: Para preparar 24 ml, disolver 8 ml de Dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma, No. Cat. L-3771) al 10%, 4 ml de glicerol (JT Baker 2136-62), 2.4 ml de Tris-HCl (Sigma, No. Cat. T-1503) 1M, pH 6.8, 5.6 ml de agua desionizada (milliQ), 4 ml de β-mercaptoetanol (Biorad, No. Cat. 161-0710) y trazas de azul de bromofenol, sal sódica (Sigma. No. Cat. B5525) lo suficiente para que adquiera el color azul. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico o vidrio. El SDS se pesa con cubreboca para evitar su inhalación. Si se desea preparar el buffer de muestra en condiciones no reductoras, no se agrega el β-mercaptoetanol.
- *Buffer de muestra 1X*: Para preparar 1 ml, se agregan 250 μl de buffer de muestra 4X a 750 μl de agua desionizada (milliQ) o del buffer de lisis con el que se lisaron las células. De preferencia emplear en el momento o almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración.
- *Acrilamida-Bis-acrilamida 30-0.8%*: El manejo de estos reactivos debe hacerse con cuidado, empleando guantes y cubreboca, dentro de una campana de extracción, pues la Acrilamida es un reactivo neurotóxico. Para preparar 1 litro, se disuelven 300 g de Acrilamida (Sigma, No. Cat. A-8887), 8 g de Bisacrilamida (Sigma, No. Cat. M-7279) en 600 ml de agua desionizada (milliQ) en un frasco de vidrio o plástico, de boca ancha y tapa de rosca. Disolver tapado a 4ºC en agitación continua durante varias horas hasta la correcta incorporación. Aforar a 1 litro con agua desionizada (milliQ), filtrar con una membrana de 0.22 μm y almacenar a temperatura ambiente en un frasco de vidrio ámbar.
- *Tris-HCl 1M, pH 6.8 (gel concentrador)*: Para preparar 100 ml, disolver 12.1 g de Tris base (Sigma, No. Cat. T-1503) en 80 ml de agua desionizada (milliQ). Ajustar pH a 6.8 con ácido clorhídrico concentrado (HCl JT Baker, No. Cat. 9535-05) y aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico o vidrio.
- *Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 (gel separador)*: Para preparar 1 litro, disolver 181.5 g de Tris base (Sigma, No. Cat. T-1503) en 800 ml de agua desionizada

(milliQ). Ajustar el pH a 8.8 con ácido clorhídrico concentrado (HCl JT Baker, No. Cat. 9535-05) y aforar a 1 litro. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico o vidrio.

- *Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%*: Para prepara 100 ml, se disuelven 10 g de Dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma, No. Cat. L-3771) y se afora a 100 ml de agua desionizada (milliQ). Se agita perfectamente hasta que quede una solución incolora y se almacena en frasco de vidrio a temperatura ambiente.
- *Persulfato de amonio 10%*: Para preparar 25 ml, se pesan 2.5 g y se afora a 25 ml de agua desionizada (milliQ). Se agita y se almacena en frasco de vidrio a 4ºC.
- *N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida (TEMED)*: Bio-Rad, No. Cat. 161-0801.
- *Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)*: Ensamblar sobre una superficie plana el dispositivo que sirve de molde para realizar los geles, el cual consiste en dos vidrios perfectamente limpios y libres de grasa, separados por reglas espaciadoras de PVC (Policloruro de vinilo) que determinan el grosor del gel (1.5 mm) y una tira de goma en el borde que evita la pérdida de la solución. Realizar una marca de 1 a 1.5 cm del borde del peine que moldea las hendiduras donde se colocará la muestra. Una vez realizada la mezcla del gel separador, según la tabla 7, se vierte inmediatamente entre los vidrios hasta la marca realizada y se adiciona la cantidad necesaria de isopropanol para cubrir la superficie de la mezcla (1-2 mm). Esperar la polimerización del gel (15-20 minutos), usando como testigo el sobrante de la mezcla preparada. Una vez polimerizado, se decanta el isopropanol, se enjuaga con agua desionizada (milliQ) y se seca con papel filtro. Se agrega la mezcla del gel concentrador, se coloca el peine tratando de no atrapar burbujas y se deja polimerizar durante 15 a 20 minutos. Se retira el borde de goma y el peine deslizándolo suavemente y se enjuaga con agua desionizada (milliQ) para eliminar los residuos no polimerizados. Posteriormente, se monta en la cámara, se agrega buffer de corrida y se cargan las muestras, previamente preparadas, y el marcador de peso

molecular. Si existieran carriles vacíos, se rellenan con buffer de muestra 1X en el mismo volumen que las muestras. La carga se realiza con una jeringa Hamilton de 50 μl, lavándola con agua desionizada (milliQ) entre las distintas muestras para evitar la contaminación entre las muestras.

- *Buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS) 10X pH 8.3*: Para preparar 2 litros, disolver 60.5 g de Trizma base (Sigma, No. Cat. T-1503), 288.26 g de Glicina (Biorad, No. Cat. 161-0724) y 20 g de Dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma, No. Cat. L-3771) en 1800 ml de agua desionizada (milliQ) tratando de no generar espuma. Aforar a 2 litros sin ajustar el pH. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico.
- *Buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS) 1X pH 8.3*: Para preparar 2 litros, tomar 200 ml del buffer de corrida 10X y aforar a 2 litros con agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura en recipiente de plástico.
- *Buffer de transferencia (Tris-Glicina) 10X pH 8.3*: Para preparar 2 litros, disolver 60.56 g de Trizma base (Sigma, No. Cat. T-1503), 288.26 g de Glicina (Biorad, No. Cat. 161-0724) en 1800 ml de agua desionizada (milliQ). Aforar a 2 litros sin ajustar pH y almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico.
- *Buffer de transferencia (Tris-Glicina) 1X pH 8.3*: Para preparar 4 litros, agregar 400 ml de buffer de transferencia 10X a 2800 ml de agua desionizada (milliQ) y mezclarlo perfectamente. Finalmente agregar 800 ml de Metanol (JT Baker, No. Cat. 9070-0720), disolver y almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico bien cerrado.
- *Buffer de TBS (Tris-Buffered Saline) 10X*: Para preparar 2 litros, se disuelven 24.2 g de Trizma base (Sigma, No. Cat. T-1503), 175.3 g de Cloruro de sodio (NaCl Sigma, No. Cat. S-7653) en 1800 ml de agua desionizada (milliQ). Ajustar el pH a 7.5 con ácido clorhídrico concentrado (HCl, JT Baker No. Cat. 9535-05) y aforar a 2 litros. Se almacena en recipiente de plástico a temperatura ambiente.

- *Buffer de TBS (Tris-Buffered Saline) 1X*: Para 2 litros, tomar 200 ml de la solución TBS 10X y aforar a 2 litro con agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura ambiente. en botella de vidrio.
- *Buffer de lavado TBS-Tween 0.05%*: Para preparar 2 litros, se toman 2 litros de TBS 1X y se le adiciona 1 ml de Tween 20 (Biorad, No. Cat. 170-6531). El Tween 20 es un detergente muy viscoso, para agregarlo se emplea una micropipeta de 1 ml con el extremo de la punta cortada, se agrega lentamente y se lava la punta en la solución tomando y soltando en varias ocasiones la solución con la micropipeta. Posteriormente se agita empleando una barra magnética y se almacena a temperatura ambiente.
- *Buffer de bloqueo (TBS-Tween 0.05%-Leche 5%)*: Preparar en cada ocasión la cantidad necesaria para cubrir la membrana, según el tamaño del recipiente en que se incuben. Para preparar 100 ml de la solución de bloqueo, disolver 5 g de leche libre de grasa (Svelty) en 100 ml de TBS-tween 0.05% y agitarla durante 30 minutos mínimamente. Posteriormente centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos y utilizar el sobrenadante.
- *Buffer de bloqueo (TBS-Tween 0.05%-ASB 2.5-5%)*: Preparar la cantidad necesaria para cubrir la membrana, según el tamaño del recipiente en que se incuben. Para preparar 100 ml de la solución de bloqueo, disolver 2.5 ó 5 g, para 2.5 ó 5% respectivamente, de albúmina de suero bovino (Sigma, No. Cat. A-9647) en 100 ml de TBS-tween 0.05% y agitarla hasta la correcta incorporación. De preferencia usarla en el momento aunque se puede almacenar a 4ºC.
- *Solución reveladora*:

  Kodak: Para preparar 500 ml, se toman 100 ml de la solución reveladora (KODAK GBX Developer and Replenisher, No. Cat. 1900943) y agregarlos suavemente a 400 ml de agua desionizada (milliQ) que está en agitación con barra magnética. Permitir una adecuada mezcla por otros 5 minutos y almacenar a temperatura ambiente en botella de plástico.

  Agfa: Para preparar 500 ml, tomar 125 ml de la solución A (AGFA, No. Cat. NJ36-1), 12.5 ml de la solución B (AGFA, No. Cat. NJ33), 12.5 ml de la

solución C (AGFA, No. Cat. NJ34-1) y aforar a 500 ml con agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura ambiente en botella de plástico protegida de la luz.

- *Solución fijadora*:

  Kodak: Para preparar 500 ml, tomar 99.6 ml (≈100) de la solución fijadora (KODAK GBX Fixer and Replenisher, No. Cat. 1901875) y aforar a 500 ml con agua desionizada (milliQ). Realizar algunas versiones suavemente y almacenar a temperatura ambiente en botella de plástico.

  Agfa: Para preparar 500 ml, tomar 125 ml de la solución A (AGFA, No. Cat. NJ23), 25 ml de la solución B (AGFA, No. Cat. NJ38-1) y aforar a 500 ml con agua desionizada (milliQ). Almacenar a temperatura ambiente en botella de plástico.

## F. Microscopía de fluorescencia.

### 1. Transfección y preparación de las células.

La distribución subcelular de AKT y BAG5 se evaluó mediante inmunofluorescencia. Primeramente se colocaron cubreobjetos dentro de cajas de 35 mm, se lavaron en tres ocasiones con etanol absoluto durante 3 a 5 minutos cada uno y después se realizaron tres lavados con PBS 1X estéril. Posteriormente se cubrió la superficie del cubreobjetos con fibronectina (Calbiochem) 20 μg/mL en PBS 1X estéril y se incubó a temperatura ambiente por una hora. Se recuperó la fibronectina y se sembraron 50 μL de la suspensión celular 1:10 (1 mL de Tripsina + 9 mL de DMEM con SFB (suero fetal bovino) al 10%) obtenida a partir de una caja de 10 cm confluente en 2 mL de DMEM con SFB al 10%. Al siguiente día las células HeLa que crecieron un cubreobjetos recubierto de fibronectina se transfectaron con AKT marcada con el epítope HA, BAG5 marcado con el epítope Myc o ambos. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se les retiró el medio a las cajas y se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X, posteriormente se fijaron con paraformaldehido

(Electron microscope science) al 4% en PBS, pH 7.4 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Concluida la fijación las células se lavaron cinco veces con PBS 1X de 5 minutos cada uno y se permeabilizó con metanol (Sigma) al 100% durante 6 minutos a -20ºC. Inmediatamente después se retira el metanol y se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X.

**2. Inmunofluorescencia.**

Después, las células se bloquearon con ASB (albúmina de suero bovino) al 1% en PBS 1X durante 30 minutos a 37ºC. La localización de AKT y BAG5 se detectó con los anticuerpos contra HA y Myc respectivamente, los cuales se incubaron durante 1 hora a 37ºC en ASB al 0.5% en PBS 1X a una dilución 1:500. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario de ratón acoplado a rodamina (HA) y a Cy5 (Myc) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a una dilución 1:500 en ASB al 1% en PBS 1X durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las incubación con el anticuerpo secundario se realizó en una caja protegida de la luz con ayuda de papel aluminio y en lo que sigue todo se realizó en un ambiente oscuro. Las células que se transfectaron con HA-AKT y Myc-BAG5, se incubaron secuencialmente con anti-HA por 45 minutos a temperatura ambiente, luego se incubó con la solución de bloqueo (ASB al 1%) y finalmente se incubó con el anti-Myc por 45 minutos a temperatura ambiente. Entre las incubaciones se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos secundarios, se hacen 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X y 4 lavados rápidos con agua bidestilada.

**3. Montaje y análisis de colocalización.**

Posteriormente se realiza el montaje de la preparación para lo cual, se limpió perfectamente un portaobjetos con etanol, dejándolo libre de grasa y pelusas, con ayuda de unas pinzas se tomó el cubreobjetos sin tocar la superficie que tiene las células y se sumergió en tres ocasiones en agua desionizada (milliQ).

Después se retiró el exceso de agua colocando el canto del cubreobjetos sobre papel absorbente, procurando no perder la orientación. Enseguida se agregaron 7 μL de la solución de montaje (antifade, Molecular Probes) sobre el portaobjetos y se colocó suavemente el cubreobjetos con la cara de las células procesadas sobre la solución de montaje, de tal manera que las células quedaran entre ambos vidrios y procurando no dejar burbujas. Posteriormente, los bordes del cubreobjetos se sellaron con esmalte para uñas y se dejó secar la laminilla por 24 horas antes de observar al microscopio, en refrigeración (4ºC) dentro de cajas a prueba de luz o envueltas en papel aluminio.

Las células se observaron usando un microscopio confocal (DMIRE2 confocal laser-scanning microscope de Leica Microsystems, Deerfield, IL), con un objetivo de inmersión en aceite de 63X con una apertura numérica de 1.4 y un zoom de 4. El análisis de colocalización se realizó con el software del microscopio (The Leica confocal software, LCS lite).

**4. Soluciones empleadas:**

- *Solución de Fibronectina 20 μg/ml*: Disolver 1 mg de Fibronectina (Calbiochem, No. Cat. 341635) en 50 ml PBS 1X estéril para cultivo. Se almacena a -20ºC. Se puede reutilizar en varias ocasiones.
- *Solución de Paraformaldehido al 4%*: Se agregan 1.25 ml de Paraformaldehido 32 % (Electron microscopy science, No. Cat. 15714) a una probeta y se afora a 10 ml de PBS 1X para lavados. Se agita adecuadamente para uso en el momento.
- *Solución de bloqueo (Albúmina de suero bovino al 1%)*: Para preparar 100 ml, se disuelve 1 g de albúmina de suero bovino (ASB, SIGMA, No. Cat. A-9647) en 100 ml de PBS 1X estéril para lavados y se emplea en el momento.
- *Solución de montaje (Antifade):* Colocar el medio de montaje ProLong (componente B) a baño maría a 37ºC hasta adquiera una consistencia más líquida. Tomar 1 mL del medio de montaje (componente B) y agregarlo al vial del reactivo Prolong antifade (componente A, vial color café), mezclarlo gentilmente sin generar burbujas y mantener a 37ºC en baño maría mientras

se montan las laminillas. Una vez culminado el proceso de montaje, la mezcla se almacena a -20ºC protegida de la luz.

## G. Estabilidad de AKT y ensayo de ubiquitinación *in vivo*.

### 1. Estabilidad de AKT.

Para explorar el efecto e BAG5, Hsp70 y Parkina sobre la estabilidad de AKT se co-transfectaron células con HA-AKT y cantidades creciente de alguno de los plásmidos que codifican para estas proteínas, como se indican en las figuras. La influencia de la activación de AKT sobre su degradación inducida por la sobreexpresión de BAG5, se evaluó transfectando concentraciones crecientes de BAG5 en células ayunadas de suero o estimuladas con suero fetal bovino (SFB) al 10%. En algunos experimentos se comprobó la participación de BAG5 sobre la degradación de AKT, transfectando un shRNA específico contra BAG5 en el vector pENTR, mientras que en los controles se transfectó al vector pENTR con una secuencia no relacionada.

Para hacer más evidente el efecto de BAG5 sobre la estabilidad de AKT, transfectamos células HeLa con Myc-BAG5 o el shRNA-BAG5 y al mismo tiempo, favorecimos la desestabilización de AKT con lo que nosotros definimos como las condiciones desestabilizantes de AKT (CDA), las cuales consisten en la incubación de las células por 6, 12 ó 24 horas en medio sin suero suplementado con Cicloheximida (CHX, Sigma) 5 μM, un inhibidor de la síntesis de proteínas, y el inhibidor de la chaperona Hsp90, 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, Sigma) 1 μM.

### 2. Ensayo de ubiquitinación de AKT.

Para realizar el ensayo de ubiquitinación *in vivo*, se transfectaron células HeLa con HA-Ubiquitina, Myc-BAG5, Myc- Parkina, EGFP-Hsp70 por separado o con la combinación de HA-Ubiquitina más alguno de los demás, Myc-BAG5, Myc-Parkina o EGFP-Hsp70. Treinta y seis horas después de la transfección, las

células se ayunaron de suero durante 12 horas, y en las últimas 4 horas se incubaron con el inhibidor de la actividad del proteosoma MG132 (Calbiochem) 20 μM. Inmediatamente después las células fueron lisadas con 1 ml de buffer TNTE suplementado con inhibidores de proteasas y la AKT endógena se inmunoprecipitó con un anticuerpo específico descrito en el apartado de inmunoprecipitación. Las muestras obtenidas se hirvieron durante 5 minutos para eluir las proteínas a partir de las perlas en buffer de muestra 1X. Los inmunoprecipitados y los lisados totales se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6% y se transfirieron a membranas de PVDF para visualizarlos por inmunoblot. La ubiquitinación de AKT se evaluó con el anticuerpo contra HA, el epítope que marca a la ubiquitina, la cual se unió covalentemente con la AKT inmunoprecipitada.

**3. Soluciones y reactivos empleados:**

- *Cicloheximida (CHX, 3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl] glutarimide) 10mM*. Para preparar 10 ml de una solución de CHX 10 mM, se disuelven 28.14 mg de CHX (Sigma, No. Cat. C7698) en 10 ml de agua desionizada (milliQ). Se hacen alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se almacenan a 4ºC. La concentración de trabajo es de 5 μM, para preparar 10 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con Cicloheximida 5 μM, se toman 5 μl de la solución de CHX 10 mM y se lleva a 10 ml con el medio DMEM sin suero y sin antibióticos.
- *17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) 1 mM*: Diluir 1 mg de 17-AAG (Geldanamicina de *Streptomyces hygroscopicus*, Sigma, No. Cat. G3381) en 1.78 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D2650), disolver adecuadamente y almacenar a -20ºC protegido de la luz. La concentración de trabajo es de 1 μM, para preparar 10 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos suplementado con 17-AAG 1 μM, se toman 10 μl de la solución de 17-AAG 1 mM y se lleva a 10 ml con el medio DMEM sin suero y sin antibióticos.
- *MG132 (Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal) 5 mM*: Para preparar la solución stock los 5 mg contenidos en el frasco de MG132 (Calbiochem, No.

Cat. 474790), se disolvieron en 2.1 ml de DMSO (Sigma, No. Cat. D-2650) para obtener una concentración de 5 mM. Se realizaron alícuotas de 100 μl que se almacenaron a -20ºC en tubos eppendorf recubiertos de parafilm. La concentración de trabajo es de 20 μM, para preparar 1 ml de medio DMEM con MG132 a una concentración de 20 μM, se agregan 4 μl de MG132 (5 mM), descongelados a 4ºC, a 996 μl de medio DMEM.

- *Buffer de lisis TNTE (Tris-NaCl-Tritón-EDTA) 0.5%*: Tris-HCl pH 7.6 concentración final de 50 mM, NaCl concentración final 150 mM, Tritón X-100 concentración final 0.5% y EDTA a concentración final de 1 mM. Se le agregó el coctel inhibidor de proteasas.

## H. Ensayo de fosforilación de BAG5.

Para probar si AKT desempeña alguna función en la fosforilación de BAG5, células HEK293 en cajas de 10 cm se cotransfectaron con BAG5 marcado por el epítope Myc y alguno de los plásmidos que codifican para AKT silvestre (HA-AKT), constitutivamente activa (myr-AKT) o dominante negativa (AKT-K179M) o plásmido vacío como control. Al segundo día post-transfección, las células se ayunaron de suero y se marcaron metabólicamente con fósforo 32 Para ello, se incubaron en 5 ml de medio DMEM carente de fosfato inorgánico (Pi) que contenía Albúmina de suero bovino (ASB) al 0.1% y 100 μCi/ml de $Pi^{32}$, durante 4 horas a 37ºC. Posteriormente las células se lavaron con DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Gibco, No. Cat. 14190-250) enfriado en hielo y se lisaron en un buffer de lisis que contenía Tris (50 mM) pH 8.0, NaCl (100 mM), NP40 (1%, v/v), Desoxicolato de sodio (1%, p/v), SDS (0.1%, p/v), Pirofosfato de sodio (10 mM), EDTA (5mM) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas: Fluoruro de sodio (20 mM), Aprotinina (10 μg/ml), Leupeptina (10 μg/ml), Soybean inhibidor de tripsina (10 μg/ml), Pepstatina (10 μg/ml), Benzamidina (10 μg/ml), PMSF (1 mM) y Ácido okadaico (1 μM).

Consecutivamente, los lisados celulares se pre-aclararon mediante la incubación de una mezcla de proteína G y A agarosa al 2% (v/v) durante 1 hora a 4ºC. Luego se realizó la inmunoprecipitación de BAG5, mediante la adición de un anticuerpo contra Myc de alta afinidad en dilución 1:1000 y la mezcla proteína A/G agarosa al 2% durante toda la noche a 4ºC. Después, se hicieron lavados del inmunocomplejo unido a la proteína A/G agarosa con el buffer de lisis carente de inhibidores de proteasas. Posteriormente, la proteína BAG5 fosforilada marcada con fósforo$^{32}$ fue eluida en buffer de muestra 1X durante 1 hora a 48ºC y separada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Para corrimiento electroforético se cargaron cantidades iguales de proteína. Finalmente, BAG5 fosforilada se visualizó en un analizador de imágenes de muestras radioactivas (Typhoon TRIO Variable Mode Imager, GE Healthcare).

## I. Ensayo de activación de AKT y mTOR.

### 1. Fosforilación de AKT.

Para evaluar el efecto de BAG5 sobre la activación de AKT, se exacerbó o atenuó la expresión de BAG5 en condiciones en las cuales no se afectó la estabilidad de AKT. Para ello, se transfectaron células HeLa con cantidades crecientes de Myc-BAG5 o el shRNA específico contra BAG5. Dos días después de la transfección, las células se ayunaron de suero durante 12 horas y en algunos experimentos se estimularon con concentraciones crecientes de HGF (10 ng/ml), como se indica en las figuras correspondientes. La fosforilación de AKT en Ser473, que pone de manifiesto su activación, se detectó mediante inmunoblot a partir de los lisados celulares totales. La fosforilación de la cinasa ERK se usó como control.

### 2. Activación de mTOR.

Para estudiar el papel de GRp58 en la activación de los complejos 1 y 2 de mTOR, se determinó la fosforilación de los sustratos río abajo de ambos sustratos en células estimuladas con Insulina o el agente oxidante PAO y

transfectadas con GRp58 y el shRNA contra GRp58. Las células en que se sobreexpresó GRp58, se ayunaron de suero durante 12 horas, dos días después de la transfección y se estimularon con Insulina (50 nM) durante 5 minutos. Las células en que se atenuó la expresión (Knockdown) de GRp58 con el shRNA-GRp58, se seleccionaron con Puromicina (0.5 μg/ml) durante 7 días, para enriquecer la población de células con el shRNA-GRp58 e incrementar la efectividad del mismo. Previo a la culminación de la selección con Puromicina, las células se ayunaron de suero durante 12 horas y luego se estimularon con Insulina (50 nM) durante 5 minutos. Para confirmar la exacerbación o atenuación de GRp58, lisados celulares totales se analizaron mediante inmunoblot contra GRp58 y se consideraron los experimentos en los que la expresión de GRp58 se incrementó al menos dos veces (sobreexpresión) o se disminuyó al menos la mitad (knockdown). La señalización río abajo del complejo 1 de mTOR, se probó en los lisados celulares totales, detectando mediante inmunoblot la fosforilación de sus efectores directos (p-p70S6K-Thr389 y p4E-BP1-Thr37/46) o indirectos (pS6-Ser240/244, sustrato de p70S6K), mientras que para constatar la señalización río abajo del complejo 2 de mTOR, se detectó a través de inmunoblot, la fosforilación de AKT en la Thr450 y Ser473, así como de su sustrato pGSK-3β-Ser9. Además se valoró la fosforilación de mTOR en Ser2448.

## J. Ensayo de cierre de herida y quimiotaxis.

El efecto de BAG5 sobre la migración celular se evaluó mediante ensayos de quimiotaxis y cierre de herida, en los cuales, se transfectaron células HeLa con plásmido control o BAG5 y se hicieron migrar en respuesta a estímulos que llevan a la activación de AKT (SFB y HGF).

**1. Ensayo de cierre de herida.**

Células HeLa se transfectaron con BAG5 fusionado a la proteína verde fluorescente (EGFP) o con la EGFP sola. Cuando los cultivos celulares

alcanzaron la confluencia (48 horas después de la transfección), se raspó la superficie de la caja (donde están adheridas las células) con una punta de micropipeta de 10 l, empleando como guía el margen de un portaobjetos limpio, para generar un trazo lineal a lo largo del cultivo celular. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X estéril y se incubaron en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% o Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 10 ng/ml durante 24 horas. Además, durante este periodo, también se agregó Mitomicina 12 M para evitar la proliferación celular. Después del tiempo de incubación, durante el cual se desarrolló la migración celular, se retiró el medio DMEM con los estímulos, se realizó un lavado con PBS 1X estéril, y finalmente se mantuvieron en PBS 1X para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se capturaron imágenes de tres diferentes sitios de la herida empleando el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti-E con el objetivo 10X apertura numérica de 0.3. Las células fluorescentes que se movieron hacia el área denudada se contaron con ayuda del programa TScratch [273], el cual es una herramienta de software para realizar el análisis del ensayo de cierre de herida. La superposición de la imagen obtenida en campo claro y la imagen fluorescente se obtuvo empleando el software SPOT (SPOT advanced software, SPOT$^{TM}$ imaging solutions) versión 3.

**2. Ensayo de quimiotaxis.**

El ensayo de quimiotaxis, consiste en la migración de células a través de una membrana, en dirección a un agente quimiotáctico, empleando cámaras de quimiotaxis (cámaras de Boyden modificadas). Las cámaras de quimiotaxis están constituidas por dos compartimentos separados por un filtro de policarbonato, al cual se van a adherir las células que activan el proceso de migración. En el compartimento inferior se coloca el agente quimiotáctico inductor de la migración, mientras que en el compartimento superior se sitúa la suspensión celular. Las células que migran, lo hacen atravesando el filtro de policarbonato y permaneciendo adheridas a la cara inferior de la misma. Para

nuestro ensayo de quimiotaxis, células HeLa en cajas de 10 cm se transfectaron con plásmido control (pCMV-Myc) o BAG5 marcado con el epítope Myc.

*Conteo de las células*. Las células se ayunaron de suero durante 12 horas, después de transcurridas 36 horas de la transfección. Las células transfectadas y ayunadas se lavaron con PBS 1X estéril y se despegaron mediante la incubación con 1 ml de tripsina (Sigma) entre 3 y 5 minutos a 37ºC y 5% de $C0_2$. Luego se agregaron 4 ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico, se resuspendieron gentilmente y se recuperaron en tubos Falcon de 15 ml. Después se centrifugó a 1000 rpm durante 3-4 minutos a temperatura ambiente, se aspiró el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió suavemente con micropipeta en 3 ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico, suplementado con albúmina de suero bovino (ASB) al 0.1%. De la suspensión celular tomar entre 50 y 100 μl dependiendo de la confluencia de las células, llevarlas a 1000 μl con medio sin suero y sin antibiótico + ASB al 0.1% y resuspender adecuadamente las células para contarlas en el hemocitómetro, siguiendo la metodología de conteo adecuada. Con el número de células viables por campo del hemocitómetro, se obtiene la media y se emplea en la fórmula que nos revela la cantidad de células por mililitro:

$$\text{células/ml} = M \cdot FD \cdot 10\,000$$

Donde M representa la media del número de células por campo del hemocitómetro y FD, el factor de dilución, el cual varía según la cantidad que se tomó de la suspensión celular, así, si se tomaron 50 μl (en 1000 μl) el factor de dilución es 20 y si se tomaron 100 μl (en 1000 μl) el factor de dilución es 10. El valor obtenido de células/ml se debe multiplicar por 3, que es el volumen real en que se resuspendieron las células, para obtener la cantidad de células totales. Posteriormente, se realizan los cálculos necesarios para obtener una suspensión celular que quede a una concentración de 1000 000 de células/ml, para ello, se centrifuga a 1000 rpm durante 3-4 minutos a temperatura

ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende en el volumen necesario (calculado) para esa concentración.

*Ensamble de la cámara y migración celular*. Empleamos cámaras de quimiotaxis de 48 pozos, cuyos receptáculos inferiores se cargaron con 30 μl del agente quimiotáctico: Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) 10 ng/ml y Suero fetal bovino (SFB) al 10% ambos en DMEM sin suero y sin antibióticos + ASB al 0.1%, procurando hacerlo en menos de 5 minutos. Con esta cantidad (30 μl) se formó un menisco positivo, que asegura el contacto con el filtro de policarbonato, el cual se colocó sobre los pozos recién cargados, con el cuidado de no contaminar el contenido de un pozo con el otro. Además, el orden en que se colocaron los estímulos quimiotácticos se identificó con un pequeño corte en la esquina del filtro. Los filtros de policarbonato libres de polivinilpirrolidona (PVP) con poros de 8 μm, se prepararon previamente recubriéndolos con proteínas de matriz extracelular (solución de gelatina de piel de bovino tipo B al 2%).

Luego, se colocó el empaque de silicón en la posición correcta y enseguida la placa superior, aplicando presión constante mientras se colocan las tuercas que lo fijan definitivamente para prevenir la formación de burbujas. La cavidad formada por los orificios de la placa superior y como piso el filtro recubierto de matriz extracelular, se rellenó con la suspensión de células previamente preparada. A partir de la suspensión de células a una concentración de 1000 000 de células/ml, se cargaron 50 μl, los cuales contenían 50 000 células. La suspensión celular se colocó con micropipeta dentro del pozo y sin tocar el filtro, con la inclinación que permiten las paredes del pozo en un movimiento súbito, con el objetivo de sacar el aire de la cavidad para evitar la formación de burbujas en el fondo y consecuentemente la falta de contacto de las células con una zona del filtro.

La cámara de quimiotaxis, correctamente cargada con los estímulos y la suspensión celular, se colocó dentro de una charola rodeada de papel

absorbente humedecido con agua, la cual se introdujo en la incubadora de células y se incubó a 37ºC, en un ambiente de $CO_2$ al 5%, durante 6 horas.

*Tinción del filtro y cuantificación de la migración*. Concluida la incubación, durante la cual se llevó a cabo la migración de las células, se realizó la tinción y el montaje del filtro, para su posterior análisis. Después de remover las tuercas de la cámara, se invierte la cámara sobre un papel absorbente, dejando caer suavemente la placa superior y el empaque de silicón junto al filtro de policarbonato. Después de retirar la placa inferior, se tomó el filtro por el lado corto con una pinza ancha, cuidando no tocar la superficie expuesta, que es la cara que contiene las células que migraron. El filtro se sumergió en un recipiente con metanol absoluto (Sigma) durante 5 minutos para fijar las células, tras los cuales se secó el exceso de metanol, colocando el borde del filtro sobre un papel absorbente. El filtro seco se tiñó, sumergiéndolo en una solución de cristal violeta (Sigma) al 0.1% en metanol al 20% durante 10 minutos. Posteriormente, el filtro teñido se lavó, transfiriendo rápidamente del recipiente con colorante o otro con PBS 1X para retirar el exceso de colorante evitando que se seque el colorante y no se decolore. Se realizaron tantos lavados como fue necesario hasta que sólo quedara el colorante donde estaban las células. El filtro, aún húmedo, se colocó con la cara de las células que migraron sobre un portaobjetos de 50x75 mm, incluyendo todas las células y con el cuidado de no despegarlas con un movimiento brusco. Después, con un algodón humedecido en PBS 1X, se raspó suavemente sobre la superficie del filtro para retirar las células que no migraron. Una vez que se secó la superficie, se colocó una gota de aceite de inmersión y se sobrepuso otro portaobjeto, quedando preparado para el análisis densitométrico. Los portaobjetos secos se digitalizaron en un escáner (Epson Perfection V330 Photo) y la cuantificación densitométrica se determinó mediante el software de análisis y procesamiento de imagen de dominio público ImageJ 1.47u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. http://imagej.nih.gov/ij).

**3. Soluciones empleadas.**

- *Preparación de filtros de policarbonato*: Los filtros de policarbonato de 25x80 mm con poros de 8 μm (Neuro Probe, No. Cat.), deben ser libres de polivinilpirrolidona (PVP) para poder recubrirse de proteínas de matriz extracelular. Los filtros se recubrieron con proteínas de matriz extracelular contenidas en la gelatina de piel bovina tipo B (Sigma) al 2 %. Para ello, los filtros se incubaron a 37ºC (en la incubadora de células) durante 2 horas en un recipiente con la gelatina al 2%, cambiando de lado cada 30 minutos. Una vez concluido el tiempo de incubación, se secaron a temperatura ambiente, eliminando el exceso de gelatina depositándolos sobre papel absorbente. Los filtros secos se guardan a temperatura ambiente, en un recipiente limpio, interponiendo papel entre los filtros.
- *Gelatina de piel de bovino tipo B al 2%*: Para preparar 50 ml, se pesa 1 gramo de gelatina (Sigma, No. Cat. G9391) y se adiciona poco a poco en 40 ml de PBS 1X que se encuentra en agitación, para evitar la formación de grumos. Se mantiene en agitación por 10 minutos y se afora a 50 ml. Posteriormente se incuba en baño maría por 10 minutos y se filtra en campana con un filtro estéril de 0.45 μm. Se almacena en botella de vidrio a 4ºC. Para emplear la gelatina preparada que está en refrigeración, se coloca a baño maría el tiempo necesario para que se descongele.
- *Tripsina (Trypsin-EDTA solution)*: Sigma, No. Cat. T3924.
- *DMEM sin suero y sin antibiótico suplementado con ASB al 0.1%*: Para preparar 100 ml se pesan 100 mg de albúmina de suero bovino (SIGMA, No. Cat. A-9647) y se diluyen en 100 ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico. Después se filtra en campana con un filtro de 0.22 μm, se almacena a 4ºC en botella de vidrio.
- *Cristal violeta*: Para preparar 100 ml, se pesan 0.1 gramos de cristal violeta (Sigma, No. Cat. C3886), se agregan a 20 ml de metanol (Sigma, No. Cat. 179337 ) y se afora a 100 ml con agua desionizada (milliQ). Se almacena a temperatura ambiente en botella de plástico.

## K. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones independientes. Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar y se analizaron por ANOVA de una vía seguido de las pruebas Bonferroni o Newman-Keuls para contraste de medias, así como, la prueba “t” de student no pareada de una cola, mediante el programa Graph Pad Prism versión 5.0c (Graph Pad software. Inc., San Diego, CA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p<0.05$.

# VIII. Resultados.

Debido a la importancia funcional de las cinasas AKT y mTOR y a su implicación en la fisiopatología de múltiples enfermedades, la búsqueda de proteínas que interaccionen funcionalmente con ellas ha sido intensa. Entre los compañeros de unión que se han descrito para AKT y mTOR se incluyen substratos y proteínas reguladoras que son afines a dominios específicos, promoviendo o inhibiendo su activación y/o degradación. En este trabajo contribuimos a la caracterización de la co-chaperona BAG5 y de la chaperona GRp58 como nuevos reguladores de AKT y mTOR, respectivamente, por su afinidad con los dominios catalíticos de estas cinasas. Ambas proteínas se asocian a las cinasas y regulan su actividad dependiendo de las condiciones de estrés celular como la ausencia de nutrientes o el estado oxidativo, funcionando como sensores de estas condiciones de estrés, para contribuir a la modulación de la vía PI3K-AKT-mTOR. A continuación revisaremos la caracterización de la interacción entre la co-chaperona BAG5 y la cinasa AKT y posteriormente la interacción identificada previamente en nuestro laboratorio entre la chaperona GRp58 y la cinasa mTOR, como reguladoras de la vía PI3K-AKT-mTOR en el contexto de la migración endotelial y angiogénesis.

## A. Interacción AKT-BAG5.

### 1. Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT.

*Interacción entre AKT y BAG5 en el sistema de doble híbrido en levaduras.*

La estructura de AKT comprende un dominio homólogo a pleckstrina $NH_2$-terminal, un dominio de cinasa (catalítico) y un dominio regulador COOH-terminal que participan en la activación, actividad de cinasa y la interacción con diversas proteínas. Con el objetivo de identificar nuevas proteínas con afinidad por el dominio catalítico de AKT como potenciales substratos y/o moduladores su actividad o estabilidad, realizamos un tamizaje mediante el ensayo de doble

híbrido en levaduras en una librería de cDNAs de cerebro fetal humano. Para ello empleamos la mutante dominante negativa (K179M) del dominio catalítico de AKT (AKT-KDD) [274], como carnada y de las clonas obtenidas seleccionamos una cuyo análisis de secuencia reveló a BAG5 (completa) como compañero de unión de AKT (Figura 18A).

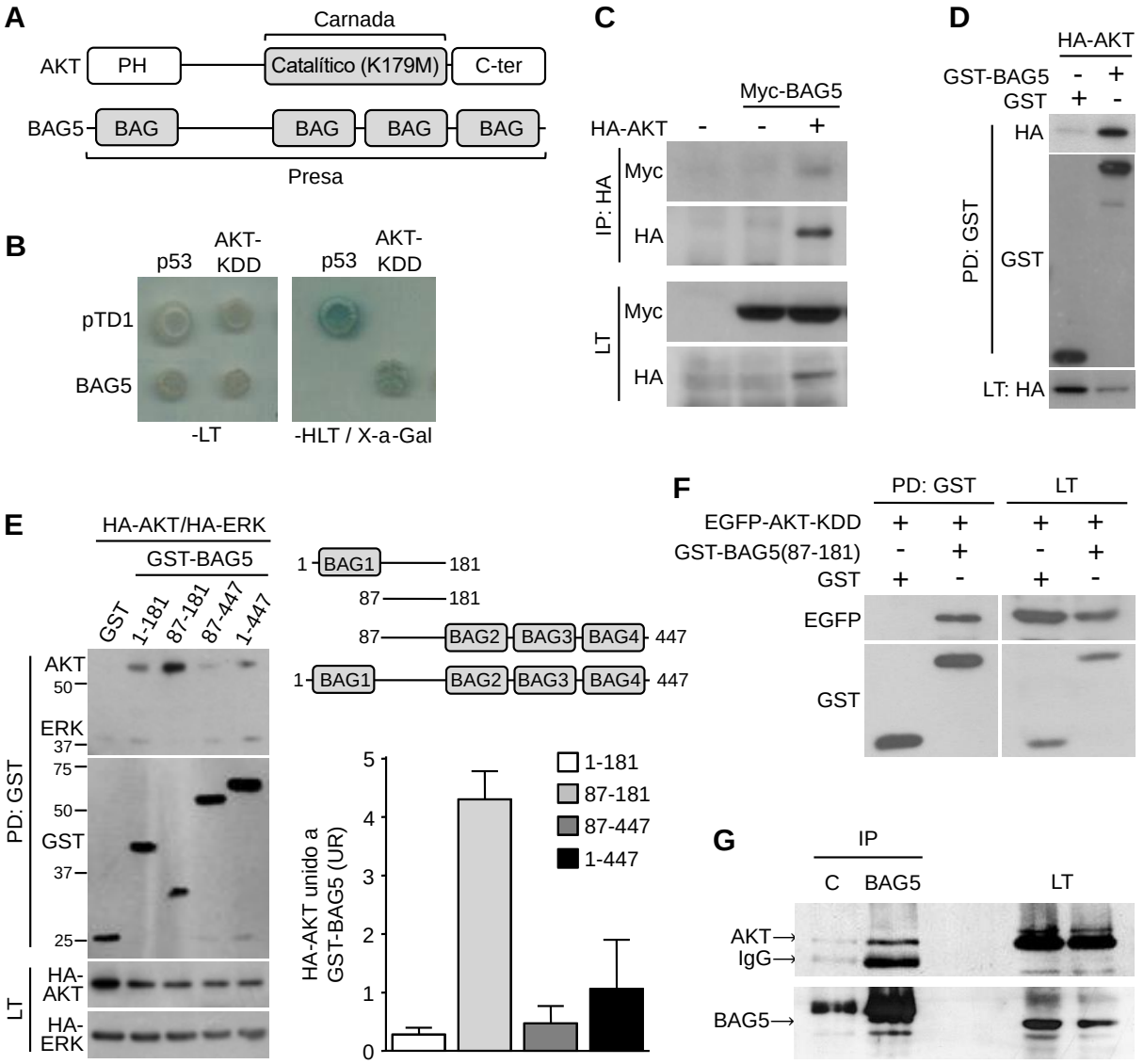



**Figura 18. Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT.** A) Arreglo lineal de los dominios que conforman las estructuras de AKT y BAG5, indicando el dominio de AKT usado como carnada en el tamizaje de doble hibrido en levaduras (dominio de cinasa catalítico) y la estructura completa de BAG5 que fue obtenida como presa. B) Interacción entre AKT y BAG5 en el sistema de doble híbrido en levaduras. La mutante dominante negativa (K179M) del

dominio de cinasa de AKT (AKT-KDD) se usó como carnada para tamizar una librería de cDNA de cerebro fetal humano, donde se identificó a BAG5 como una nueva proteína que interacciona con AKT. La especificidad de la interacción entre AKT y BAG5 se determinó usando las proteínas pTD1 (antígeno T) y p53 como control negativo y la interacción conocida entre estas proteínas (p53 y pTD1) sirvió como control positivo del sistema. El crecimiento de levaduras en los medios restrictivos carentes de leucina y triptófano (-LT) sirvió como control de la presencia de los plásmidos (panel izquierdo), mientras que el crecimiento en medio restrictivo carente de histidina, leucina y triptófano (-HLT), así como la actividad de la α-galactosidasa sobre el sustrato X-α-Gal (coloración azul), indicó la interacción entre las proteínas presentes. C, D) AKT y BAG5 interaccionan en células de mamífero. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-AKT y Myc-BAG5 (C) o HA-AKT y GST-BAG5 (D) como se indica. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo contra HA (C, IP: HA) o precipitados por afinidad (pull-down) con esferas de glutatión sefarosa (D, PD: GST) y sometidos a corrimiento electroforético seguido de inmunoblot con anticuerpos específicos contra HA, Myc o GST. La expresión de las proteínas transfectadas se confirmaron en los lisados totales (LT). E) Mapeo del sitio de interacción de BAG5 con AKT. Lisados de células HEK293T co-transfectadas transitoriamente con HA-AKT, HA-ERK y cada una de las construcciones indicadas de BAG5 fusionadas a GST, se precipitaron por afinidad con glutatión sefarosa para identificar el sitio de interacción con AKT. La capacidad de las construcciones para interactuar con AKT se reveló mediante inmunoblot usando un anticuerpo contra HA. GST se usó como control negativo y la especificidad de la interacción se determinó comparando con la cinasa ERK. El gráfico representa la media ± error estándar del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. F) La región "*linker*" (GST-BAG5 87-181) interacciona con la mutante dominante negativa del dominio catalítico de AKT (AKT-KDD). La interacción entre la región *linker* de GST-BAG5 (87-181) y EGFP-AKT-KDD se determinó mediante la precipitación por afinidad de GST-BAG5 con la resina glutatión sefarosa en lisados de HEK293T co-transfectados con ambos plásmidos. La interacción se reveló por inmunoblot usando el anticuerpo contra EGFP. GST fue usado como control negativo. G) AKT y BAG5 endógenas interaccionan. La cinasa AKT endógena revelada por inmunoblot se encontró asociada a BAG5 endógena inmunoprecipitada a partir de lisados de células HeLa. La expresión de las proteínas endógenas se confirmó en el lisado total (LT) y un anticuerpo no relacionado contra PAK, se usó como control negativo. Las flechas indican las bandas correspondientes a AKT, BAG5 o la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG).

El sistema de doble híbrido en levaduras se basa en la reconstitución del factor transcripcional Gal4, esto ocurre cuando la interacción entre dos proteínas fusionadas de forma independiente a los dominios de GAL4 (el dominio de unión al DNA y el dominio de activación transcripcional) hace que estos se aproximen lo suficiente. Esto induce la transcripción, de los genes HIS3 y lacZ, entre otros, para histidina y α-galactosidasa. La interacción específica entre BAG5 y AKT se demostró por el crecimiento de las levaduras en el medio

restrictivo carente de histidina y por la coloración azul de la colonia debido a la acción de la α-galactosidasa sobre el sustrato cromogénico X-α-Gal (Figura 18B). El crecimiento de las levaduras en el medio carente de leucina y triptófano (-LT) demostró la presencia de los plásmidos transformados sin tomar en consideración las interacciones posibles (Figura 18B, panel izquierdo); sin embargo, el crecimiento de levaduras en medios carentes de histidina, leucina y triptófano (-HLT), nos indicó la reconstitución del factor transcripcional Gal4, misma que sólo sucede cuando existe interacción entre las proteínas trasformadas (AKT y BAG5). La interacción conocida entre p53 y el antígeno T grande de SV40 (pTD1) se utilizó como control positivo y negativo (Figura 18B, panel derecho).

*AKT y BAG5 interaccionan en células de mamífero.*

Para probar que la interacción entre BAG5 y AKT ocurría en células de mamífero, se transfectaron BAG5 completo marcado con los epítopes Myc- y GST-, y AKT completa marcada con el epítope HA- en la línea celular epitelial humana HEK293T. Consistente con los resultados del doble híbrido, se pudo corroborar la presencia de Myc-BAG5 en donde se aisló por inmunoprecipitación HA-AKT (Figura 18C) y también en el pulldown de GST-BAG5, en el que se detectó a la cinasa HA-AKT, pero no en el control negativo, donde se realizó el pulldown de GST solo (Figura 18D).

*La región linker de BAG5 (N87-P181) corresponde a la región mínima de interacción con AKT.*

La proteína BAG5 es miembro de una familia de reguladores de chaperonas cuya actividad está determinada por la presencia de al menos un dominio BAG en su estructura. La estructura de BAG5 consiste de cuatro dominios BAG, tres de los cuales están orientados hacia el carboxilo terminal dispuestos en tándem y uno hacia el amino terminal [236, 238, 275]. Con el fin de determinar la región mínima de BAG5 que interactúa con AKT y considerando la presencia de un sitio consenso parcialmente conservado de fosforilación por AKT en la treonina

152, localizado en la región que denominamos "*linker*" de BAG5 (87-181), se realizaron diferentes construcciones de BAG5 fusionadas a GST, las cuales incluían dicha región. Mediante ensayos de pull-down se demostró la asociación de todos los fragmentos de BAG5 con AKT, revelando la importancia de la región *linker* para esta interacción. En forma interesante, se observó una mayor unión con la región linker (87-181) de BAG5, a pesar de haber tenido el nivel de expresión más bajo en comparación con las otras construcciones (Figura 18E). La ausencia de AKT en el pull-down de GST solo, así como la falta de una unión significativa entre las construcciones de BAG5 y la cinasa ERK, indican que la interacción fue específica. Además, la mutante dominante negativa del dominio catalítico de AKT (AKT-KDD), equivalente a la empleada como carnada en el doble híbrido, pero en este caso fusionada a EGFP, también se asoció específicamente con la región linker (87-181) de BAG5 fusionada a GST y no con el GST usado como control (Figura 18F).

*Interacción entre las proteínas AKT y BAG5 endógenas.*

La interacción entre las proteínas AKT y BAG5 expresadas endógenamente en células HeLa se examinó por co-inmunoprecipitación. La asociación de AKT endógena con BAG5, detectada por inmunoblot, se confirmó por su presencia en el carril en la cual se inmunoprecipitó BAG5, mientras que donde se inmunoprecipitó con un anticuerpo no relacionado usado como control, se observa escasamente (Figura 18G).

**2. Distribución subcelular y co-localización de BAG5 y AKT.**

Para determinar la distribución celular y la potencial colocalización de AKT y BAG5, se transfectaron células HeLa con HA-AKT y Myc-BAG5 por separado (Figura 19A y B) y conjuntamente (Figura 19C, D, E y F). Las células fueron fijadas con paraformaldehido y teñidas con los anticuerpos primarios monoclonales anti-HA y anti-myc, seguido por la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con rodamina (HA-AKT, rojo) y Cy5 (myc-BAG5,

verde). El análisis de las inmunofluorescencias, mediante microscopía confocal, mostró la localización de AKT en el citosol y en la membrana plasmática (Figura 19A), mientras que BAG5 se visualizó en el citosol y predominantemente en el núcleo (Figura 19B).

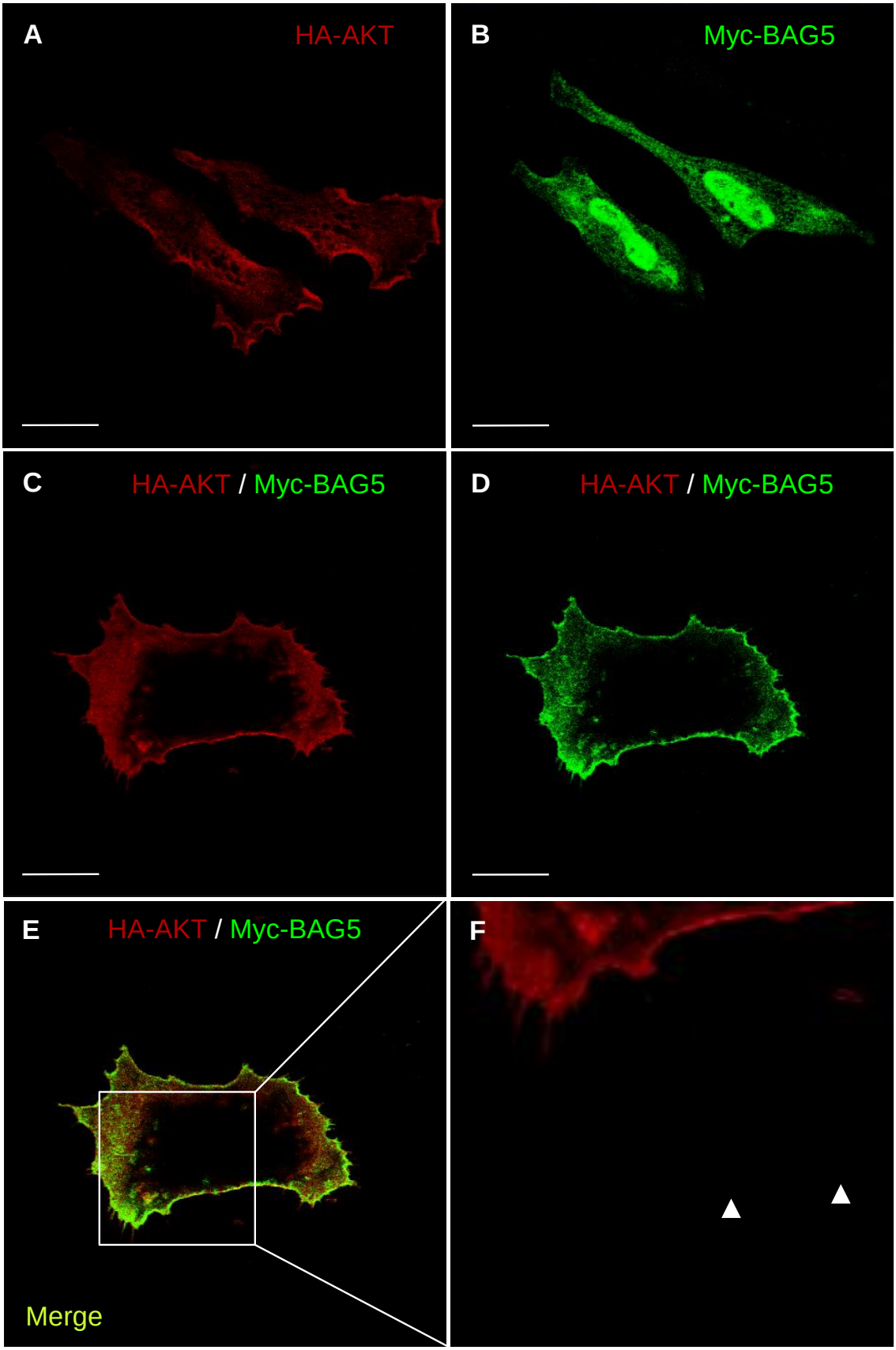

A
HA-AKT
B
Myc-BAG5
C
HA-AKT / Myc-BAG5
D
HA-AKT / Myc-BAG5
E
HA-AKT / Myc-BAG5
Merge
F

**Figura 19. Distribución subcelular de BAG5 y AKT.** Células HeLa fueron transfectadas con HA-AKT (A), Myc-BAG5 o ambas proteínas (C y D). Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos contra HA y Myc, seguido por anticuerpos secundarios conjugados con rodamina (HA-AKT, rojo) y Cy5 (Myc-BAG5, verde) y analizadas por microscopía confocal. La superposición de los dos colores resulta en una señal amarilla que muestra la colocalización de AKT y BAG5 (E), la cual es magnificada y referida por las cabezas de flecha en el inciso F. Barra, 20μM.

Cuando se co-transfectaron HA-AKT y Myc-BAG5, ambas proteínas mostraron un patrón de localización muy similar, distribuyéndose en citosol y membrana celular (Figura 19C y D), encontrándose áreas de co-localización en la membrana plasmática, visualizadas en amarillo, indicadas por las cabezas de flecha (Figura 19E y F). Un hecho que llama la atención es el cambio de localización subcelular de BAG5 cuando se coexpresa con AKT, pasando de 92% (26/28) en frecuencia de localización nuclear cuando se sobreexpresa solo, a un 45% (9/20) de esta localización cuando se coexpresa con AKT. Ejemplos representativos se muestran en la figura 19B y D respectivamente.

**3. BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.**

*Cambios en la expresión de BAG5 regulan los niveles proteicos de AKT.*

Los primeros indicios que orientaron a una posible función de BAG5 regulando la estabilidad de AKT se advirtieron en los experimentos de interacción entre AKT y BAG5 en células de mamífero, donde la sobreexpresión de BAG5 y sus construcciones redujeron los niveles proteicos de AKT y de su dominio de cinasa (ver lisados totales, LT, en Figura 18D, E y F). Considerando estos resultados, y que las proteínas de la familia de BAG son cofactores de chaperonas que regulan la función proteica a través de alterar la estabilidad de sus proteínas sustrato, y en particular que BAG5 regula la estabilidad de proteínas modulando la actividad de la chaperona Hsp70 y de las ligasas E3 Parkina y CHIP, quisimos evaluar el papel de BAG5 como un potencial regulador de la estabilidad de AKT.

Como se muestra en la Figura 20A, BAG5 al ser sobreexpresado disminuyó significantemente los niveles proteicos del domino catalítico de AKT (EGFP-AKT-KDD) en su versión de mutante dominante negativa. Además, BAG5 también llevó a una desestabilización, dosis dependiente, de la AKT completa y de la AKT fosforilada en la Thr450, fosforilación importante para la estabilidad de la cinasa AKT recién sintetizada. Esta fosforilación en Thr450 es llevada a cabo por mTORC2, lo que constituye un ejemplo adicional de la relación estrecha que existe entre las cinasas AKT y mTOR [125, 193, 276]. La disminución en la expresión de AKT que ocurrió por la sobreexpresión de BAG5 fue específica, ya que en tales condiciones no hubo efecto en la expresión de las cinasas GSK-3β y ERK, evidenciando la especificidad del efecto de BAG5 sobre AKT (Figura 20B, panel izquierdo). En contraste, las células knockdown para BAG5 mostraron un incremento significativo de los niveles de HA-AKT (Figura 20B, panel derecho).

*La proteína BAG5 favorece la degradación de AKT en condiciones que reducen la estabilidad de esta cinasa.*

En condiciones fisiológicas, la estabilidad de AKT es controlada de manera precisa, lo que contribuye a mantener su papel preponderante en múltiples funciones celulares. Puesto que BAG5 produjo una disminución en la expresión de AKT, consideramos que esto podría ser más evidente en condiciones adversas para la célula que, se sabe, disminuyen la actividad de AKT y ponen en riesgo su estabilidad. Para poner a prueba esta hipótesis, evaluamos el efecto de BAG5 sobre la estabilidad de AKT en condiciones que inducen su desestabilización (CDA, Condiciones desestabilizantes de AKT) como son el ayuno, la incubación con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariotas y la incubación con 17-AAG, un potente inhibidor de la chaperona HSP90 que tiene acciones estabilizantes de AKT [141].

Las células expuestas a las condiciones que inducen desestabilización de AKT (CDA), mostraron una reducción clara en los niveles proteicos de AKT recombinante, pero un efecto discreto en la reducción de los niveles de AKT

endógena y AKT fosforilada en Thr450. La GTPasa Rac, que fue usada como control, no mostró cambios. En los lisados de células en las que se sobreexpresó BAG5, el efecto desestabilizador sobre AKT fue significantemente mayor para la AKT marcada con el epítope HA- que para la AKT endógena, la cual presentó un efecto desestabilizante menor y, consistente con los resultados previos, también los niveles de la AKT fosforilada en Thr450 disminuyeron (Figura 20C). El gráfico de la Figura 20D se construyó con los valores densitométricos de los niveles proteicos de HA-AKT (Figura 20C) correspondientes a los tiempos 0 y 12 horas de exposición a las condiciones CDA, en presencia o ausencia de myc-BAG5. En él se observa que la sobreexpresión de BAG5 causa disminución de lo niveles de HA-AKT (tiempo 0h), efecto que se exacerba cuando las células se exponen durante 12 horas a las condiciones desestabilizantes de AKT (Figura 20D).

El hecho de que BAG5 contribuyó a disminuir los niveles de AKT, en las condiciones en que la síntesis de proteínas y la actividad de la chaperona HSP90 se redujeron farmacológicamente (condiciones CDA), fue consistente con la idea de que BAG5 pudiera ser precisamente un mediador del efecto desestabilizante de las condiciones CDA sobre la expresión de AKT, de forma tal que una disminución en los niveles de BAG5 atenuaría el efecto ADC sobre la expresión de AKT. En efecto, la disminución en la expresión de BAG5 endógena, mediante shRNA, atenuó el efecto desestabilizante de una exposición a las condiciones CDA sobre la expresión tanto de HA-AKT como de AKT endógena, determinada después de 12 horas de tratamiento CDA, confirmando que BAG5 promueve la desestabilización de AKT (Figura 20E). Las proteínas ERK y Rac, que se usaron como controles, no sufrieron cambios ni con las condiciones desestabilizantes de AKT ni con los cambios en la expresión de BAG5.

*BAG5 promueve la ubiquitinación de AKT.*

El sistema ubiquitina/proteosoma es una vía que media la ubiquitinación y la subsecuente regulación del recambio y actividad de las proteínas blanco. Para

evaluar la participación del sistema ubiquitina/proteosoma en la desestabilización de AKT mediada por BAG5, realizamos ensayos de ubiquitinación de AKT. La cinasa AKT endógena fue inmunoprecipitada a partir de lisados celulares transfectados con Myc-BAG5, HA-Ubiquitina o ambos.

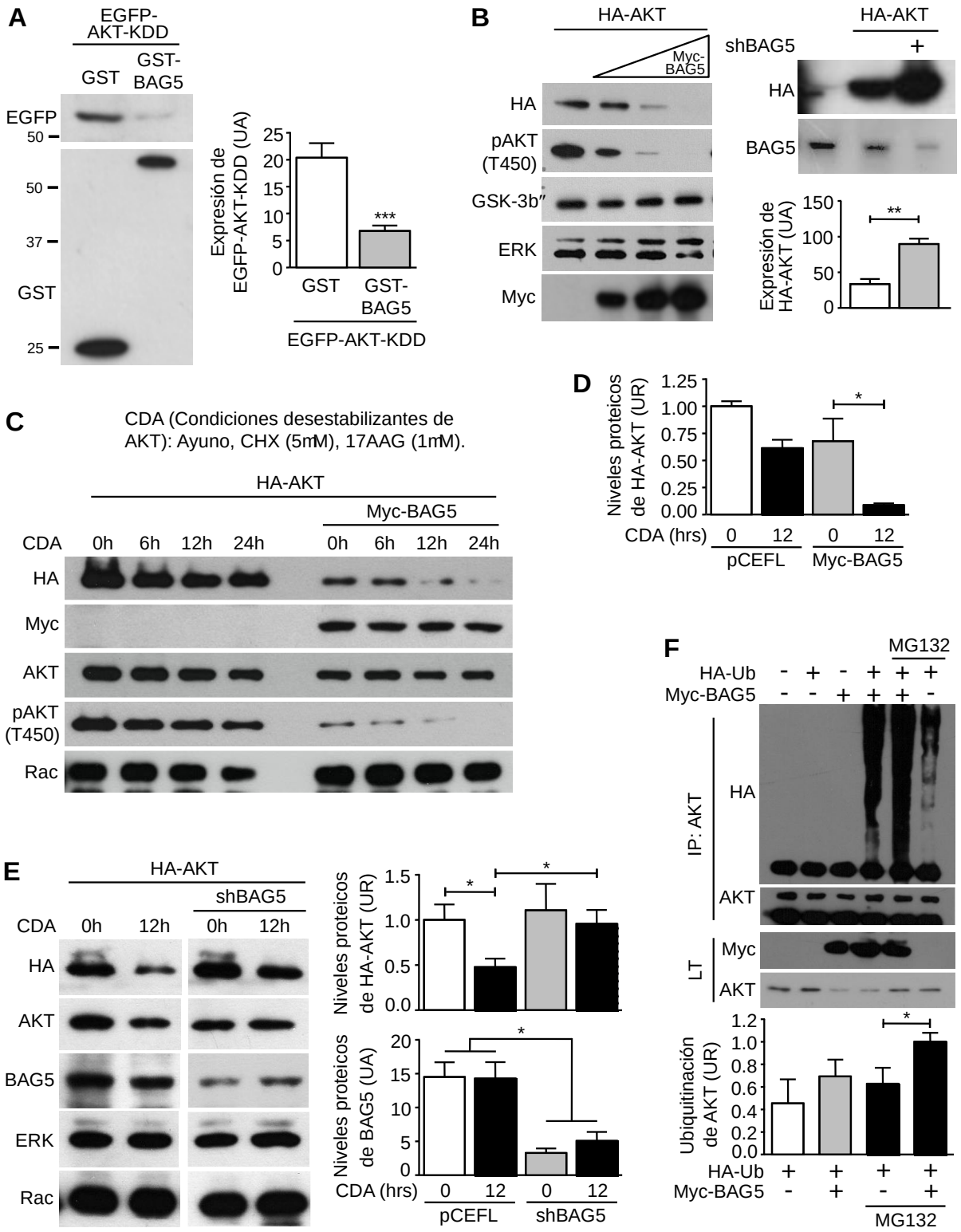


**Figura 20. BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.** A) La sobreexpresión de BAG5 reduce los niveles proteicos de AKT-KDD. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con EGFP-AKT-KDD, Myc-BAG5 o GST, como se indica. La expresión de AKT-KDD y BAG5 se detectó mediante inmunoblot en los lisados celulares totales usando anticuerpos específicos contra EGFP o GST, respectivamente. El gráfico muestra el análisis densitométrico de la expresión de AKT-KDD en presencia o ausencia de BAG5 de tres experimentos independientes. Las barras representan la media ± error estándar, *** $p<0.001$ comparado con el efecto de GST, usado como control. B) Los cambios en la expresión de BAG5 regulan los niveles proteicos de AKT. El incremento en las cantidades de Myc-BAG5 induce una disminución en los niveles proteicos de AKT detectados por inmunoblot contra el epítope HA o la fosforilación en Thr450 de AKT, sin alterar la expresión de GSK-3β o ERK (panel izquierdo). La disminución en la expresión de BAG5 (shBAG5) promueve un incremento en los niveles de proteína de HA-AKT (panel derecho). Las barras representan la media ± error estándar del valor densitométrico de la expresión de AKT en células control y células knockdown para BAG5 de tres experimentos independientes, ** $p<0.01$. C) BAG5 facilita la degradación de AKT en condiciones desestabilizantes de AKT (CDA). Células HeLa transfectadas transitoriamente con HA-AKT y Myc-BAG5 fueron tratadas con cicloheximida (CHX, 5μM) y 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, 1μM) en un medio libre de suero (CDA) [141] durante los tiempos indicados. La expresión de AKT, p-AKT (Thr450), BAG5 y Rac, que fue usado como control, se detectaron por inmunoblot en los lisados celulares totales. D) La gráfica representa los valores densitométricos de la HA-AKT detectada en los lisados celulares obtenidos a los puntos de tiempo 0 y 12 horas de exposición a las CDA en presencia o ausencia de Myc-BAG5. Se muestra la media ± error estándar de tres experimentos independientes, * $p<0.05$. E) La degradación de AKT inducida por las CDA es atenuada por el la disminución de la expresión de BAG5. Las células HeLa fueron transfectadas con HA-AKT y el shRNA de BAG5 durante 72 horas y en presencia de las CDA por las últimas 12 horas, como se indica. Los niveles de proteína de AKT, BAG5, ERK y Rac se analizaron por inmunoblot con los anticuerpos específicos respectivos, utilizando a ERK y Rac como controles de carga. Las gráficas representan el análisis densitométrico de los niveles proteicos de AKT y BAG5, determinados en tres experimentos independientes. Se graficó la media ± error estándar, * $p<0.05$. F) BAG5 promueve la ubiquitinación de AKT. Treinta y seis horas después de ser transfectadas con HA-Ubiquitina y Myc-BAG5, células HeLa, fueron ayunadas de suero durante 12 horas y tratadas o no con el inhibidor de proteosoma MG132 (20μM) durante 6 horas. La cinasa AKT endógena se inmunoprecipitó a partir de los lisados totales y la presencia de AKT ubiquitinada se detectó mediante inmunoblot, usando un anticuerpo contra HA, reconocido como el barrido característico de alto peso molecular.

En tales condiciones, AKT se encontró fuertemente ubiquitinada (de acuerdo al corrimiento electroforético característico en forma de barrido) cuando se co-expresaron Myc-BAG5 y HA-Ubiquitina (Figura 20F, carril 4) y en menor grado

cuando se sobreexpresaron por separado HA-Ubiquitina y Myc-BAG5 (Figura 20F, carriles 2 y 3 respectivamente). El inhibidor MG132 que interfiere con la función del proteosoma generó una mayor acumulación de AKT endógena asociada a HA-Ubiquitina en presencia de BAG5, en comparación con la situación en que no se sobreexpresó BAG5 (Figura 20F, carril 5 y 6 respectivamente). En conjunto, estos resultados sugieren que BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.

**4. La degradación de AKT inducida por BAG5 es mediada por Hsp70.**

Existe evidencia de la regulación negativa de AKT por la chaperona Hsp70 [143], la cual es regulada por la co-chaperona BAG5 [245, 247]. Considerando estas premisas y nuestras recientes observaciones, decidimos evaluar la participación de la chaperona Hsp70 en la ubiquitinación y degradación de AKT mediada por BAG5.

*Hsp70 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.*

Primeramente evaluamos la existencia de un complejo entre AKT, BAG5 y Hsp70, el cual pudimos constatar transfectando en células HEK293T el cDNA que codifica para estas proteínas y realizando el pull-down de GST-BAG5. En concordancia con los resultados mostrados previamente, BAG5 se asoció intensamente a HA-AKT en los lisados provenientes de células que co-expresaban sólo a estas proteínas. Sin embargo, en los lisados obtenidos  partir de células en las que se sobreexpresaron las tres proteínas (AKT, BAG5 y Hsp70), se observó una fuerte asociación entre GST-BAG5 y EGFP-Hsp70, pero una débil asociación con HA-AKT, sugiriendo una competencia por BAG5 (Figura 21A, panel izquierdo). Consistente con los resultados previos, BAG5 produjo una disminución de los niveles proteicos de AKT, que fue aun más aparente en los lisados provenientes de células que coexpresaban AKT, BAG5 y Hsp70 (Figura 21A, panel derecho). La expresión de AKT, Hsp70 y BAG5 se detectó mediante inmunoblot, empleando anticuerpos específicos contra HA, EGFP y GST, respectivamente. En concordancia con los reportes de otros

grupos, la sobreexpresión de Hsp70 redujo la expresión tanto de la AKT transfectada como de la endógena, de una manera dependiente de la dosis, sin afectar la expresión de la proteína S6 que se usó como control (Figura 21B). Además, la AKT endógena mostró mayor ubiquitinación en presencia de Hsp70, efecto que se exacerbó con la presencia de MG132, inhibidor del proteosoma (Figura 21C).

De manera interesante, el efecto desestabilizante de AKT promovido por Hsp70, se redujo significativamente en células donde se atenuó la expresión de BAG5 con un shRNA específico contra BAG5 (Figura 21D). En estas condiciones, en las cuales se sobreexpresó Hsp70 y se atenuó la expresión de BAG5, la expresión de ERK y la proteína S6 no se modificó, indicando que el efecto fue específico (Figura 21D). Estos datos sugieren que BAG5 contribuye a la degradación de AKT promovida por Hsp70.

**5. Parkina, una ligasa de ubiquitina tipo E3, promueve la ubiquitinación y degradación de AKT y contribuye al efecto de BAG5.**

La proteína BAG5 se asocia a las ligasas de ubiquitina Parkina y CHIP en condiciones patológicas como la degeneración de neuronas dopaminérgicas [247, 248]. Por otro lado, la cooperación entre las chaperonas moleculares y el sistema ubiquitina proteosoma, dentro de las que destacan la asociación entre Hsp70 y CHIP, promueve la ubiquitinación y degradación de proteínas [277-280]. Basados en esto, investigamos la hipótesis de que Parkina contribuiría al efecto de BAG5 como promotor de la degradación de la cinasa AKT.

*Parkina promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.*

Primero, evaluamos el papel de Parkina en la interacción AKT-BAG5. Como se muestra en la Figura 22A, panel izquierdo (PD:GST) y en concordancia con experimentos previos, se observa una intensa asociación de AKT al pull-down de BAG5, la cual deja de observarse en presencia de Myc-Parkina asociada a

BAG5, sugiriendo que Parkina inhibe la interacción entre BAG5 y AKT. Además, Parkina induce una disminución importante de los niveles proteicos de AKT, detectados en lisados totales por inmunoblot con el anticuerpo contra HA y también favorece la reducción de la expresión de BAG5, demostrado por el decremento de la cantidad de GST-BAG5 encontrado en el pulldown.

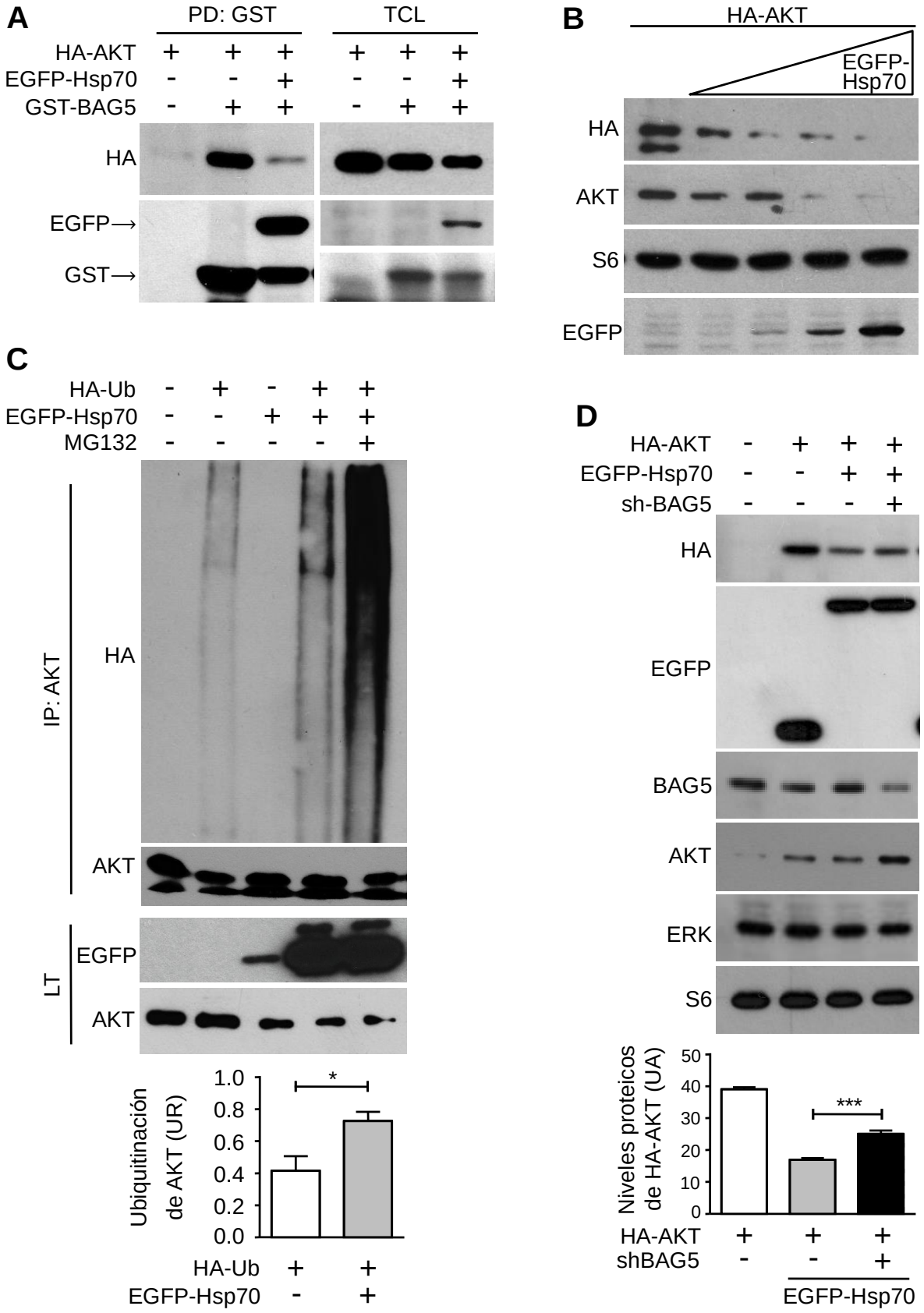

A
PD: GST
TCL
HA-AKT
EGFP-Hsp70
GST-BAG5
HA
EGFP→
GST→
B
HA-AKT
EGFP-Hsp70
HA
AKT
S6
EGFP
C
HA-Ub
EGFP-Hsp70
MG132
IP: AKT
HA
AKT
LT
EGFP
AKT
Ubiquitinación de AKT (UR)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
HA-Ub
EGFP-Hsp70
D
HA-AKT
EGFP-Hsp70
sh-BAG5
HA
EGFP
BAG5
AKT
ERK
S6
Niveles proteicos de HA-AKT (UA)
50
40
30
20
10
0
***
HA-AKT
shBAG5
EGFP-Hsp70

**Figura 21. La degradación de AKT promovida por BAG5 es mediada por Hsp70.** A) BAG5 interacciona con AKT y Hsp70. Células HEK293T transfectadas transitoriamente con HA-AKT, GST-BAG5 y EGFP-Hsp70, como se indica, se ayunaron de suero durante 12 horas y se trataron con MG132 (20 μM) durante 4 horas. GST-BAG5 se aisló mediante pull-down a partir de lisados celulares totales usando perlas de glutatión sefarosa. La interacción de HA-AKT y EGFP-Hsp70 con BAG5 se detectó en el pull-down (PD: GST) y la expresión de ambas proteínas se confirmó en el lisado celular total (LT), usando anticuerpos contra HA y EGFP, respectivamente. B) Hsp70 promueve la degradación de AKT. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con HA-AKT y cantidades crecientes de EGFP-Hsp70. En los lisados celulares obtenidos 48 horas post-transfección, se determinaron los niveles proteicos de AKT (transfectada y endógena), EGFP-Hsp70 y S6 (usado como control) mediante inmunoblot usando anticuerpos contra HA, AKT, EGFP y S6, respectivamente. C) La sobreexpresión de Hsp70 promueve la ubiquitinación de AKT. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con HA-Ubiquitina y EGFP-Hsp70. Treinta y seis horas después de la transfección fueron ayunadas de suero durante 12 horas, en presencia o no del inhibidor de proteosoma MG132 (20μM) durante 6 horas. AKT endógena se inmunoprecipitó a partir de los lisados celulares totales y la presencia de la AKT ubiquitinada se detectó mediante inmunoblot, usando un anticuerpo contra HA, reconocido como un barrido de alto peso molecular. La expresión de AKT y Hsp70 se observó en el lisado total (LT), usando anticuerpos contra AKT y EGFP, respectivamente. La gráfica muestra la media ± error estándar de tres experimentos independientes de los valores densitométricos de la AKT ubiquitinada en presencia o ausencia de Hsp70, * $p<0.05$. D) Hsp70 requiere a BAG5 para promover la degradación de AKT. Células HeLa se transfectaron transitoriamente con el shRNA-BAG5 durante 24 horas, seguido de una nueva transfección con HA-AKT y EGFP-Hsp70 durante 48 horas, acumulando 72 horas de efecto del shRNA-BAG5. La expresión de AKT, Hsp70, BAG5, ERK y S6 se analizó por inmunoblot, usando anticuerpos específicos contra HA o EGFP para la AKT y Hsp70 transfectadas, respectivamente, o anticuerpos que reconocen a las proteínas endógenas BAG5, AKT, ERK y S6, como se indica. La detección de ERK y S6 se usaron como control de carga. El gráfico ilustra el análisis densitométrico de los niveles proteicos de HA-AKT en presencia o ausencia de Hsp70, así como el efecto del Knockdown de BAG5 (shBAG5) sobre el efecto de Hsp70. Las barras representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, *** $p<0.001$.

Para caracterizar el efecto de Parkina sobre la estabilidad de AKT, se transfectaron células con HA-AKT y cantidades crecientes de Myc-Parkina. Consistente con las observaciones de los experimentos de interacción, la sobreexpresión de Parkina llevó a una disminución de los niveles proteicos de AKT, dependiente de la dosis de Parkina transfectada, esto sin afectar la estabilidad de GSK-3β usada como control (Figura 22B). Además, al igual que BAG5 y Hsp70, Parkina fue capaz de favorecer la ubiquitinación de AKT endógena (Figura 22C).

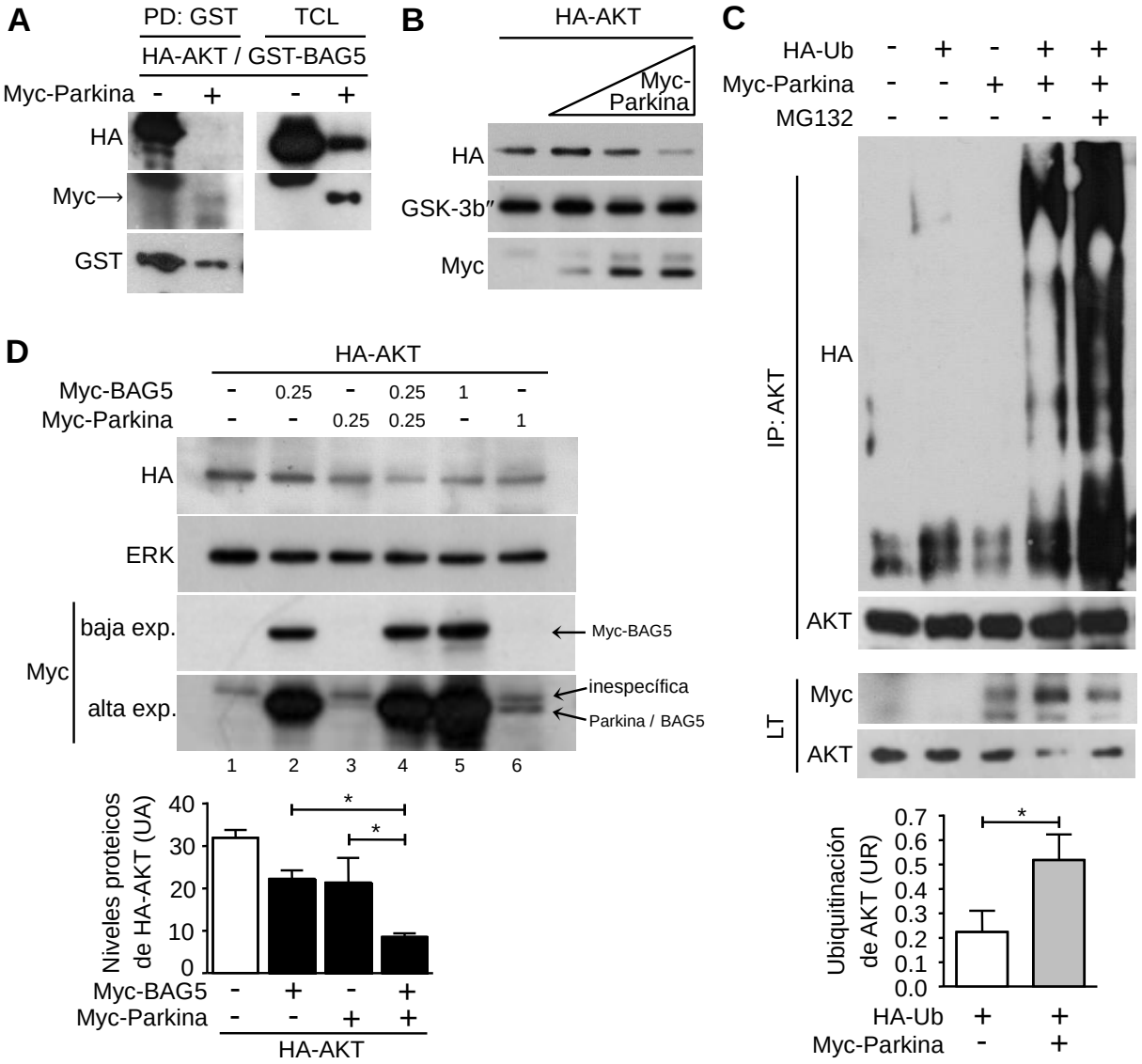



**Figura 22. Parkina promueve la ubiquitinación y degradación de AKT y contribuye al efecto de BAG5.** A) Parkina interactúa con BAG5 aparentemente desplazando a AKT. Células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con HA-AKT y GST-BAG5 incluyendo o no a Myc-Parkina, como se indica. BAG5 se aisló usando perlas de glutatión sefarosa (pull-down) a partir de los lisados celulares totales y se detectó por inmunoblot con el anticuerpo contra GST. La presencia de AKT y Parkina asociadas a BAG5 se visualizó por inmunoblot en el pull-down (PD: GST) usando anticuerpos contra HA o Myc, respectivamente, y la expresión de las proteínas transfectadas se determinó en el lisado celular total (LT). B) La sobreexpresión de Parkina promueve la degradación de AKT. Células HeLa fueron transfectadas con HA-AKT o co-transfectadas con HA-AKT y cantidades crecientes de Myc-Parkina. Los niveles de proteína de AKT, Parkina y GSK-3β, usada como control de carga, se analizaron por inmunoblot con anticuerpos contra HA, Myc o GSK-3β, respectivamente. C) La sobreexpresión de Parkina promueve la ubiquitinación de AKT. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con HA-Ubiquitina, Myc-Parkina o ambas por 48 horas, como se indica. Las células fueron

ayunadas de suero por 12 horas e incubadas con MG132 (20μM) durante 6 horas donde se indica. La AKT endógena fue inmunoprecipitada a partir de los lisados totales celulares y la ubiquitinación de AKT se detectó mediante inmunoblot, usando un anticuerpo contra HA. La expresión de Parkina transfectada y AKT endógena fue confirmada en los lisados totales (LT). Las barras representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes de los valores densitométricos de los niveles de ubiquitinación de AKT, * $p<0.05$. D) La coexpresión de BAG5 y Parkina contribuyen a la reducción de los niveles proteicos de AKT. Células HeLa fueron transfectadas con HA-AKT y bajas cantidades (0.25μg) de Myc-Parkina, Myc-BAG5 o ambas, o altas cantidades (1μg) de Myc-BAG5 o Myc-Parkina, como se indica. Los niveles de AKT y ERK (usado como control de carga) se determinaron por inmunoblot usando anticuerpos contra HA y ERK, respectivamente. La expresión de BAG5 y Parkina se confirmó usando un anticuerpo contra Myc, mostrado por dos diferentes exposiciones del mismo blot. Los valores densitométricos de los niveles de expresión de AKT sola o en presencia de bajas dosis (0.25μg) de BAG5, Parkina o ambas se ilustran en la gráfica. Las barras representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, * $p<0.05$.

*Parkina contribuye al efecto de BAG5 como promotor de la degradación de AKT.*

Con el objetivo de evaluar si BAG5 y Parkina tienen un efecto sinérgico en la desestabilización de AKT, transfectamos HA-AKT y cantidades mínimas de BAG5 y Parkina, con la finalidad de causar un efecto débil como desestabilizantes de AKT, de forma tal que pudiéramos observar si tal efecto se incrementaba cuando las proteínas BAG5 y Parkina eran transfectadas juntas. Como se muestra en la Figura 22D, panel superior, la expresión conjunta de BAG5 y Parkina tuvo un efecto mayor como promotores de la degradación de AKT (detectada con el anticuerpo contra HA) que la transfección independiente de cada una de estas proteínas, carriles 2 y 3 comparado con el carril 1, detectado por inmunoblot con el anticuerpo contra HA. La especificidad del efecto se confirmó por la expresión de la cinasa ERK, la cual no sufrió cambios a pesar de los cambios en la expresión de BAG5 y Parkina, sugiriendo la participación potencial de Parkina en la ubiquitinación y degradación de AKT que resulta de su interacción con BAG5.

**6. La fosforilación de BAG5, correlaciona con una reducción en la interacción con AKT.**

La serina/treonina cinasa AKT juega un papel central en la señalización río abajo de factores de crecimiento y otros estímulos celulares. Por otro lado, la degradación de AKT promovida por BAG5 fue particularmente eficiente precisamente en las condiciones en las que factores de crecimiento y otros estímulos estuvieron ausentes, lo que llamamos condiciones desestabilizantes de AKT que incluyeron además inhibidores de HSP90 y de síntesis de proteínas (Figura 20C-E). Esto nos sirvió de base para sugerir que la estimulación de AKT la protege de la degradación inducida por BAG5. Con el objetivo de conocer el papel que juegan los estímulos que comúnmente llevan a la activación de AKT, sobre la degradación de esta cinasa como consecuencia de su interacción con BAG5, evaluamos el efecto de BAG5 sobre la estabilidad de AKT en presencia de suero fetal bovino, mismo que contiene una mezcla de factores de crecimiento que activan la vía PI3K-AKT. Para ello incubamos células transfectadas con HA-AKT y cantidades crecientes de BAG5, en medio carente de suero fetal bovino (condiciones de ayuno) o bien en medio suplementado con suero fetal bovino al 10%. La sobreexpresión de BAG5 bajo condiciones de ayuno indujo un fuerte decremento en los niveles de AKT endógena y transfectada, como se había observado en experimentos previos; sin embargo, las condiciones de estímulo con suero fetal bovino (10%) previno la degradación de AKT inducida por BAG5, efecto que fue específico para AKT, ya que estuvo ausente para GSK-3β usado como control (Figura 23A). Esto sugiere que la activación de AKT bloquea el efecto desestabilizante promovido por BAG5.

Para determinar el efecto de la activación de AKT sobre la interacción AKT-BAG5, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación a partir de lisados de células HeLa que fueron cotransfectadas con HA-AKT y Myc-BAG5 y estimuladas con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). BAG5 se detectó por inmunoblot, usando un anticuerpo contra Myc, en el inmunoprecipitado de HA-AKT obtenido a partir de lisados de células no estimuladas, mientras que los lisados obtenidos de células estimuladas con HGF, la interacción se redujo significativamente (Figura 23B, panel izquierdo y

gráfica). El tratamiento con HGF indujo la activación de las cinasas AKT y ERK, demostrada por su respectiva fosforilación visualizada en los lisados celulares totales (Figura 23B, panel derecho). Consistente con esta observación, la interacción entre las proteínas endógenas se favorece en condiciones donde la activación de AKT en respuesta a HGF está parcialmente bloqueada (Figura 23C, IP BAG5, efecto de wortmanina). El bloqueo de la activación de AKT en respuesta a HGF se denota en los lisados celulares totales por la disminución en la fosforilación de AKT en Ser473 secundario al tratamiento con Wortmanina, un inhibidor de la PI3K (Figura 23C, lado derecho, parte inferior). Estos resultados permiten sugerir que la activación de AKT perturba la interacción AKT-BAG5.

Nuestros resultados indican que AKT interactúa con BAG5 en condiciones de reposo, no estimuladas o adversas de las células, en las que regularmente la actividad de AKT se encuentra inhibida por lo que tal interacción parece representar un mecanismo mediante el cual AKT es seleccionada para su degradación vía proteosoma. Un mecanismo probable que explique la disrupción de la interacción en condiciones de estimulación de la célula, es que BAG5 resulte fosforilado por AKT en respuesta al estímulo, lo cual induce un cambio conformacional que lleve a la separación o impida la unión de AKT. Esta hipótesis está fundamentada en que BAG5 se obtuvo a partir de un ensayo de doble híbrido en levaduras en el que se usó como carnada la mutante dominante negativa del dominio catalítico de AKT, el cual presenta mayor afinidad por substratos. Además, el análisis de la secuencia aminoacídica de BAG5 reveló la existencia un sitio consenso de fosforilación por AKT parcialmente conservado en la Thr152 (LR**K**A**R**YH**T**LT) que se encuentra en la región que mostró una mayor interacción con AKT, la región que nosotros denominamos *linker*. Para explorar esta posibilidad, células HEK293T transfectadas con vector vacío o Myc-BAG5 solo o junto con distintas construcciones de AKT, como se indica, se incubaron con fosfato marcado [$^{32}$P]Pi. Myc-BAG5 se inmunoprecipitó a partir de los lisados celulares de cada condición.

Como se muestra en la Figura 23C, la fosforilación de BAG5, evidenciada por autorradiografía, se observó en condiciones basales, es decir, donde no se sobreexpresaron variantes de AKT. Esta fosforilación se incrementó significativamente cuando BAG5 se coexpresó con la AKT silvestre y aún más con la AKT miristoilada (myr-AKT, construcción de AKT con actividad de cinasa constitutiva [281]), pero retornó a los valores basales cuando las células fueron transfectadas con la construcción dominante negativa de AKT (AKT-K179M). Estas observaciones colocan a BAG5 como un potencial substrato de AKT y soportan la hipótesis de que AKT interactúa con BAG5 en condiciones de quiescencia celular.

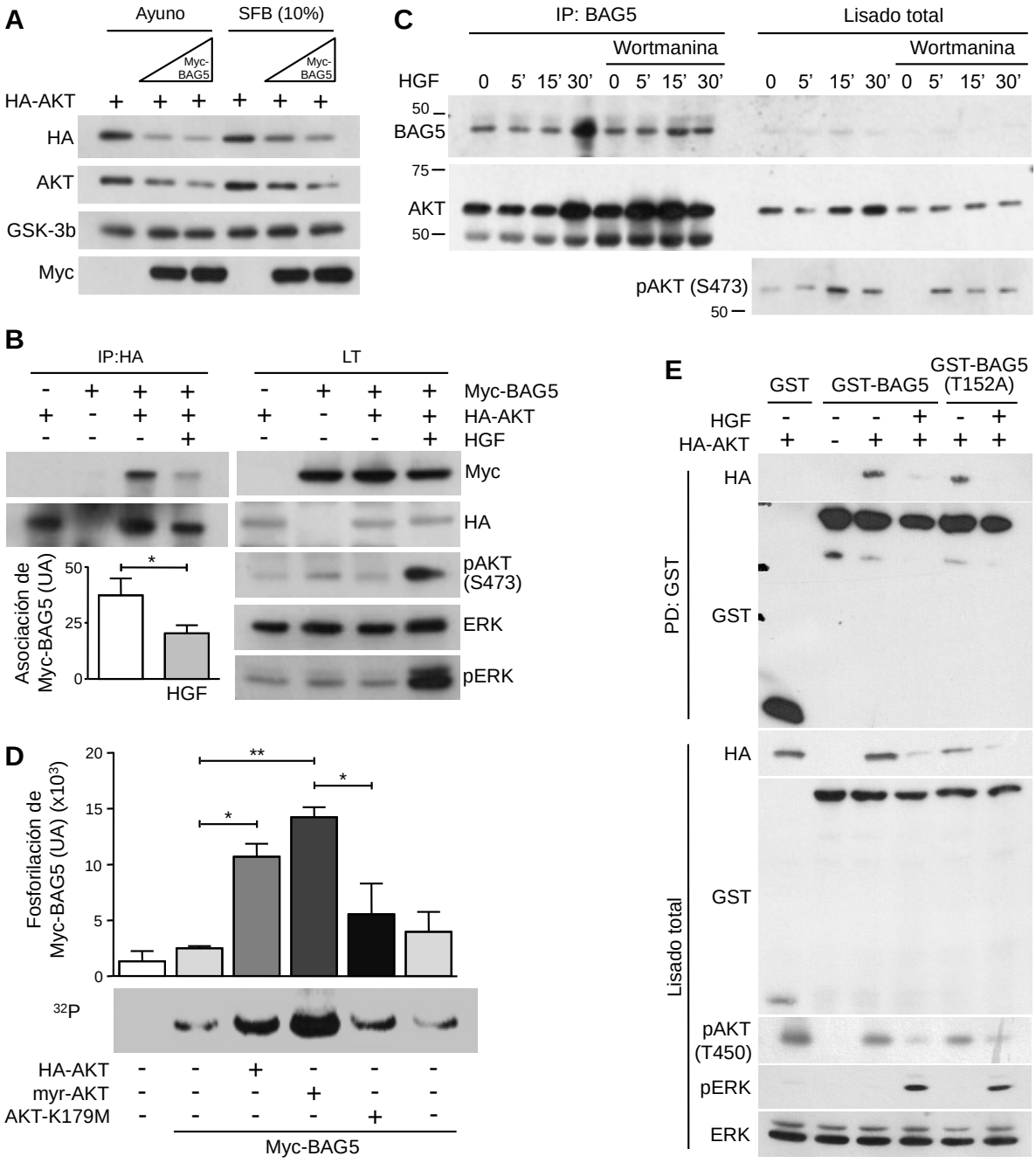



**Figura 23. La fosforilación de BAG5 y AKT correlaciona con una reducción en la interacción entre estas proteínas.** A) La degradación de AKT inducida por BAG5 ocurre preferencialmente bajo condiciones de ayuno de suero. Células HeLa fueron cotransfectadas con HA-AKT y cantidades crecientes de Myc-BAG5. Treinta y seis horas post-transfección las células se incubaron con medio libre de suero o medio suplementado con suero al 10% por 12 horas adicionales. La expresión de AKT, BAG5 y GSK-3β (usado como control) se analizó por inmunoblot en lisados celulares totales. B) La activación de AKT atenúa su interacción con BAG5. Los plásmidos HA-AKT, Myc-BAG5 o ambos fueron transfectados transitoriamente en

células HeLa, como se indica. Después de treinta y seis horas de transfección, las células fueron ayunadas de suero toda la noche y luego estimuladas o no con HGF durante 15 minutos, como se indica. La cinasa AKT fue inmunoprecipitada a partir de los lisados celulares totales usando el anticuerpo contra HA (IP: HA) y la interacción de BAG5 se detectó por inmunoblot usando un anticuerpo contra Myc. En los lisados celulares totales (LT), se confirmó la expresión de AKT y BAG5 usando los anticuerpos contra HA y contra Myc, respectivamente y el estado de activación de las cinasas AKT y ERK se detectó usando anticuerpos fosfo-específicos. La expresión de ERK sirvió como control de carga. El gráfico muestra los valores densitométricos del Myc-BAG5 asociado a AKT. Las barras representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, * $p<0.05$. UR, unidades relativas. C) La inhibición de la vía PI3K/AKT favorece la asociación entre AKT y BAG5 endógenas. La proteína BAG5 endógena se inmunoprecipitó a partir de células HeLa que fueron ayunadas de suero toda la noche y estimuladas con HGF (10ng/ml) en presencia o no de Wortmanina (300nM por 2 horas), como se indica. La cinasa AKT endógena asociada a BAG5 se detectó mediante inmunoblot usando un anticuerpo monoclonal contra AKT. En los lisados celulares totales se confirmó la expresión de BAG5, AKT, así como la fosforilación de AKT en Ser473 con un anticuerpo fosfoespecífico. D) La cinasa AKT fosforila a BAG5. Células HEK293T fueron transfectadas con Myc-BAG5 sólo o cotransfectado con una de las siguientes construcciones de AKT: HA-AKT (silvestre), myr-AKT (N-miristoilada, constitutivamente activa) o la AKT-K179M (mutante cinasa negativa). Veinticuatro horas después de la transfección, las células que estuvieron ayunadas de suero durante la noche fueron marcadas metabólicamente con ortofosfato $^{32}P$ durante 4 horas. La proteína BAG5 se aisló por inmunoprecipitación con el anticuerpo contra Myc y su fosforilación se detectó por autorradiografía. La gráfica muestra el análisis densitométrico de los niveles de fosforilación de BAG5 determinados en tres experimentos independientes. Las barras representan la media ± error estándar, * $p<0.05$, ** $p<0.01$. UA, unidades arbitrarias. E) La fosforilación de BAG5 en Thr152 no es suficiente para modular la interacción entre BAG5 y AKT. Células HEK293 transfectadas con HA-AKT y con GST sólo o con alguna de las construcciones de BAG5: GST-BAG5 (silvestre) o GST-BAG5-T152A (mutación en el sitio consenso de fosforilación por AKT) y estimuladas con HGF. Las diferentes construcciones de BAG5 se precipitaron por afinidad con perlas de glutatión sefarosa. La AKT asociada a BAG5 se detectó por inmunoblot usando un anticuerpo contra HA. La expresión de las proteínas transfectadas, así como la efectividad del estímulo, se confirmaron en los lisados celulares totales (LT), por inmunoblot empleando anticuerpos específicos, como se indica.

Con el objetivo de investigar si la fosforilación de BAG5 por AKT, en células estimuladas, contribuye a la disociación del complejo formado entre estas dos proteínas, se transfectaron células HEK293 con HA-AKT, BAG5 silvestre y un BAG5 mutado en el sitio consenso de fosforilación por AKT (T152A) y se estimularon con HGF. El BAG5 silvestre y el mutado en el sitio potencial de fosforilación por AKT (BAG5-T152A), se aislaron por afinidad con glutatión sefarosa y se detectó a la AKT asociada por inmunoblot con un anticuerpo

contra HA. En concordancia con experimentos previos, la estimulación con HGF, redujo la asociación entre BAG5 y AKT (Figura 23E, PD: GST, carril 4 comparado con el carril 3). Interesantemente, la estimulación con HGF, también redujo la asociación de AKT con la BAG5 mutante (T152A), sugiriendo que la fosforilación de BAG5 en la Thr152, señalado como el sitio probable de fosforilación por AKT, no es suficiente para controlar el mecanismo de separación de AKT en respuesta a estímulo (Figura 23E, PD: GST, carril 6 comparado con el carril 5). Estos datos permiten sugerir que la fosforilación de AKT misma pudiera estar vinculada a la dinámica de su interacción con BAG5.

**7. BAG5 modula la fosforilación de AKT y la migración celular dependiente de HGF.**

La cinasa AKT es considerada un elemento crucial en la señalización río abajo de diversos estímulos celulares. Además, se han identificado más de un centenar de substratos que le permiten desempeñar sus múltiples funciones que incluyen a la migración celular, entre otras. Para que AKT module la actividad de sus múltiples substratos es necesaria su activación, la cual se logra vía fosforilación en la Thr308 que se localiza en el dominio de cinasa y en la Ser473 que se encuentra en el dominio regulador carboxilo terminal.

*BAG5 inhibe la activación de AKT.*

Como un mecanismo alternativo a la acción desestabilizadora de AKT promovida por BAG5, exploramos su influencia sobre la actividad de AKT en respuesta a estímulos fisiológicos, con la hipótesis de que BAG5 puede también regular la activación de AKT y la migración celular en condiciones en las que la estabilidad de AKT no se encuentre comprometida. Para lo cual evaluamos el efecto de BAG5 sobre la fosforilación de AKT en Ser473 y en la migración celular en los ensayos de cierre de herida y quimiotaxis. Primeramente estudiamos el efecto de atenuar o incrementar la expresión de BAG5 sobre la fosforilación de AKT en Ser473. Al igual que el efecto observado en la

estabilidad de AKT, la fosforilación de esta cinasa aumentó al atenuar los niveles de BAG5 con el uso del shBAG5, y disminuyó con la expresión de cantidades crecientes de Myc-BAG5 (Figura 24A).

Con el objetivo de evaluar el efecto anterior en células estimuladas con HGF, empleamos células HeLa transfectadas con una cantidad de HA-BAG5 que no afectara la estabilidad de AKT. Las células fueron estimuladas con dosis crecientes de HGF para el posterior análisis del estado de fosforilación de AKT y ERK, usado como control. La fosforilación de AKT en Ser473 fue estimulada por HGF de manera dosis dependiente y dicha fosforilación se inhibió conforme se expresaban cantidades mayores de HA-BAG5, que no indujeron cambios en la expresión de la AKT total (Figura 24B). El efecto de BAG5 fue específico de la cinasa AKT pues la fosforilación de ERK no resultó alterada (Figura 24B).

*BAG5 disminuye la migración celular en respuesta a HGF.*

El complejo proceso de migración celular, evento fundamental en la formación de vasos sanguíneos, involucra la activación de AKT [95, 119]. Para determinar la influencia de BAG5 sobre la migración celular que depende de la activación de AKT, realizamos experimentos de cierre de herida y quimiotaxis. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con la proteína verde fluorescente (EGFP) o con BAG5 fusionada a la proteína verde fluorescente (EGFP-BAG5) para la realización del ensayo de cierre de herida y con Myc-BAG5 para analizar la quimiotaxis en cámaras de Boyden. BAG5 redujo significativamente la migración de células HeLa en respuesta a HGF, detectado por la migración de las células marcadas con BAG5 fluorescente hacia el área denudada (Figura 24C), o bien por la disminución observada en la migración quimiotáctica inducida por HGF en cámaras de Boyden (Figura 24D). Las células estimuladas con suero fetal bovino (SFB) mostraron la misma tendencia, aunque no la diferencia no fue estadísticamente significativa.

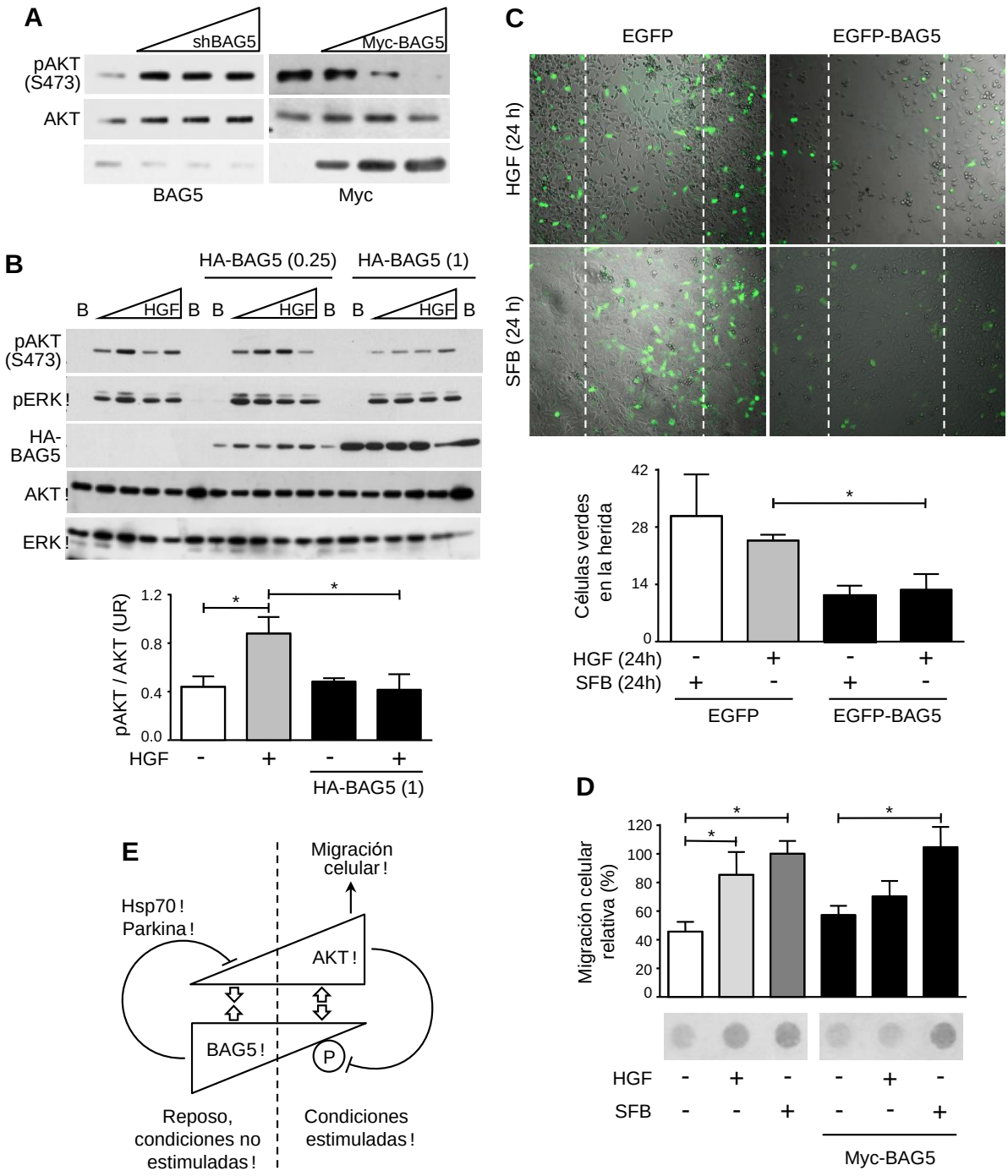



**Figura 24. BAG5 modula la activación de AKT y la migración celular dependiente de HGF.** A) La expresión de BAG5 correlaciona con la activación de AKT en condiciones en que la estabilidad de AKT no está afectada. En los lisados totales de células HeLa transfectadas con cantidades crecientes de shRNA-BAG5 o Myc-BAG5 se detectó la activación de AKT por medio de inmunoblot con el anticuerpo específico para la fosforilación en Ser473 de AKT. La expresión de AKT total así como BAG5 endógeno y transfectado (Myc-BAG5) se confirmaron por inmunoblot en las mismas muestras, como se indica. B) BAG5 atenúa la activación de AKT en

respuesta a HGF. Células HeLa transfectadas con vector control y bajas (0.25μg) o altas (1μg) cantidades de HA-BAG5 fueron ayunadas de suero por 12 horas y estimuladas con cantidades crecientes de HGF durante 15 minutos. La activación de AKT y ERK se detectó por inmunoblot, empleando anticuerpos fosfo-específicos y la expresión de AKT y ERK total se confirmó usando anticuerpos que detectan la proteína endógena, La expresión de BAG5 transfectado se detectó con el anticuerpo contra HA. C) BAG5 disminuye la migración celular dependiente de HGF. Células HeLa transitoriamente transfectadas con EGFP o EGFP-BAG5 se sometieron a un ensayo de cierre de herida en presencia de Mitomicina C. Las células fluorescentes que migraron hacia el área denudada se analizaron con microscopía de fluorescencia 24 horas después de la incubación con HGF o suero fetal bovino al 10% (SFB). Las líneas discontinuas representan el borde de la herida a tiempo 0. El gráfico representa del número de células fluorescentes que migraron hacia el área denudada, de tres experimentos independientes, * $p<0.05$. D) BAG5 reduce la quimiotaxis dependiente de HGF. Células HeLa transfectadas con BAG5 y plásmido control se sometieron a un ensayo de quimiotaxis en cámaras de Boyden. La quimiotaxis se estimuló con HGF o suero fetal bovino (SFB) al 10% durante 6 horas, como se indica. Las células que migraron se fijaron, tiñeron y escaneadas para su análisis densitométrico. La gráfica muestra la migración celular relativa, las barras representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes, * $p<0.05$. Los insertos debajo de la gráfica muestran un resultado representativo. E) Modelo que representa el mecanismo propuesto de regulación de AKT por BAG5. En condiciones de ayuno AKT interacciona con BAG5 resultando en un decremento de la función y estabilidad de AKT, como parte de un mecanismo que involucra a Parkina y Hsp70. Cuando la vía de señalización de AKT es estimulada, la interacción entre AKT y BAG5 disminuye, consistente con la fosforilación de BAG5 dependiente de AKT.

Basados en nuestros descubrimientos nosotros proponemos un mecanismo de regulación recíproco entre AKT y BAG5 (Figura 24E). BAG5 interactúa con AKT en condiciones no estimuladas, de reposo celular, en el que el estado nutricional se vuelve crítico, seleccionado a AKT para su ubiquitinación y degradación vía proteosoma por un mecanismo dependiente de la chaperona Hsp70 y la ligasa de ubiquitina Parkina. Inversamente, en condiciones de estimulación celular, donde AKT es activada para el control de múltiples procesos que incluyen la migración celular, la regulación negativa de AKT dependiente de BAG5 no se presenta por un mecanismo de fosforilación de BAG5 dependiente de AKT y fosforilación de la cinasa misma, lo que promueve la separación de BAG5 (Figura 24E). Este modelo de regulación recíproca

depende de los niveles de expresión de BAG5, el cual puede regular tanto la degradación como la activación de AKT independientemente de su estabilidad.

## B. Interacción mTOR-GRp58.

La cinasa mTOR, al igual que AKT, es un componente clave de la señalización a factores angiogénicos regulando procesos que incluyen la migración celular, crecimiento, proliferación y metabolismo, cuya desregulación favorece estados patológicos de gran impacto como el cáncer. Esta cinasa está fuertemente ligada a la acción de AKT, ya sea como regulador directo río arriba, promoviendo su estabilidad y activación (mediadas por la fosforilación en Thr450 y Ser473, respectivamente, efectuada por mTORC2) o como efector río abajo, promoviendo la activación de mTORC1 (inhibición de sus reguladores negativos PRAS40 y TSC2) (Fig. 7). La interacción entre la chaperona considerada sensor del estado redox GRp58 y la cinasa mTOR fue identificada en nuestro laboratorio como un regulador del ensamble del complejo 1 de mTOR [180]. Además, se demostró la interacción entre las proteínas endógenas en diferentes líneas celulares y que diversas condiciones que llevan a la activación de mTOR, como la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento, no comprometen la estabilidad de la interacción. En el presente trabajo nos propusimos evaluar el efecto de la interacción GRp58-mTOR en la actividad de la cinasa mTOR.

### 1. La interacción entre mTOR y GRp58 disminuye en condiciones oxidantes.

Conociendo que la Rapamicina inhibe diferencialmente a los complejos de mTOR dependiendo del tiempo de tratamiento (mTORC1 con tratamientos agudos y mTORC2 con tratamientos crónicos), investigamos el efecto a corto y largo plazo de la Rapamicina en la interacción entre mTOR y GRp58. Como se muestra en la Figura 25A, la incubación con Rapamicina a corto tiempo (1 hora) no afectó la interacción entre mTOR y GRp58, pero sí fue capaz de inhibir la

actividad de mTORC1 (revelado por la reducción en la fosforilación de sus sustratos pS6K y p4E-BP1) sin afectar a mTORC2 (revelado por la fosforilación de su sustrato directo AKT en Ser473), confirmando que a corto tiempo es un inhibidor específico contra mTORC1. Además, no causó cambios en la asociación de Raptor y Rictor a mTOR (Figura 25B y C, respectivamente). El tratamiento crónico con Rapamicina (24 horas) disminuyó la fosforilación de los sustratos de ambos complejos (Figura 25A), y la asociación de Raptor y Rictor (Figura 25B y C). Además, también causó una reducción en la interacción de mTOR con GRp58, aunque no en un grado significativo.

Puesto que mTOR es activado en respuesta a agentes oxidantes como PAO (Phenylarsine oxide) [181] y que GRp58 es una chaperona sensible al estado redox, evaluamos si las condiciones oxidantes afectan la interacción entre mTOR y GRp58. El agente oxidante PAO produce una reducción significativa en la interacción entre mTOR y GRp58 (Fig. 21A) y consistente en concordancia con reportes previos también reduce la asociación de Raptor y mTOR [181] (Fig. 21B); pero, interesantemente, no afectó la interacción entre Rictor y mTOR (Fig. 21C). Consistente con estos hallazgos, PAO exhibió un efecto estimulante sobre mTORC1, promoviendo la fosforilación de S6K y 4E-BP1, que concuerda con la reducción en la asociación de mTOR a su inhibidor Raptor. Además, no indujo la fosforilación de AKT en Ser473, denotando ausencia de efecto sobre mTORC2.

**2. Los cambios en la expresión de GRp58 afectan la actividad del complejo 1 de mTOR pero no del complejo 2 de mTOR.**

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que GRp58 favorece el ensamble e interactúa preferencialmente con el complejo 1 de mTOR. Además, los resultados anteriores confirman los hallazgos de Sarbassov y colaboradores, en los que las condiciones oxidantes afectan la interacción entre mTOR y Raptor, componente determinante de mTORC1 [181]. Esto sugiere que GRp58 afecta preferiblemente la actividad de mTORC1. Para probar esta posibilidad atenuamos la expresión o sobreexpresamos a GRp58 y evaluamos

la fosforilación de 4E-BP1 y p70S6K, sustratos río abajo de mTORC1 [282] y de AKT en Ser473 y Thr450, sitios de fosforilación reconocidos para mTORC2 [125, 127, 193, 283], así como de S6 y GSK-3β, sustratos de S6K y AKT, que denotan la actividad de mTORC1 y mTORC2 respectivamente.

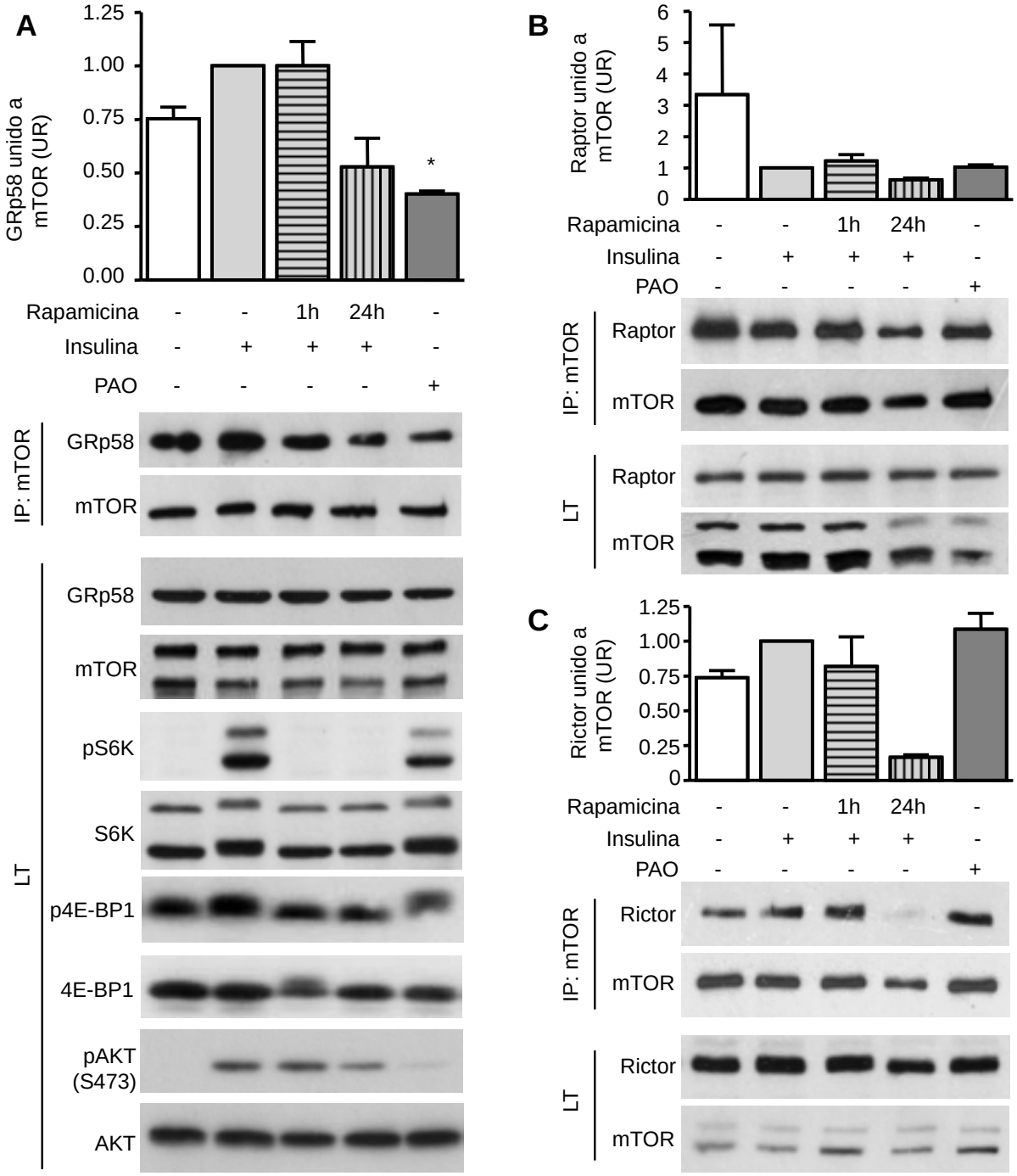



**Figura 25. La interacción entre mTOR y GRp58 disminuye en condiciones oxidantes.** A) La interacción entre mTOR y GRp58 disminuye con el agente oxidante PAO y no fue sensible a la Rapamicina. Células HEK293 se incubaron con Rapamicina (20 ng/ml) por 1 o 24 horas y posteriormente se estimularon con PAO (5μM por 30 minutos) e Insulina (100nM por 15 minutos), como se indica. La cinasa mTOR fue inmunoprecipitada a partir de lisados totales preparados en buffer CHAPS y la GRp58 asociada y mTOR se detectaron por inmunoblot con

anticuerpos específicos. A partir de los lisados celulares totales del mismo experimento se detectó, por inmunoblot, la presencia de GRp58, mTOR o las proteínas indicadas y sus correspondientes formas fosforiladas. La gráfica representa la media ± error estándar de los valores densitométricos de GRp58 asociado a mTOR de cuatro experimentos independientes, * $p<0.05$. B, C) Experimentos equivalentes se realizaron para evaluar el efecto de PAO o Rapamicina sobre la interacción entre Raptor y mTOR (B) o entre Rictor y mTOR (C), usando los anticuerpos específicos indicados.

Como se muestra en la Figura 26A, la disminución de los niveles de GRp58 con el shGRp58, reduce significativamente la fosforilación de 4E-BP1 y S6K en respuesta a Insulina, en tanto que la fosforilación de S6 (Figura 26B) mostró una reducción ligera. Como esperábamos, la actividad de mTORC2 no se vio afectada, lo cual quedó revelado por la fosforilación de AKT en Ser473 y en Thr450 (Figura 26C), así como del sustrato de AKT, GSK-3β (Figura 26D). La fosforilación de la cinasa mTOR (Figura 26E), así como la cinasa ERK (Figura 26F), que representa una vía de señalización paralela que se activa en respuesta a Insulina, no mostraron cambios. La reducción significativa en la expresión de GRp58 (Figura 26G), no ocasionó cambios en la expresión de las distintas proteínas evaluadas en su formas totales (Figura 26A-G).

Contrariamente al efecto encontrado con el knockdown de GRp58, su sobreexpresión, visualizada con un anticuerpo contra la proteína endógena (Figura 27G), incrementó la fosforilación basal de 4E-BP1, S6K y S6, sustratos de mTORC1 en tanto que la estimulación con insulina no produjo un incremento en la fosforilación máxima (Figura 27A y B). Consistente con los resultados previos, la sobreexpresión de GRp58 no afectó la actividad de mTORC2, manifestado por la falta de efecto sobre la fosforilación basal, o secundaria a la estimulación con insulina, de AKT en Ser473, Thr450 y de GSK-3β. La fosforilación basal o en respuesta a insulina de las cinasas mTOR y ERK, no se vio afectada por la sobreexpresión de GRp58 (Figura 27E y F) y no se presentaron cambios en la expresión total de las proteínas (Figura 27A-G).

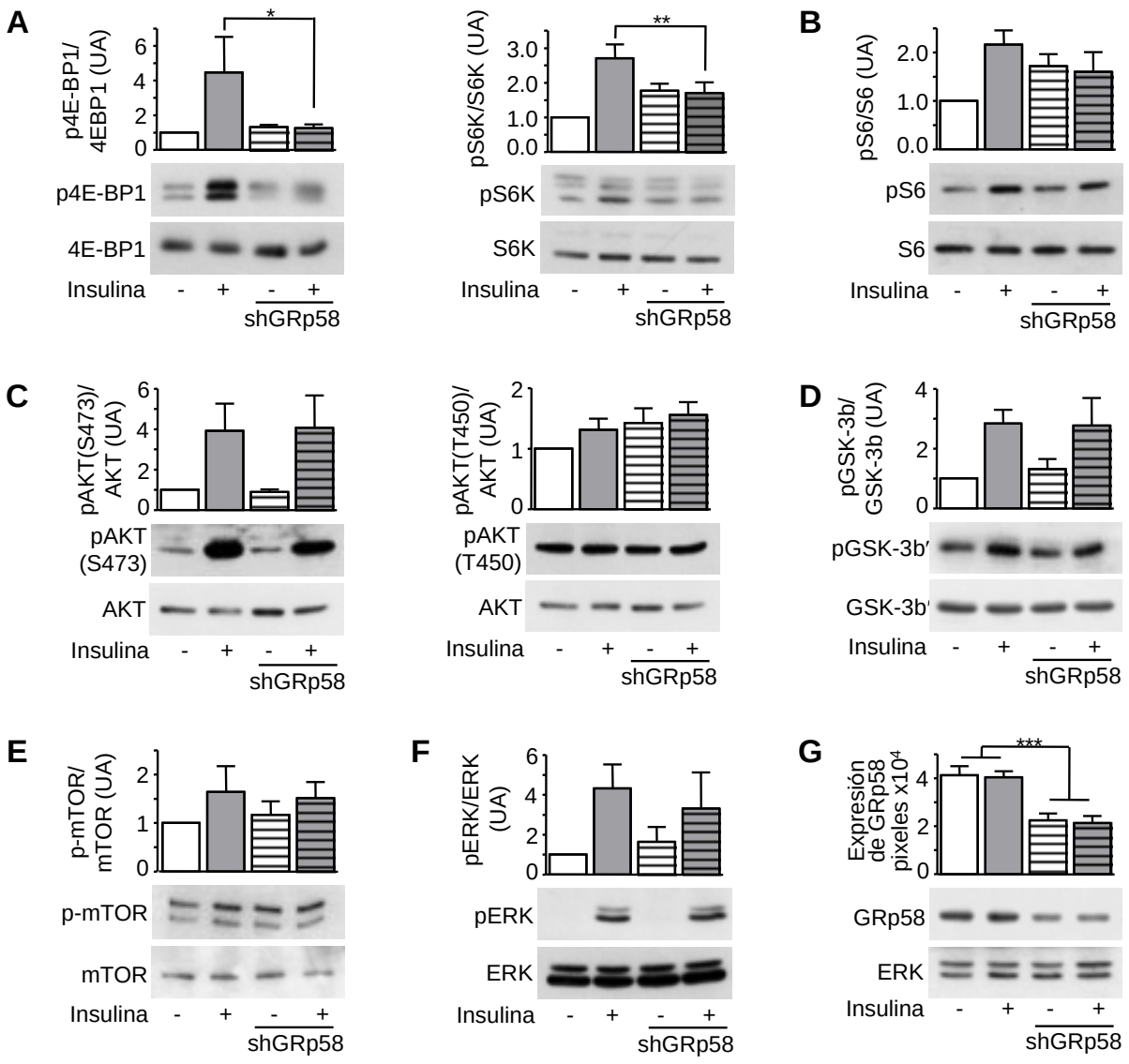



**Figura 26. El complejo 1 de mTOR disminuye su señalización cuando se atenúa la expresión de GRp58.** Células HEK293 fueron transfectadas con un plásmido control o el shRNA para GRp58 y seleccionadas con puromicina durante 7 días, para obtener una reducción significante en los niveles proteicos de GRp58. Las células se ayunaron de suero durante 12 horas para posteriormente estimularse con Insulina (50nM) durante 5 minutos, como se indica. A-D) La reducción de los niveles de GRp58 disminuyen la señalización de sustratos de mTORC1, pero no de mTORC2. Efecto del Knockdown de GRp58 sobre la fosforilación, en respuesta a Insulina, de los sustratos de mTORC1, 4E-BP1 y S6K (A) y la fosforilación de S6 (B), sustrato de S6K que representa la señalización del complejo 1 de mTOR. La señalización de mTORC2, determinada por la fosforilación de AKT en Ser473 y en Thr450 (C), como se indica y GSK-3β, sustrato de AKT, representante de la señalización del complejo 2 de mTOR (D). Efecto sobre la fosforilación de mTOR (E) y ERK (F), usado como control. G) Expresión endógena de GRp58, control del knockdown de GRp58; la expresión de ERK endógena se usó como control. Se muestran blots representativos de las proteínas indicadas en su forma fosforilada y total. Las gráficas representan la media ± error estándar de los valores

densitométricos (cociente de la forma fosforilada y total) de tres a ocho experimentos independientes. * p<0.05, ** p<0.01. UA, unidades arbitrarias.

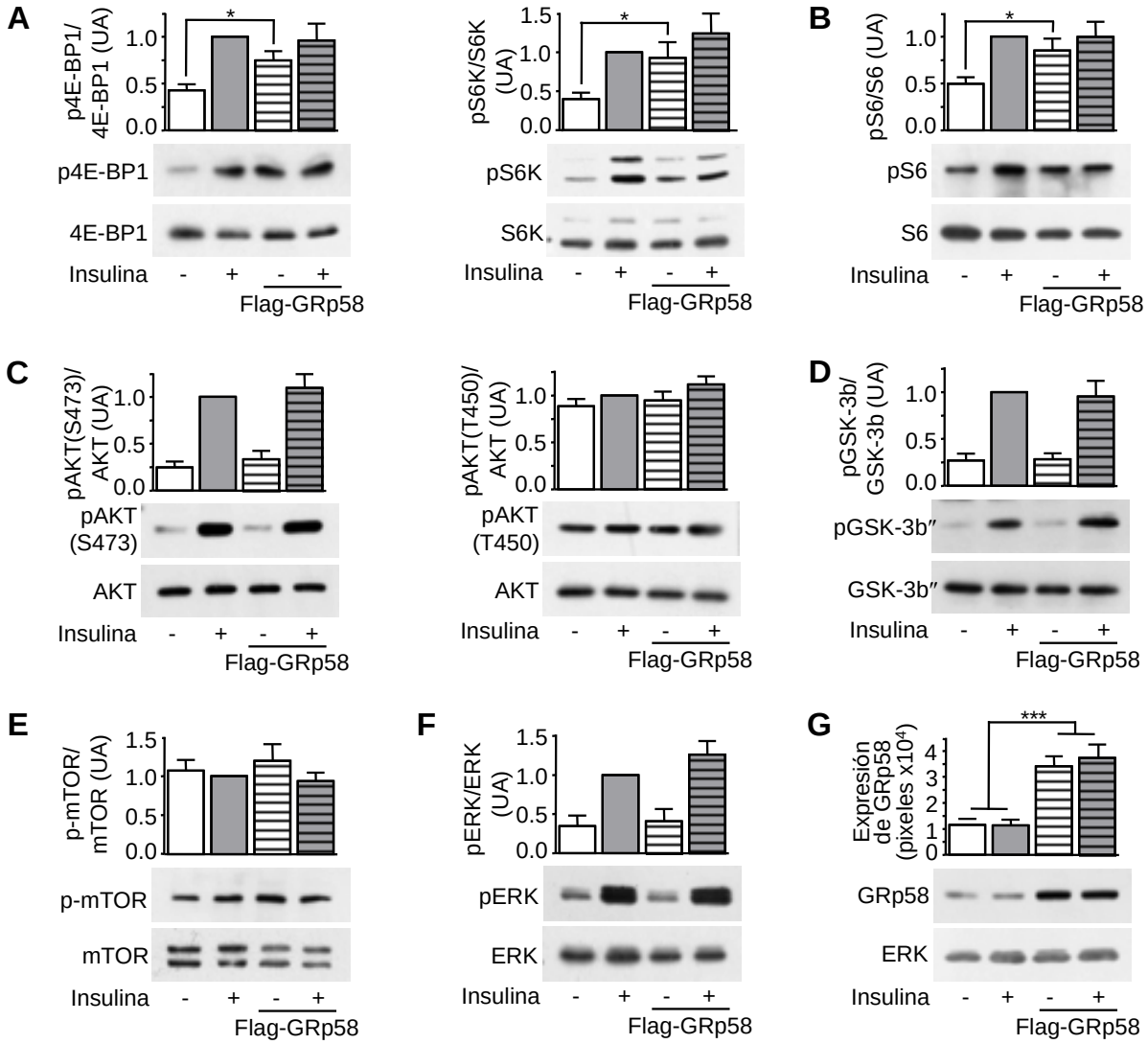



**Figura 27. El complejo 1 de mTOR incrementa su señalización con la sobreexpresión de GRp58.** Células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido control o 3xFlag-GRp58. Dos días después de la transfección las células se ayunaron de suero durante 12 horas y posteriormente se estimularon con Insulina (50nM) durante 5 minutos, como se indica. Los experimentos se analizaron por inmunoblot, usando anticuerpos para la forma fosforilada y total de sustratos de mTORC1 (A, 4E-BP1 y S6K) y mTORC2 (C, AKT Ser473 y Thr450), como se indica. S6 (B) y GSK-3β (D), son sustratos de S6K y AKT y representan, de forma indirecta, la activación de mTORC1 y mTORC2, respectivamente. Se muestra el efecto de la sobreexpresión de GRp58 sobre la fosforilación de mTOR (E) y ERK (F), usado como control, así como la sobreexpresión GRp58, que se detectó con un anticuerpo monoclonal contra la proteína endógena. Los insertos corresponden a blots representativos de las proteínas indicadas en su forma fosforilada y total. Las gráficas representan la media ± error estándar de los valores densitométricos (cociente de la forma fosforilada y total) de diez a trece experimentos independientes. * p<0.05, *** p<0.001. UA, unidades arbitrarias.

Consistente con los resultados obtenidos, la sobreexpresión de GRp58 incrementa la proliferación celular basal, mientras que la atenuación de su expresión, disminuye la proliferación en respuesta a insulina o suero fetal bovino [180].

Adicionalmente, el incremento en la señalización de mTORC1 debido a la sobreexpresión de GRp58 fue sensible al tratamiento agudo con Rapamicina, revelado por la disminución en la fosforilación basal de 4E-BP1 y S6K (Figura 28A), que previamente se había incrementado por la sobreexpresión de GRp58 (Figura 28B).

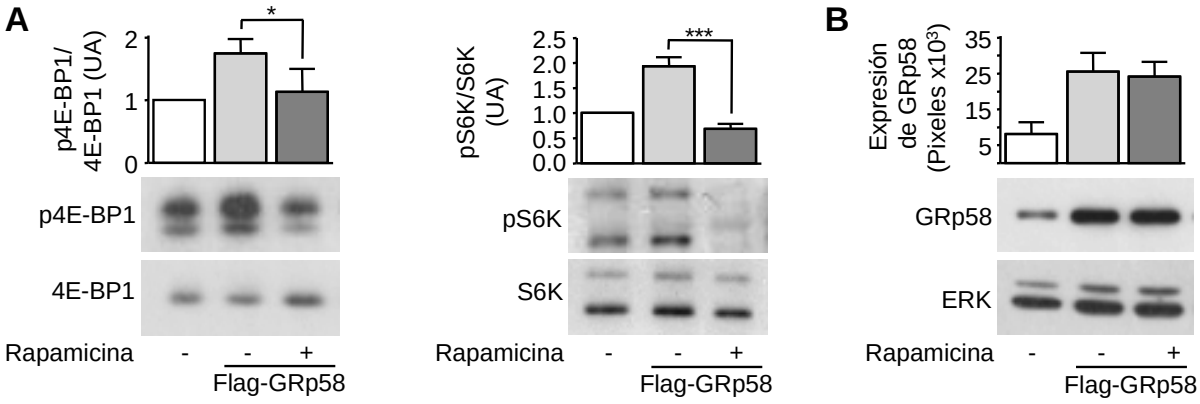



**Figura 28. El incremento en la señalización de mTORC1 debido a la sobreexpresión de GRp58 es sensible a Rapamicina.** Células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido control o 3xFlag-GRp58. Dos días después de la transfección las células se incubaron con Rapamicina (20ng/ml) durante 1 hora y la fosforilación de los sustratos de mTORC1 se determinó por inmunoblot usando anticuerpos contra las formas fosforilada y total de 4E-BP1 y S6K (A). La sobreexpresión de GRp58 se detectó con un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína endógena; la cinasa ERK se usó como control (B). Se muestran inmunoblots representativos de las proteínas indicadas en su forma fosforilada y total. Las gráficas representan la media ± error estándar de los valores densitométricos (cociente de la forma fosforilada y total) de tres (4E-BP1) y cuatro (S6K) experimentos independientes. * $p<0.05$, *** $p<0.001$. UA, unidades arbitrarias.

**3. La proteína GRp58 es requerida para la señalización del complejo 1 de mTOR en respuesta al agente oxidante PAO.**

Considerando que las condiciones oxidantes promueven la activación del complejo 1 de mTOR y que disminuyen la interacción entre mTOR y GRp58 (Figura 25A), evaluamos el papel de GRp58 en el mecanismo oxidante que activa a mTORC1. Inicialmente, confirmamos el efecto del agente oxidante PAO en la señalización de mTORC1, demostrando que promueve la fosforilación de S6K, S6 y 4E-BP1 de manera dependiente del tiempo y concentración, sin afectar la actividad de mTORC2, demostrado por su carencia de efecto sobre la fosforilación de AKT (Figura 29A y B). La participación de GRp58 como un sensor de las condiciones oxidantes que llevan a la activación de mTORC1, se probó atenuando la expresión de GRp58 por medio de un shRNA y estimulando a las células con el agente oxidante PAO.

La disminución de los niveles de GRp58, redujo de manera significativa la fosforilación de S6K y S6 en respuesta a PAO (Figura 29C y D), mientras que la fosforilación de 4E-BP1 mantuvo la tendencia de reducción de su fosforilación, aunque sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa comparada con el efecto en las células controles (Figura 29E). El agente oxidante PAO promovió la fosforilación de ERK por un mecanismo que no fue afectado por la atenuación de los niveles de GRp58 (Figura 29F). En congruencia con los resultados mostrados en la Figura 29A y B, el agente oxidante PAO no promovió la fosforilación de AKT en Ser473 en las células knockdown de GRp58 (Figura 29G). La reducción en los niveles proteicos de GRp58, que fue significativa (Figura 29H) no ocasionó cambios en la expresión total de ERK o de las otras proteínas evaluadas. Estos resultados permiten sugerir que GRp58 actúa como un sensor que facilita la habilidad del complejo 1 de mTOR para ser activado por agentes oxidantes.

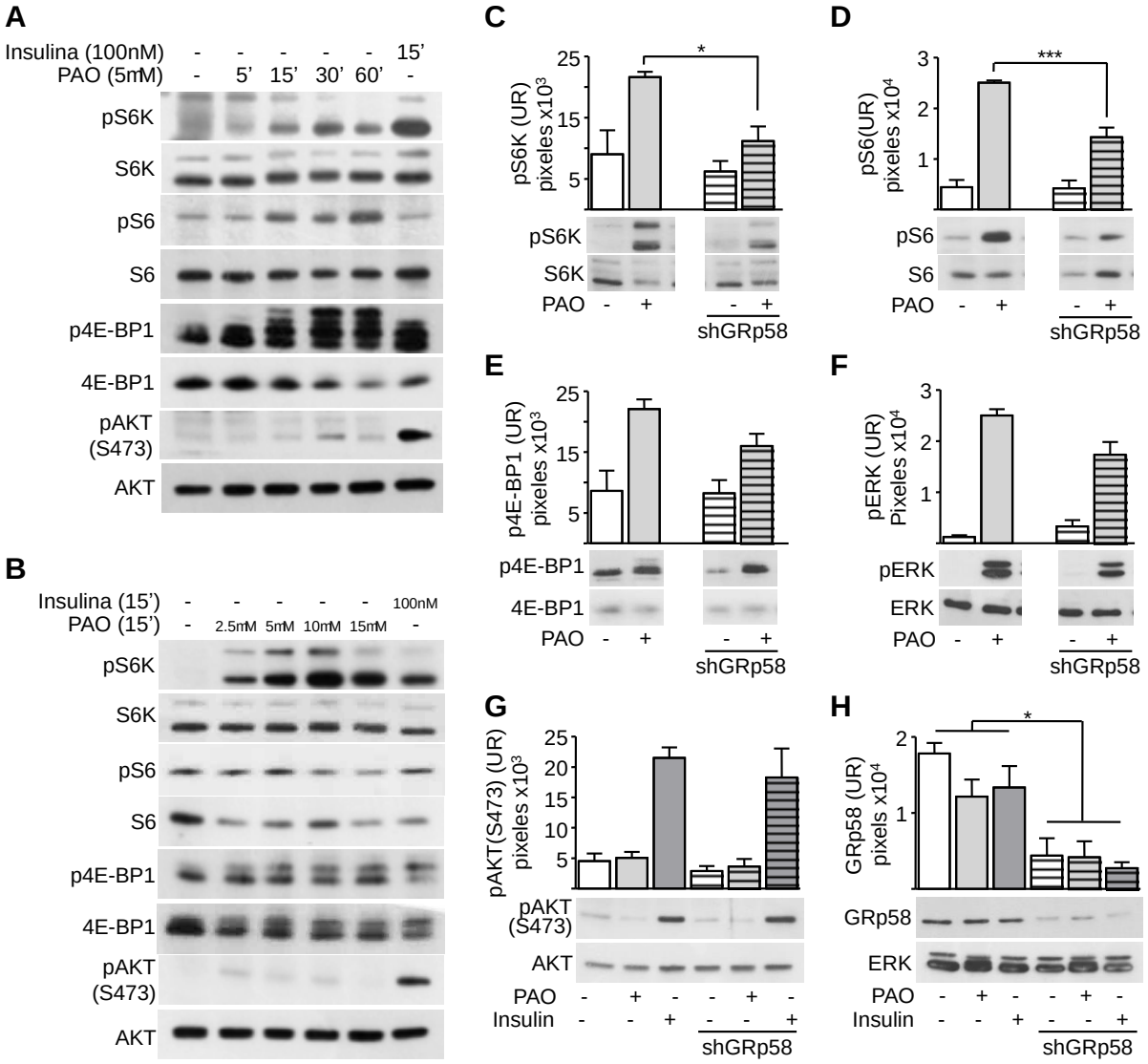



**Figura 29. GRp58 es requerido para la señalización del complejo 1 de mTOR en respuesta al agente oxidante PAO**. A, B) El agente oxidante PAO promueve la activación de mTORC1, pero no de mTORC2, de manera dependiente del tiempo y la concentración. Células HEK293 fueron estimuladas por los tiempos y concentraciones indicados de PAO e Insulina, usada como control positivo. La fosforilación de S6K, S6 y 4E-BP1, indicativas de la activación de mTORC1 y la fosforilación de AKT en Ser473, indicativa de la activación de mTORC2, se comprobaron por inmunoblot, usando anticuerpos fosfo-específicos, así como también para la expresión total usando anticuerpos específicos. C-H) La reducción en la expresión de GRp58 disminuye la activación de mTORC1 en repuesta al agente oxidante PAO. Se realizaron experimentos equivalentes en células HEK293 transfectadas con el shRNA para GRp58. La actividad de mTORC1 (C-E), de mTORC2 (G) o ERK (F) se detectaron por inmunoblot con anticuerpos específicos. H) Expresión endógena de GRp58, usada como control del Knockdown y la expresión de ERK endógena se usó como control. Se muestran blots representativos de las proteínas indicadas en su forma fosforilada y total. Las gráficas representan la media ± error

estándar de los valores densitométricos (cociente de la forma fosforilada y total) de tres a ocho experimentos independientes. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. UA, unidades arbitrarias.

Colectivamente nuestros resultados muestran que la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está fuertemente regulada por chaperonas moleculares bajo condiciones de estrés celular. La cinasa AKT regulada por la co-chaperona BAG5 vía Hsp70 y Parkina, en condiciones de estrés nutricional, y la cinasa mTOR regulada por la chaperona GRp58, en condiciones de estrés oxidativo. En este sentido, sin perder de vista que ambas cinasas están sujetas a regulación recíproca, la regulación de la cinasa AKT por BAG5, consecuentemente modula la actividad de mTORC1, que está principalmente regulada río arriba por AKT. A su vez mTORC1, que es regulada por GRp58, modula la activación de AKT a través de regular la acción de PI3K y consecuentemente de mTORC2, que es reconocido por sus acciones estabilizadoras y activadoras de AKT.

Nuestro estudio revela que las chaperonas moleculares cumplen un papel clave en la regulación de las cinasas AKT y mTOR, en el contexto de la migración y proliferación celular bajo condiciones de estrés celular.

# IX. Discusión.

El papel de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR en diversos procesos fisiológicos como la angiogénesis y en diversas patologías como el cáncer, diabetes mellitus y obesidad, entre otras, está bien consolidado. Además, su importancia como blanco terapéutico se ha confirmado en diversos estudios clínicos en pacientes con cáncer, en los cuales esta vía se encuentra frecuentemente exacerbada [284]. Nuestros hallazgos revelan novedosos mecanismos de regulación de la vía PI3K-AKT-mTOR, a través de influir en la estabilidad de AKT y en la actividad del complejo 1 de mTOR.

Nosotros planteamos un modelo en el cual la vía PI3K-AKT-mTOR es regulada por chaperonas moleculares, dependiendo de la disponibilidad de factores de crecimiento y las condiciones de estrés a que estén sujetas las células. De acuerdo a nuestro modelo, en condiciones de ayuno la cinasa AKT es degradada como consecuencia de su interacción con la co-chaperona BAG5 (*Bcl-2-associated athanogene 5*). En esta situación, AKT resulta ubiquitinada con la participación de la chaperona molecular Hsp70 y la ligasa E3 Parkina. En tanto que en condiciones de estrés oxidativo, el complejo 1 de mTOR es regulado por su interacción con GRp58 (*Glucose-regulated protein 58 kDa*), una chaperona molecular sensible al estado redox celular (Figura 30).

## A. Interacción AKT-BAG5.

### 1. Identificación de BAG5 como una proteína de unión a AKT.

En el sistema de doble híbrido en levaduras se identificaron diversas proteínas con afinidad por AKT. Destacó BAG5 porque pertenece a un grupo conocido por su capacidad para modular la conformación y estabilidad de otras proteínas. Además, las proteínas de la familia BAG, están involucradas en la sobrevivencia celular, función en la que AKT tiene una participación ampliamente reconocida.

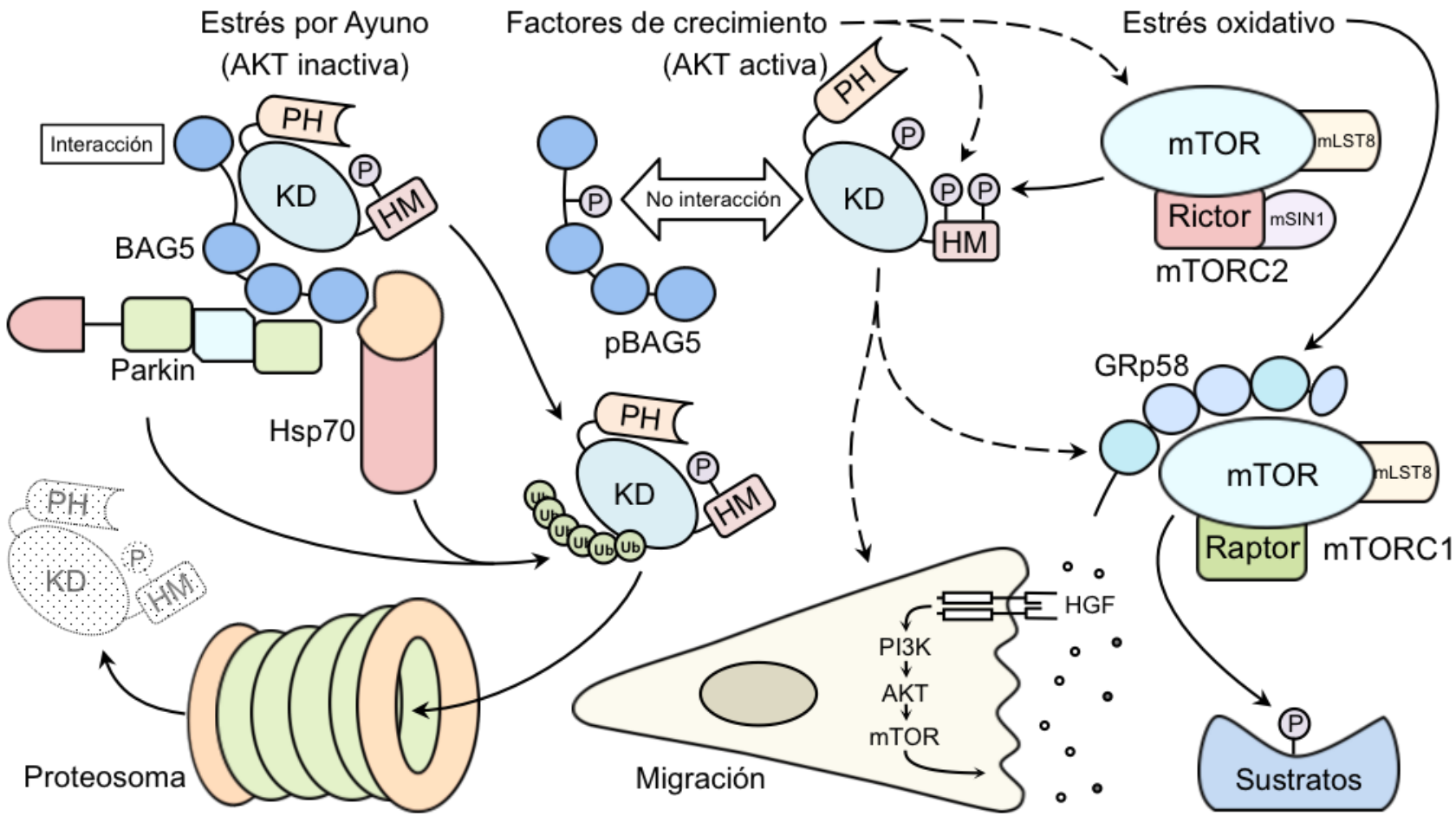

Estrés por Ayuno
(AKT inactiva)
Factores de crecimiento
(AKT activa)
Estrés oxidativo
Interacción
PH
KD
P
HM
BAG5
Parkin
Hsp70
No interacción
pBAG5
mTOR
mLST8
Rictor
mSIN1
mTORC2
GRp58
Raptor
mTORC1
Ub
Proteosoma
Migración
HGF
PI3K
AKT
mTOR
Sustratos

**Figura 30. Papel de BAG5 y GRp58 como reguladores de la vía PI3K-AKT-mTOR.** El modelo propuesto, en base a nuestros resultados, considera que las proteínas BAG5y GRp58 modulan funciones celulares básicas que dependen de la vía PI3K-AKT-mTOR y tal efecto responde a variaciones en las condiciones nutricionales y el estrés oxidativo. En términos generales, las células se exponen a diferentes situaciones que generan estrés, tales como la ausencia de nutrientes, el ambiente oxidativo y numerosas condiciones patológicas, que resultan en la disminución de la síntesis proteica e incremento en la degradación de proteínas, entre otras. Las células responden al estrés activando vías de sobrevivencia o iniciando el proceso apoptótico. La vía PI3K-AKT-mTOR es un relevo importante para la adaptación al estrés celular. Nosotros describimos mecanismos de regulación de la vía PI3K-AKT-mTOR que podrían ayudar a amortiguar las consecuencias del estado de estrés generado por el déficit nutrimental y las alteraciones en el equilibrio óxido reducción, a través de proteínas que interactúan con componentes clave de la vía. Bajo condiciones de ayuno, AKT interacciona con BAG5 resultando en una disminución de la activación y estabilidad de AKT, la cual es ubiquitinada y llevada a degradación como parte de un mecanismo que involucra a ligasa de ubiquitina Parkina y a la chaperona molecular Hsp70. La activación de AKT, mediada en parte por el complejo 2 de mTOR (mTORC2), en respuesta a factores de crecimiento, ocasiona la disociación de BAG5, el cual resulta fosforilado. Esto permite que AKT se estabilice y fosforile efectores río abajo que promuevan funciones claves como la migración celular. La activación consecuente del complejo 1 de mTOR (mTORC1) es facilitada por la chaperona molecular GRp58, la cual interacciona con ambos complejos de mTOR, pero provee sólo a mTORC1, de un mecanismo detector de factores de crecimiento y del ambiente oxidativo celular. En conjunto, estos mecanismos podrían facilitar la detección de señales de estrés celular generadas fisiológicamente, por ejemplo durante el envejecimiento, o asociadas a patologías en las que la vía PI3K-AKT-mTOR está implicada, tales como el cáncer y la diabetes, y responder regulando el umbral apoptótico en condiciones de ayuno prolongado por la interacción AKT-BAG5 y la actividad de mTORC1 en condiciones de estrés oxidativo a través de la interacción mTOR-GRp58. Ub, ubiquitina.

Nosotros encontramos que BAG5 interacciona con el dominio de cinasa de AKT, cuya especificidad es por residuos de serina/treonina. La proteína BAG5 interacciona con AKT a través de una región interna que contiene un dominio BAG “corto” (Figura 18E) [240]. Esto fue especialmente relevante, pues se ha demostrado que BAG5 interactúa con la chaperona molecular Hsp70 en el dominio BAG del extremo carboxilo terminal [245] dejando la mayor parte de la estructura de BAG5 libre para su interacción con otros compañeros de unión como AKT y Parkina. La estructura de BAG5 y las interacciones que establece a través de sus diferentes dominios apoyan la posibilidad de que BAG5 funcione como una proteína de andamiaje que regula de forma conjunta la función, como parte de una misma vía, de las proteínas que se asocian a los

distintos dominios. Aunado a lo anterior, en la secuencia aminoacídica de la región mediante la cual BAG5 interacciona con AKT se localizó un sitio consenso, parcialmente conservado, de fosforilación por AKT1 (LRKARYHTLT) en la treonina 152, identificado a bajo nivel de rigor por la herramienta bioinformática Scansite disponible en la Web (http://scansite.mit.edu.) [251], lo cual sitúa a BAG5 como un posible sustrato de AKT.

**2. BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT.**

Las proteínas de la familia BAG se consideran cofactores de la familia de chaperonas Hsp70 que regulan la función proteica a través de inducir cambios en su conformación. Este efecto lo promueven modificando la afinidad de las chaperonas por el nucleótido y/o sirviendo como intermediarios que contribuyen a reclutar proteínas blanco a las chaperonas moleculares. Los cambios en la conformación proteica alteran la estabilidad de las proteínas substratos, lo cual influye directamente en su función y en los mecanismos de transducción de señales [236, 241]. Además, existe evidencia sólida que indica una relación entre el sistema ubiquitina-proteosoma y la familia de proteínas BAG [247, 248], soportando la idea de que los miembros de la familia de proteínas con dominios BAG sirven de enlace entre el sistema de chaperonas moleculares y el sistema ubiquitina-proteosoma, actuando a manera de complejo.

La cinasa AKT es regulada tanto por la proteína BAG5 íntegra como por la región mínima de interacción [BAG5(N87-P181), “región linker”]. Ambas promueven una disminución en la expresión de AKT completa así como del dominio de cinasa (Figura 18E y F), sugiriendo que BAG5 promueve una disminución en la síntesis de AKT o contribuye a su degradación. Con fundamento en los antecedentes de BAG5, nos inclinamos por la segunda opción, que propone a BAG5 como regulador de la estabilidad de AKT.

En este sentido, existen pocos reportes que vinculan la regulación de la cinasa AKT con los miembros de la familia de proteínas BAG. Michael Sendter y colaboradores observaron que la inactivación del gen *Bag1* tuvo consecuencias notables en la sobrevivencia de células progenitoras neuronales y

hematopoyéticas, manifestado por la muerte celular masiva asociada a la falta de la fosforilación inhibitoria de BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), en Ser136, dependiente de AKT. Específicamente, BAG1 no fue requerido para la activación de AKT pero fue indispensable en la formación de un complejo, constituido por B-Raf, Hsp70, AKT y BAG1, que fomenta la fosforilación de Bad dependiente de AKT, previniendo de esta manera la apoptosis de células troncales en el desarrollo cerebral y hematopoyético [239]. Por otro lado, la co-chaperona BAG3 presentó un efecto protector de la degradación de AKT, mediante la asociación e inhibición de Hsp70 a través de su dominio BAG. BAG3 bloqueó la degradación proteosomal de AKT inducida por Geldanamicina, un inhibidor de Hsp90, acumulándose la forma ubiquitinada de AKT [253].

Similar a la interacción entre AKT y BAG5, la proteína TRB3 (*Drosphila tribbles* homolog 3) interacciona con AKT bajo condiciones de ayuno y funciona como un modulador negativo de esta cinasa. La expresión de TRB3 es inducida en el hígado de ratones sometidos a condiciones nutricionales deficientes, donde interacciona con AKT e inhibe las fosforilaciones en Thr308 y Ser473, reconocidas como fundamentales para llevar a su activación, sin alterar su cantidad total [285].

**3. La degradación de AKT inducida por BAG5 es mediada por Hsp70 y Parkina.**

Basándonos en que Parkina y Hsp70 interaccionan con BAG5 [245, 247] y en que nuestros datos demuestran la interacción entre éste y AKT, planteamos una hipótesis en la que BAG5 regula la degradación de AKT con la participación de Hsp70 y Parkina. Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de BAG5, Hsp70 o Parkina inducen la ubiquitinación y degradación de AKT (Figuras 20, 21 y 22).

Actualmente se acepta que las chaperonas moleculares, dentro de las que se incluye a Hsp70, son un conjunto de proteínas caracterizadas por presentar ciclos controlados de unión y separación a polipéptidos, facilitando de esta

manera el plegamiento, el ensamble oligomérico, el transporte a otros compartimientos subcelulares, así como la degradación de sus proteínas blanco. El destino final de las proteínas unidas a chaperonas muchas veces está determinado por el cofactor que forme parte del complejo chaperona-polipéptido. La unión a ciertos cofactores lleva al adecuado plegamiento y función de las proteínas blanco, mientras que la unión a otros cofactores induce la degradación proteosomal, de tal forma que se puede establecer una cooperación entre las chaperonas moleculares y el sistema ubiquitina-proteosoma, del que forma parte la ligasa E3 Parkina [252, 286]. En este sentido, existen reportes que orientan hacia una función dual de la chaperona Hsp70, promoviendo por un lado el plegamiento correcto y por otro la ubiquitinación y remoción por degradación proteosomal de sus proteínas blanco [260].

*La chaperona molecular Hsp70 media la degradación de AKT inducida por BAG5.*

La vida media de AKT está determinada, en parte, por los periodos de tiempo que se encuentra asociada a Hsp90/Hsp70, durante los cuales puede ser susceptible de ubiquitinación y degradación vía proteosoma. La chaperona Hsp90 estabiliza a AKT [141], previene su inactivación por la fosfatasa PP2A [142] y funciona como un molécula de andamiaje para promover la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial dependiente de AKT [287]. En tanto que Hsp70 promueve la degradación o estabilización de AKT, dependiendo de los niveles de expresión de esta chaperona, mientras que un incremento en los niveles de Hsp70 promueve una disminución en la expresión de AKT, una disminución en los niveles de Hsp70 tiene el efecto contrario, confirmando pues la habilidad de la chaperona Hsp70 para promover el aclaramiento de AKT [143]. Interesantemente, el mismo grupo de investigación demostró que la combinación de la sobreexpresión de Hsp70 y la inhibición de la actividad ATPasa de Hsp70, empleando fármacos tipo moléculas pequeñas, inducía de manera aguda la inestabilidad de AKT facilitando la muerte celular [143]. En

concordancia con estos hallazgos, Suneil K. Kalia y colaboradores demostraron que BAG5 inhibe tanto la actividad de ligasa de ubiquitina de Parkina como la actividad ATPasa de Hsp70, resultando en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra por acumulación de agregados proteicos [247]. Lo anterior es consistente con el mecanismo que proponemos mediante el cual BAG5 conduce a la degradación de AKT. Sugerimos que BAG5 por un lado facilita la aproximación de Hsp70 y AKT y por otro, al inhibir la actividad ATPasa de Hsp70, promueve la desestabilización de AKT. Esta afirmación se refuerza con los resultados obtenidos en los experimentos en los que la sobreexpresión Hsp70 redujeron los niveles de AKT de una manera dependiente de BAG5, como se indicó por la reducción del efecto de Hsp70 en células knockdown para BAG5, sugiriendo que BAG5 modula la acción de Hsp70 sobre AKT (Figura 21D).

El sistema de chaperonas moleculares regula la vía PI3K-AKT-mTOR en dependencia de la chaperona a la cual se asocien, por ejemplo, la chaperona del retículo endoplásmico Calreticulina suprime la actividad de cinasa de AKT durante la diferenciación cardiaca [288], formando parte, al igual que GRp58 de las chaperonas asociadas al retículo endoplásmico que modulan la vía PI3K-AKT-mTOR. En contraste, bajo las mismas condiciones de estrés por ayuno en que BAG5 promueve la ubiquitinación y degradación de AKT con la participación de Hsp70, la asociación entre AKT y Hsp27 protege su actividad de cinasa en células de carcinoma embrionario (PC12) [289] y en neutrófilos, donde además la fosforilación de Hsp27 dependiente de AKT promueve su disociación y el incremento en la apoptosis de neutrófilos [290]. Además, de manera interesante, diferentes variantes de Hsp70 tienen efectos opuestos sobre la estabilidad de AKT, enfatizando en la existencia de un mecanismo refinado de control de la misma [143].

Por otro lado, a diferencia de la inhibición de la actividad ATPasa dependiente de BAG5 mencionado con anterioridad [247], también se ha descrito a BAG5 como factor intercambiador de nucleótidos para Hsp70 que promueve el plegamiento adecuado de las proteínas sustrato [245]. Nuestras observaciones

amplían el entendimiento de las vías de regulación de Hsp70 por BAG5, considerando ahora la participación del sustrato de la chaperona (AKT) como regulador de su actividad.

*La ligasa de ubiquitina Parkina contribuye al efecto de BAG5 promoviendo la ubiquitinación y degradación de AKT.*

El sistema ubiquitina/proteosoma es una vía que media la ubiquitinación y la subsecuente regulación del recambio y actividad de las proteínas blanco. Se ha descrito la participación del sistema ubiquitina/proteosoma, controlando la degradación de AKT, e incluso se ha observado que la ubiquitinación puede en sí misma tener un efecto positivo como parte del mecanismo de activación de AKT [138-140, 291, 292].

Nuestros resultados muestran que la ligasa de ubiquitina Parkina promueve la ubiquitinación y degradación de AKT actuando conjuntamente con BAG5. Esto se fundamenta en los experimentos en que se sobreexpresó a Parkina y BAG5 en cantidades subóptimas a las cuales el efecto desestabilizante sobre AKT por sí solos es marginal; sin embargo, la cotransfección de Parkina y BAG5 en las mismas cantidades ejerció un fuerte efecto desestabilizante sobre AKT (Figura 22D). De manera semejante al efecto de BAG5 sobre la degradación de AKT inducida por Parkina, la ligasa de ubiquitina CHIP (*Carboxyl terminus of the Hsp70-Interacting Protein*) aumenta la ubiquitinación de Pael-R mediada por Parkina, a través de promover la disociación de Hsp70 del complejo Parkina-Pael-R, ya que presenta un efecto inhibidor de la actividad de E3 ligasa de Parkina [293]. En este sentido, BAG5 puede actuar como un controlador de la actividad de Parkina por su capacidad de interactuar con Hsp70 y Parkina, y de esta manera modular la degradación de AKT.

Por su parte, CHIP se relaciona directamente con la estabilidad de AKT, promoviendo su ubiquitinación y degradación, como parte de un mecanismo implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer [139]. Además, CHIP induce la degradación de FoxO1, un sustrato de AKT, de forma dependiente de su ubiquitinación en células de músculo liso [294].

Considerando lo anterior y que BAG5 interacciona con CHIP a través de la chaperona Hsp70 [248], esta ligasa de ubiquitina podría formar parte del mecanismo de regulación de AKT mediado por BAG5, aunque la acción reportada de BAG5 en la interacción BAG5-Hsp70-CHIP es la regulación negativa de la actividad de CHIP, impidiendo la ubiquitinación de su sustrato $\alpha$-sinucleína [248].

Otra explicación posible para el papel que desempeña Parkina en la degradación de AKT dependiente de BAG5, es que Parkina medie la ubiquitinación de la AKT que experimentó previamente un cambio conformacional inducido por Hsp70, el cual le confirió características específicas de blanco de Parkina. Todo esto posible mediante la asociación de AKT, Parkina y Hsp70 con BAG5, operando como un puente molecular que aproxima estratégicamente a dichos componentes.

En contraste, Fallon y colaboradores plantean un mecanismo en el que la señalización de la vía PI3K-AKT-mTOR es facilitada por Parkina, en el cual Parkina monoubiquitina a Eps15, una proteína involucrada en la endocitosis y tráfico del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), retardando su internalización y por lo tanto favoreciendo la señalización del mismo, evidenciado por la activación de AKT [263].

El mecanismo de control de AKT descrito en nuestro trabajo diverge de los mecanismos clásicos de ubiquitinación/degradación de AKT. Nosotros describimos un mecanismo relevante bajo condiciones críticas de ayuno de suero. Sin embargo, existen otros mecanismo alternativos de regulación de AKT que se mencionan brevemente a continuación. La regulación mostrada en nuestro trabajo es sobre la cinasa AKT expuesta a las condiciones de ayuno. Es decir, aquella que no ha sido estimulada y que, en condiciones de ausencia de factores de crecimiento, se mantiene inhibida. En contraste, la AKT activada (fosforilada en Thr308 y Ser473) es preferencialmente ubiquitinada y llevada a degradación por las ligasas de ubiquitina Mulan [137] o TTC3 (*Tetratricopeptide repeat domain 3*) [138]. Considerando que Mulan es una proteína mitocondrial cuyo dominio con actividad de ligasa E3 (*ring finger*) está expuesto hacia el

citosol [295], denota que la ubiquitinación de AKT dependiente de Mulan ocurre asociada a la cara citoplásmica de la mitocondria. Por su parte TTC3 es una ligasa E3 específica para AKT que se une a la AKT fosforilada facilitando su ubiquitinación y degradación dentro del núcleo [138]. Nosotros mostramos que BAG5 colocaliza con AKT en la periferia celular (Figura 19E y F), sugiriendo éste como un posible sitio de ubiquitinación y degradación de AKT dependiente de BAG5.

Las ligasas de ubiquitina transfieren una ubiquitina a residuos de lisina presentes en sus proteínas blanco. Posteriormente, la cadena de ubiquitina se extiende por la adición sucesiva de ubiquitinas a la ubiquitina previamente transferida. La molécula de ubiquitina contiene 7 posibles residuos de lisina que están involucradas en la formación de las cadenas de poliubiquitina, que permiten la formación de múltiples variantes de unión. Las cadenas formadas vía la lisina 48 y la lisina 63 son las mejor caracterizadas. En términos generales, la transferencia de ubiquitinas a través de la lisina 48 representa una señal para la degradación vía proteosoma, mientras que la formación de la cadena de ubiquitina vía la lisina 63 se ha visto involucrada con la reparación del DNA, endocitosis y activación de cinasas. En este sentido, la ligasa E3 TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) ubiquitina a AKT vía la lisina 63, favoreciendo su reclutamiento a la membrana y su posterior fosforilación por factores de crecimiento [296]. En contraste, la activación de AKT por su fosforilación en Ser473 atribuida al complejo 2 de mTOR, favorece la poliubiquitinación de AKT vía la lisina 48, resultando en su rápida degradación proteosomal [297]. De esta manera se sitúa a mTORC2 como regulador del ciclo de vida de AKT, primero favoreciendo una configuración estable por la fosforilación de AKT en la Thr450 [125, 193] y su activación [127] y luego promoviendo su degradación dependiente del sistema ubiquitina-proteosoma [297].

La ubiquitinación y degradación de AKT dependiente de la acción del complejo BAG5-Hsp70-Parkina que nosotros mostramos, sugiere que la adición de ubiquitinas a la cadena de poliubiquitina adjuntada a AKT es vía la lisina 48.

**4. La fosforilación de BAG5 correlaciona con una reducción en su interacción con AKT.**

El efecto de BAG5 sobre la estabilidad de AKT es regulado por la señalización de factores de crecimiento. Nuestros resultados indican que AKT interactúa con BAG5 en condiciones de reposo, no estimuladas o adversas de las células, en las que no se requiere la participación de AKT, por lo que es seleccionada para su degradación vía proteosoma; sin embargo, el complejo formado entre AKT y BAG5 se disocia en respuesta al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Figura 23B). Esto correlaciona con la fosforilación de BAG5 (Figura 23D), sugiriendo un mecanismo de acción ligado al estatus de estimulación de la célula. Como mecanismos probables que expliquen la disrupción de la interacción en condiciones de estimulación de la célula, nosotros planteamos varias líneas de especulación principales: una, en la que BAG5 resulta fosforilada por AKT u otras cinasas activadas en respuesta al estímulo, lo cual induce un cambio conformacional que lleve a la separación o impida la unión de AKT; otra, en la cual la fosforilación de AKT en los residuos Thr308 y Ser473, modifiquen en tal medida su conformación que disminuya la afinidad por BAG5; y finalmente una que podría ser parte de las anteriores, en la que BAG5 funcione como presentadora de sustratos de AKT, y se separe una vez que AKT esté activa y próxima a sus efectores río abajo.

Considerando que BAG5 se obtuvo a partir de un tamizaje por doble híbrido en levaduras optimizado para obtener mayormente substratos de AKT, que BAG5 posee un sitio parcialmente conservado de fosforilación por AKT1 en la Thr152 y que nuestros resultados muestran la fosforilación de BAG5, nos inclinamos por la primer teoría que sugiere la fosforilación de BAG5 por AKT. Consistente con este mecanismo de disociación, la asociación de AKT y Hsp27, que favorece la actividad de cinasa de AKT en neutrófilos, se interrumpe por la fosforilación de Hsp27 mediada por AKT, resultando en el incremento de la apoptosis de estas células [290].

Nuestros resultados también muestran que la mutación del sitio potencial de fosforilación de BAG5 por AKT1 (BAG5-T152A) no revierte la disociación de la interacción AKT-BAG5 en respuesta a HGF (Figura 23E), sugiriendo que la fosforilación de BAG5 en la Thr152 no es suficiente para controlar el mecanismo de separación de AKT en respuesta a estímulo. Estos datos, respaldan la existencia de mecanismos alternativos de disociación o interrupción de la señal inhibidora, como los mencionados con anterioridad, sin excluir la coexistencia entre ellos.

Este mecanismo de regulación recíproca entre AKT y BAG5 se representa en el modelo de la figura 24E y contribuye a conciliar las observaciones sobre el papel de BAG5 en la viabilidad celular, pues existen ejemplos en los que se ha demostrado que BAG5 promueve tanto muerte como sobrevivencia celular (5, 24).

**5. BAG5 modula la fosforilación de AKT y la migración celular dependiente de HGF.**

Nosotros encontramos que BAG5 afecta la estabilidad de AKT promoviendo su ubiquitinación y degradación sólo en condiciones de privación de estímulos tales como factores de crecimiento. Sin embargo, en condiciones en las cuales la estabilidad de AKT no estuvo comprometida, BAG5 ejerció un efecto modulador de la activación de AKT, revelado por una disminución en los niveles de fosforilación de AKT en Ser473, que es el sitio de fosforilación del complejo 2 de mTOR, mismo que de esta forma conduce a AKT a un estado de activación máxima. En esta situación, la expresión de BAG5 se hizo en condiciones subóptimas, de forma que su posible efecto, independiente de su acción sobre la estabilidad de AKT, pudiera ser detectado (Figura 24A y B). Estos datos sugieren que BAG5 presenta una influencia dual sobre AKT, por un lado marcándola para degradación bajo condiciones de ayuno crítico y, por otro lado, afectando su activación en condiciones en las cuales la estabilidad de AKT no se ve comprometida. En concordancia con nuestros hallazgos, un reporte reciente mostró que BAG5 mantiene los niveles de PTEN (*Phosphatase and*

*Tensin homolog*) a través de reducir su degradación por CHIP [250]. La fosfatasa PTEN regula negativamente la señalización de AKT, reduciendo los niveles de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3) el cual recluta a AKT para su activación [298]. Las funciones de PTEN son reguladas por el sistema ubiquitina-proteosoma, específicamente PTEN es sustrato para degradación proteosomal de la ligasa de ubiquitina CHIP, la cual es inhibida por BAG5. De esta manera BAG5, que es un conocido inhibidor de CHIP, reduce la degradación de PTEN y consecuentemente reduce la activación de AKT, pudiendo ser parte del mecanismo de inhibición de la activación de AKT inducido por BAG5, alterno a la interacción directa con el dominio de cinasa de AKT.

Consistente con el efecto de BAG5 en la reducción en la activación de AKT, BAG5 redujo significativamente la migración celular en respuesta a HGF. Este complejo proceso es fundamental en la formación de vasos sanguíneos e involucra el rearreglo del citoesqueleto de actina y la activación de AKT [95, 119]. En este sentido, se ha descrito que la regulación de AKT es primordial para la realización de procesos que involucran la modificación del citoesqueleto de actina, como la polaridad neuronal. La degradación de AKT, por el sistema ubiquitina-proteosoma, fue necesaria para establecer la polaridad neuronal [140]. La ubiquitinación y degradación de AKT de manera selectiva en dendritas, causa la acumulación de la cinasa en el polo axonal, donde se activan los sustratos necesarios que le permiten generar la polaridad neuronal y su correcta función. La inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma, restauró la presencia de AKT en todas las neuritas revertiendo la polaridad neuronal [140].

El mecanismo de regulación de AKT propuesto por nosotros incluye a BAG5 como un factor de acople entre la chaperona Hsp70, el complejo proteosomal representado por Parkina y la proteína blanco representada por AKT. De esta manera el complejo BAG5/Parkina/Hsp70 desempeña un papel modulador sobre las acciones de AKT.

La activación aberrante de AKT se asocia con diversas patologías que incluyen al cáncer y enfermedades metabólicas. La regulación a la baja de la expresión de AKT tiene profunda trascendencia clínica principalmente en estas áreas del conocimiento médico. Proveer un mecanismo que determine el umbral apoptótico, el crecimiento y la movilidad celular contribuiría a optimizar terapias encaminadas al tratamiento de enfermedades tumorales, metabólicas, así como aquellas que están relacionadas a la angiogénesis.

Por el contrario, en las enfermedades degenerativas, donde existe una indeseable pérdida celular prematura, el promover la sobrevivencia celular es el objetivo terapéutico. Nuestros resultados mostraron que los niveles de BAG5 correlacionan con la estabilidad de AKT, abriendo la posibilidad para futuros estudios en los cuales la modulación de la expresión y actividad de BAG5 pudiera incrementar la efectividad de las estrategias farmacológicas que actúan sobre la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR.

## B. Interacción mTOR-GRp58.

El blanco de la Rapamicina en mamíferos (mTOR), es una serina/treonina cinasa considerada como una proteína integradora de diversas señales dentro de las que se incluyen los factores de crecimiento, la disponibilidad de nutrientes, la concentración de oxígeno, el estatus de energía y más recientemente el estado redox celular. Bajo la influencia de múltiples compañeros de unión, la cinasa mTOR responde a estas señales, controlando procesos vitales para las células como el crecimiento, la proliferación, el metabolismo, la migración y la sobrevivencia celular [120]. Las alteraciones en la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR se asocian con múltiples patologías como las enfermedades oncológicas, metabólicas y degenerativas principalmente, de ahí que su modulación farmacológica forme parte de las

estrategias terapéuticas en dichas enfermedades, destacando las terapias antitumorales e inmunomoduladoras [299, 300].

Nosotros demostramos que la interacción previamente descrita en nuestro laboratorio entre mTOR y GRp58, resulta en la regulación de la actividad del complejo 1 de mTOR (mTORC1) pero no del complejo 2 de mTOR (mTORC2), en respuesta a factores de crecimiento y agentes oxidantes como parte de un mecanismo sensor de señales de mTORC1 [180].

Reportes previos ya denotaban la relación entre mTOR y GRp58. Mediante una estrategia fosfoproteómica se identificó el incremento del nivel de fosforilación de GRp58 en condiciones de ayuno de Leucina en células musculares, situación que correlacionó con la ausencia de fosforilación del sustrato de mTORC1 p70S6K y de su sustrato S6. La estimulación con Leucina ocasionó la disminución en la fosforilación de GRp58, evento que fue revertido con la inhibición de mTORC1 con Rapamicina [301]. Además, se ha descrito la fosforilación de GRp58 en respuesta a Leptina y Angiotensina II estimulando el receptor AT1, que son moduladores de la vía PI3K-AKT-mTOR [302, 303].

**1. La chaperona GRp58 es requerida para la señalización de mTORC1 en respuesta al agente oxidante PAO.**

GRp58, también conocida como ERp57, es una chaperona presente en el citosol, núcleo y principalmente en el retículo endoplásmico, que regular interacciones proteína-proteína a través de sus dominios parecidos a tioredoxina por un mecanismo redox basado en la formación de puentes disulfuro en los complejos proteicos [255, 256].

Nuestros resultados indican que GRp58, una chaperona molecular sensible a las condiciones óxido-reducción, facilita la detección de agentes oxidantes por parte de mTORC1, lo cual es consistente con un mecanismo de regulación de dicho complejo sensible al estado redox de la célula descrito por el grupo de Sabatini, en el cual la exposición a agentes oxidantes disminuyen la interacción entre RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*) y mTOR, hecho que

resulta en la activación del complejo 1 de mTOR, mientras que los agentes reductores estabilizan al complejo [181].

Particularmente nuestros resultados exhiben la dependencia de GRp58 para la activación de mTORC1 en respuesta al agente oxidante PAO (*phenylarsine oxide*), pues la atenuación de la expresión de GRp58, con el empleo de un shRNA, reduce significativamente la fosforilación del sustrato de mTORC1, p70S6K y a su vez de su sustrato, S6, mientras que la fosforilación de 4E-BP1 (otro sustrato de mTORC1) muestra una reducción que no llega a ser significativa (Figura 29 C, D y E). Esto sugiere que GRp58 (por su interacción con mTORC1) forma parte del mecanismo sensor de las condiciones redox atribuido a mTORC1 [181]. Interesantemente la estimulación con PAO no indujo cambios en la fosforilación de AKT en Ser473, un sustrato del complejo 2 de mTOR, sugiriendo que mTORC2, al menos señalizando por la vía de AKT, no participa en el mecanismo sensor del estado redox de la célula, aunque si muestre interacción con GRp58 [180].

Adicionalmente, nosotros encontramos que la estimulación con el agente oxidante PAO promueve la disociación entre mTOR y GRp58 (Figura 25A), mostrando un efecto similar al reportado por el grupo de Sabatini, al inducir la separación de RAPTOR y mTOR [181], así como a la disociación de RAPTOR en respuesta a nutrientes [304-306].

Por otro lado, en el dominio FATC (*FAT*, *carboxyl-terminal domain*) de la estructura de TOR1 en levaduras se reportó un asa formada por un puente disulfuro entre sus cisteínas conservadas filogenéticamente, cuya oxidación o reducción induce un cambio conformacional que incrementa la flexibilidad del dominio FATC [179]. El dominio FATC tiene profunda importancia para la actividad de mTOR, la alteración estructural de este dominio, ocasionada por la deleción de un aminoácido, inhibe la actividad de cinasa de mTOR [152, 179, 307]. Adicionalmente, se encontró que mutaciones puntuales de una cisteína en esta región alteran la interacción del dominio FATC con otras regiones de TOR y con proteínas accesorias [179]. Esto le confiere un papel putativo como

sensor redox a esta cinasa, sugiriendo que la regulación redox de mTOR puede ser mediada por la propia cinasa sin la participación de una proteína mediadora.

**2. Los cambios en la expresión de GRp58 afectan la actividad del complejo 1 de mTOR pero no del complejo 2 de mTOR.**

La regulación positiva de GRp58 sobre la actividad del complejo 1 de mTOR en condiciones basales puede ser resultado de la estimulación directa de la actividad catalítica de mTOR (Figura 26A y B), lo cual se sustenta en que GRp58 se obtuvo por su afinidad con el dominio catalítico de mTOR en un tamizaje por doble híbrido en levaduras y el efecto es sensible a la inhibición de mTOR por Rapamicina. De manera similar a la ausencia de respuesta de mTORC1 al agente oxidante PAO en células Knockdown para GRp58, la activación de mTORC1 en respuesta a insulina se encuentra atenuada en células carentes de GRp58 (Figura 27A y B), sugiriendo que GRp58 puede ser parte de un mecanismo general para detectar señales activadoras de mTORC1. Además, las alteraciones en la expresión de GRp58 repercuten en la actividad de mTORC1, sin afectar la actividad de mTORC2, en respuesta a insulina. Esto relaciona directamente a GRp58 como regulador de las funciones de mTORC1 dependientes, al menos, de la activación de sus efectores p70S6K y 4E-BP1, que inciden directamente en el mecanismo de traducción, biogénesis de Ribosoma y RNA mensajero, relevantes para la síntesis proteica, el crecimiento y la proliferación celular; este último se muestra claramente regulado por el incremento o atenuación de la expresión de GRp58 en respuesta a insulina y suero fetal bovino [180]. En este sentido faltaría evaluar el papel de GRp58 sobre las funciones de mTORC1 dependientes del resto de sus efectores, que controlan procesos esenciales como autofagia, metabolismo y organización de microtúbulos [120, 149, 151, 308].

El complejo 2 de mTOR, que también interactúa con GRp58, no muestra afectación de su activación en respuesta a insulina por cambios en la expresión de GRp58, como se indica por la fosforilación de AKT en Ser473 y Thr450, así como de su sustrato GSK-3β. Si bien AKT es uno de los efectores de mTORC2

mejor caracterizados por el que se medían muchas de las funciones atribuidas a este complejo de mTOR, para descartar completamente la participación de GRp58 en la actividad de mTORC2, se requiere evaluar la activación de otros efectores de este complejo que incluyen al factor intercambiador de nucleótidos de guanina para Rac, P-Rex1 y a las serina/treonina cinasa de la familia AGC (al igual que AKT), SGK y PKC alfa, que están involucrados en la regulación del balance electrolítico (SGK) y la migración celular (P-Rex1 y PKC alfa) [120, 153, 196]. Además, como parte importante del mecanismo de activación de mTORC1, se encuentra a la cinasa AKT, que a su vez es estabilizada y activada por mTORC2, integrándose el eje de activación mTORC2-AKT-mTORC1. Lo anterior plantea un mecanismo de activación de mTORC1, en el cual GRp58 no afecta la activación de AKT mediada por mTORC2, asegurando la activación de mTORC1 en respuesta a factores de crecimiento y cambios en el estado redox, cuya percepción es facilitada por GRp58.

Dentro de las estrategias celulares involucradas con la adaptación a las condiciones de estrés, se encuentra la modulación de la vía PI3K-AKT-mTOR. Considerando que las células pueden responder al estrés de varias maneras, dentro de las que se incluyen la activación de vías de sobrevivencia o bien la entrada en la ruta de la muerte celular por apoptosis, que eventualmente elimina a las células dañadas, reduciendo el impacto nocivo de la muerte celular no apoptótica, nosotros describimos mecanismos de regulación que podrían ayudar al ajuste preciso de la respuesta celular bajo condiciones de estrés generado por ayuno y por modificaciones en el equilibrio redox.

De acuerdo a nuestros resultados, proponemos dos mecanismos novedosos que regulan las respuestas celulares dependientes de la vía PI3K/AKT/mTOR mediante:

1) La regulación del umbral apoptótico en condiciones de ayuno crítico por la interacción entre AKT y BAG5. Este efecto puede ser revertido por factores de crecimiento, los cuales inducen la fosforilación de BAG5 por AKT, promoviendo la disociación de estas proteínas.

2) La regulación de la actividad del complejo 1 de mTOR en respuesta a factores de crecimiento y facilitando su habilidad para sensar el estado óxido-reducción celular, a través de la interacción mTOR-GRp58 (Figura 30).

## X. Conclusiones.

Nuestros resultados sugieren que la vía PI3K-AKT-mTOR es modulada por proteínas relacionadas con las chaperonas moleculares bajo condiciones de estrés celular (Figura 30). La co-chaperona BAG5 regula la estabilidad de AKT a través de ubiquitinación y degradación por el proteosoma, por un mecanismo dependiente de la ligasa de ubiquitina Parkina y la chaperona Hsp70 en condiciones de ayuno, el cual se revierte por la por la fosforilación de BAG5. Además, BAG5 inhibe la fosforilación de AKT de manera independiente de su estabilidad y la migración celular dependientes de HGF. La chaperona GRp58 es requerida para la señalización de mTORC1 en respuesta a insulina y al agente oxidante PAO.

## XI. Referencias.


1. Cueni, L.N. and M. Detmar, *New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(10): p. 2167-77.
2. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
3. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
4. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease.* Nature, 2005. **438**(7070): p. 946-53.
5. Jin, S.W. and C. Patterson, *The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(5): p. 623-9.
6. Hunter, J., *A treatise on the blood, inflamation, and gun-shot wounds.* 1817, Philadelphia: James Webster, No. 10, S. Eighth street.
7. Turk, J.L., *Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds".* Int J Exp Pathol, 1994. **75**(6): p. 385-95.
8. Hunter, J., *Lectures on the principles of surgery by John Hunter, F.R.S.* 1839, Philadelphia: Haswell, Barrington, and Haswell. 293 Market street.
9. Fye, W.B., *Profiles in cardiology. Julius Friedrich Cohnheim.* Clin Cardiol, 2002. **25**(12): p. 575-7.
10. Virchow, R., *Die Krankhaften Geschwulste*. 1863, August Hirschwald, Berlin.
11. Goldman, E., *Growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to vascular system.* Proc. R. Soc. Med., 1907. **1**: p. 1-13.
12. Clark, E.R., Clark, E.L., *Observations on living preformed blood vessels as seen in a transparent chamber inserted into the rabbit ear.* Am. J. Anat., 1932. **49**: p. 441-447
13. Hertig, A.T., *Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey.* . Contributions to embryology (Carnegie Institution of Washington). 1935, Washington. 81.
14. Ide, A.G., Baker, N.H. & Warren, S.L., *Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber.* Am. J. Roentgenol, 1939. **42**: p. 891-899.
15. Algire, G.H., *An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse.* J. Natl. Cancer Inst., 1943. **4**: p. 1-11.

16. Algire, G.H., *Microscopic studies of the early growth of a transplantable melanoma of the mouse, using the transparent-chamber technique.* J. Natl. Cancer Inst., 1943. **4**: p. 13-20.

17. Algire, G.H., Chalkeley, H.W., Legallais, F.Y. & Park, H.D., *Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants.* J. Natl. Cancer Inst., 1945. **6**: p. 73-85.

18. Michelson, I.C., *The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders.* Trans. Ophthalmol. Soc. UK, 1948. **68**: p. 137-180.

19. Greenblatt, M. and P. Shubi, *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.* J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(1): p. 111-24.

20. Ehrmann, R.L. and M. Knoth, *Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy.* J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(6): p. 1329-41.

21. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications.* N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.

22. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.* J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.

23. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization.* J Exp Med, 1972. **136**(2): p. 261-76.

24. Brem, H. and J. Folkman, *Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage.* J Exp Med, 1975. **141**(2): p. 427-39.

25. Shing, Y., et al., *Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor.* Science, 1984. **223**(4642): p. 1296-9.

26. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.

27. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.

28. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.

29. Kim, K.J., et al., *The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies.* Growth Factors, 1992. **7**(1): p. 53-64.

30. The-Angiogenesis-Foundation. *Understanding angiogenesis. Historical highlights of the angiogenesis field.* 2009 June 23, 2009; Available from: http://www.angio.org/understanding/highlight.php.

31. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.

32. Khakoo, A.Y. and T. Finkel, *Endothelial progenitor cells.* Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 79-101.

33. Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of blood vessel growth.* Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 507-21.

34. Kubo, H. and K. Alitalo, *The bloody fate of endothelial stem cells.* Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 322-9.

35. Rafii, S., et al., *Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration.* Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(1): p. 61-7.

36. Reyes, M., et al., *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.* J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 337-46.

37. Yoder, M.C. and D.A. Ingram, *The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 50-4.

38. Gao, D., et al., *Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 33-40.

39. Folkins, C., et al., *Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1.* Cancer Res, 2009. **69**(18): p. 7243-51.

40. Nomura, R., D. Yoshida, and A. Teramoto, *Stromal cell-derived factor-1 expression in pituitary adenoma tissues and upregulation in hypoxia.* J Neurooncol, 2009. **94**(2): p. 173-81.

41. Timmermans, F., et al., *Endothelial progenitor cells: identity defined?* J Cell Mol Med, 2009. **13**(1): p. 87-102.

42. Shaked, Y., et al., *Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis.* Cancer Cell, 2005. **7**(1): p. 101-11.

43. Calleri, A., et al., *Predictive Potential of Angiogenic Growth Factors and Circulating Endothelial Cells in Breast Cancer Patients Receiving Metronomic Chemotherapy Plus Bevacizumab.* Clin Cancer Res, 2009.

44. Segura, I., et al., *The neurovascular link in health and disease: an update.* Trends Mol Med, 2009. **15**(10): p. 439-51.

45. Blasi, F. and P. Carmeliet, *uPAR: a versatile signalling orchestrator.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 932-43.

46. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.* Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.

47. Roca, C. and R.H. Adams, *Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling.* Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2511-24.

48. Rocha, S.F. and R.H. Adams, *Molecular differentiation and specialization of vascular beds.* Angiogenesis, 2009. **12**(2): p. 139-47.

49. Augustin, H.G., et al., *Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 165-77.

50. Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne, *Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring.* Nature, 2005. **436**(7048): p. 193-200.

51. Eichmann, A., et al., *Guidance of vascular and neural network formation.* Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(1): p. 108-15.

52. Gerhardt, H., *VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting.* Organogenesis, 2008. **4**(4): p. 241-6.

53. Vázquez-Prado José, G.-H.M.L., Carretero-Ortega Jorge, Sánchez-Barbosa Sandra, Hernández-García Ricardo y Guadalupe Reyes Cruz, *Mecanismos moleculares de la migración de células endoteliales y angiogénesis: Papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho.* Mensaje Bioquímico, 2006. **XXX**: p. 77-104.

54. Bagri, A., M. Tessier-Lavigne, and R.J. Watts, *Neuropilins in tumor biology.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 1860-4.

55. Bergers, G., et al., *Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors.* J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1287-95.

56. Koh, W., R.D. Mahan, and G.E. Davis, *Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 989-1001.

57. Koh, W., et al., *Formation of endothelial lumens requires a coordinated PKCepsilon-, Src-, Pak- and Raf-kinase-dependent signaling cascade downstream of Cdc42 activation.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 11): p. 1812-22.

58. Parker, L.H., et al., *The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation.* Nature, 2004. **428**(6984): p. 754-8.

59. Ferrara, N., *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 795-803.

60. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.* Nat Med, 2001. **7**(5): p. 575-83.

61. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.

62. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine.* Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.

63. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(4): p. 273-86.

64. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.* N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.

65. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.* J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.

66. Morikawa, S., et al., *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.* Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.

67. Folberg, R., M.J. Hendrix, and A.J. Maniotis, *Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis.* Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 361-81.

68. McDonald, D.M., L. Munn, and R.K. Jain, *Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant?* Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 383-8.

69. Lyden, D., et al., *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth.* Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1194-201.

70. Ferrara, N. and R.S. Kerbel, *Angiogenesis as a therapeutic target.* Nature, 2005. **438**(7070): p. 967-74.

71. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis.* N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2039-49.

72. Purhonen, S., et al., *Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(18): p. 6620-5.

73. Wickersheim, A., et al., *Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors.* Int J Cancer, 2009. **125**(8): p. 1771-7.

74. Wels, J., et al., *Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells.* Genes Dev, 2008. **22**(5): p. 559-74.

75. De Palma, M., et al., *Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications.* Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 519-24.

76. Bertolini, F., et al., *The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 835-45.

77. Gao, D., et al., *Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis.* Science, 2008. **319**(5860): p. 195-8.

78. Dewhirst, M.W., Y. Cao, and B. Moeller, *Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response.* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(6): p. 425-37.

79. Dor, Y., R. Porat, and E. Keshet, *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis.* Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(6): p. C1367-74.

80. Staller, P., et al., *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL.* Nature, 2003. **425**(6955): p. 307-11.

81. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.

82. Sessa, C., et al., *Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations?* Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(7): p. 378-91.

83. Jain, R.K., et al., *Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy.* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(6): p. 327-38.

84. Folkman, J., *Endogenous angiogenesis inhibitors.* APMIS, 2004. **112**(7-8): p. 496-507.

85. Simons, M., *Angiogenesis: where do we stand now?* Circulation, 2005. **111**(12): p. 1556-66.

86. Kumar, D., et al., *Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7540-5.

87. Mazzone, M. and P. Carmeliet, *Drug discovery: a lifeline for suffocating tissues.* Nature, 2008. **453**(7199): p. 1194-5.

88. Andreou, I., et al., *Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives.* Atherosclerosis, 2006. **189**(2): p. 247-54.

89. George, A.L., et al., *Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration.* J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 24.

90. Ding, D.C., et al., *The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases.* Cell Transplant, 2007. **16**(3): p. 273-84.

91. Gotlieb, A.I., L. Subrahmanyan, and V.I. Kalnins, *Microtubule-organizing centers and cell migration: effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells.* J Cell Biol, 1983. **96**(5): p. 1266-72.

92. Chung, C.Y., S. Funamoto, and R.A. Firtel, *Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(9): p. 557-66.

93. Onishi, K., et al., *The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts.* Genes Cells, 2007. **12**(4): p. 535-46.

94. Primo, L., et al., *Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration.* J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 1035-47.

95. Enomoto, A., et al., *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE.* Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 389-402.

96. Lee, M.J., et al., *Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis.* Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 693-704.

97. Morales-Ruiz, M., et al., *Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt.* Circ Res, 2000. **86**(8): p. 892-6.

98. Li, J., et al., *Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration.* Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 663-73.

99. Kashiwagi, S., et al., *NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1816-27.

100. Hur, J., et al., *Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle.* Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1769-78.

101. Phung, T.L., et al., *Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin.* Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 159-70.

102. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.

103. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.

104. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.* Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-19.

105. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer.* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(8): p. 627-44.

106. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis.* Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1243-50.

107. Somanath, P.R., et al., *Akt1 in endothelial cell and angiogenesis.* Cell Cycle, 2006. **5**(5): p. 512-8.

108. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5034-7.

109. Staal, S.P., J.W. Hartley, and W.P. Rowe, *Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 3065-7.

110. Coffer, 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.* Eur J Biochem, 1991. **201**(2): p. 475-81.

111. Jones, P.F., et al., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4171-5.

112. Bellacosa, A., et al., *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region.* Science, 1991. **254**(5029): p. 274-7.

113. Brodbeck, D., P. Cron, and B.A. Hemmings, *A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain.* J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9133-6.

114. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9267-71.

115. Bellacosa, A., et al., *A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities.* Cancer Biol Ther, 2004. **3**(3): p. 268-75.

116. Pearce, L.R., D. Komander, and D.R. Alessi, *The nuts and bolts of AGC protein kinases.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 9-22.

117. Chen, J., et al., *Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo.* Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1188-96.

118. Du, K. and P.N. Tsichlis, *Regulation of the Akt kinase by interacting proteins.* Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7401-9.

119. Xue, G. and B.A. Hemmings, *PKB/Akt-dependent regulation of cell motility.* J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(6): p. 393-404.

120. Bracho-Valdes, I., et al., *mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused.* IUBMB Life, 2011. **63**(10): p. 896-914.

121. Ackah, E., et al., *Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2119-27.

122. Higuchi, M., et al., *Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells.* Curr Biol, 2001. **11**(24): p. 1958-62.

123. Kirk, R.I., M.R. Sanderson, and K.M. Lerea, *Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding.* J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30901-6.

124. Lerea, K.M., et al., *Phosphorylation sites in the integrin beta3 cytoplasmic domain in intact platelets.* J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 1914-9.

125. Facchinetti, V., et al., *The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C.* EMBO J, 2008. **27**(14): p. 1932-43.

126. Stephens, L., et al., *Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.* Science, 1998. **279**(5351): p. 710-4.

127. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.* Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.

128. Trotman, L.C., et al., *Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function.* Nature, 2006. **441**(7092): p. 523-7.

129. Shay, K.P. and T.M. Hagen, *Age-associated impairment of Akt phosphorylation in primary rat hepatocytes is remediated by alpha-lipoic acid through PI3 kinase, PTEN, and PP2A.* Biogerontology, 2009. **10**(4): p. 443-56.

130. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.

131. Andjelkovic, M., et al., *Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5699-704.

132. Brognard, J., et al., *PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms.* Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 917-31.

133. Liao, Y. and M.C. Hung, *A new role of protein phosphatase 2a in adenoviral E1A protein-mediated sensitization to anticancer drug-induced apoptosis in human breast cancer cells.* Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5938-42.

134. Mendoza, M.C. and J. Blenis, *PHLPPing it off: phosphatases get in the Akt.* Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 798-800.

135. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton, *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth.* Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 13-24.

136. Kawase, T., et al., *PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt.* Cell, 2009. **136**(3): p. 535-50.

137. Bae, S., et al., *Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase.* Cell Res, 2012. **22**(5): p. 873-85.

138. Suizu, F., et al., *The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt.* Dev Cell, 2009. **17**(6): p. 800-10.

139. Dickey, C.A., et al., *Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3622-7.

140. Yan, D., L. Guo, and Y. Wang, *Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity.* J Cell Biol, 2006. **174**(3): p. 415-24.

141. Basso, A.D., et al., *Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function.* J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39858-66.

142. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10832-7.

143. Koren, J., 3rd, et al., *Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels.* J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2498-505.

144. Rokudai, S., et al., *Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis.* J Cell Physiol, 2000. **182**(2): p. 290-6.

145. Jahani-Asl, A., A. Basak, and B.K. Tsang, *Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation.* FEBS Lett, 2007. **581**(16): p. 2883-8.

146. Medina, E.A., et al., *Tumor necrosis factor-{alpha} decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt.* Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2726-35.

147. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer.* Cancer Cell, 2007. **12**(1): p. 9-22.

148. Zhou, H. and S. Huang, *Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis.* Curr Protein Pept Sci, 2011. **12**(1): p. 30-42.

149. Betz, C. and M.N. Hall, *Where is mTOR and what is it doing there?* J Cell Biol, 2013. **203**(4): p. 563-74.

150. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.

151. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 21-35.

152. Easton, J.B. and P.J. Houghton, *mTOR and cancer therapy.* Oncogene, 2006. **25**(48): p. 6436-46.

153. Su, B. and E. Jacinto, *Mammalian TOR signaling to the AGC kinases.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2011. **46**(6): p. 527-47.

154. Crino, P.B., *Rapamycin and tuberous sclerosis complex: from Easter Island to epilepsy.* Ann Neurol, 2008. **63**(4): p. 415-7.

155. Sehgal, S.N., H. Baker, and C. Vezina, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.* J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 727-32.

156. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.* J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721-6.

157. Douros, J. and M. Suffness, *New antitumor substances of natural origin.* Cancer Treat Rev, 1981. **8**(1): p. 63-87.

158. Eng, C.P., S.N. Sehgal, and C. Vezina, *Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors.* J Antibiot (Tokyo), 1984. **37**(10): p. 1231-7.

159. Martel, R.R., J. Klicius, and S. Galet, *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic.* Can J Physiol Pharmacol, 1977. **55**(1): p. 48-51.

160. Wiederrecht G, E.F., *The Immunophilins.* Perspec Drug Discovery Design, 1994. **2**: p. 57-84.

161. Koltin, Y., et al., *Rapamycin sensitivity in Saccharomyces cerevisiae is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1718-23.

162. 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. 905-9.

163. Meissner, B., et al., *Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in Caenorhabditis elegans.* J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36739-45.

164. Miron, M. and N. Sonenberg, *Regulation of translation via TOR signaling: insights from Drosophila melanogaster.* J Nutr, 2001. **131**(11): p. 2988S-93S.

165. Sabers, C.J., et al., *Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 815-22.

166. Brown, E.J., et al., *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.* Nature, 1994. **369**(6483): p. 756-8.

167. Chen, Y., et al., *A putative sirolimus (rapamycin) effector protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(1): p. 1-7.

168. Chiu, M.I., H. Katz, and V. Berlin, *RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12574-8.

169. Sabatini, D.M., et al., *The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 20875-8.

170. Lench, N.J., R. Macadam, and A.F. Markham, *The human gene encoding FKBP-rapamycin associated protein (FRAP) maps to chromosomal band 1p36.2.* Hum Genet, 1997. **99**(4): p. 547-9.

171. Kunz, J., et al., *Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression.* Cell, 1993. **73**(3): p. 585-96.

172. Keith, C.T. and S.L. Schreiber, *PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints.* Science, 1995. **270**(5233): p. 50-1.

173. Chen, J., et al., *Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4947-51.

174. Lorenz, M.C. and J. Heitman, *TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27531-7.

175. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR.* Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 807-26.

176. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR.* Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.

177. Jacinto, E. and M.N. Hall, *Tor signalling in bugs, brain and brawn.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(2): p. 117-26.

178. Perry, J. and N. Kleckner, *The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins.* Cell, 2003. **112**(2): p. 151-5.

179. Dames, S.A., et al., *The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability.* J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20558-64.

180. Ramirez-Rangel, I., et al., *Regulation of mTORC1 Complex Assembly and Signaling by GRp58/ERp57.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(8): p. 1657-71.

181. Sarbassov, D.D. and D.M. Sabatini, *Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex.* J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39505-9.

182. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB.* Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 159-68.

183. Panasyuk, G., et al., *mTORbeta splicing isoform promotes cell proliferation and tumorigenesis.* J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 30807-14.

184. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.* Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-80.

185. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 307-18.

186. Kim, J.E. and J. Chen, *regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis.* Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2748-56.

187. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth.* Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 224-36.

188. Huffman, T.A., I. Mothe-Satney, and J.C. Lawrence, Jr., *Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 1047-52.

189. Ganley, I.G., et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy.* J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12297-305.

190. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1981-91.

191. Jung, C.H., et al., *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1992-2003.

192. Garcia-Martinez, 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).* Biochem J, 2008. **416**(3): p. 375-85.

193. Ikenoue, T., et al., *Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling.* EMBO J, 2008. **27**(14): p. 1919-31.

194. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.

195. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton.* Curr Biol, 2004. **14**(14): p. 1296-302.

196. Hernandez-Negrete, I., et al., *P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration.* J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23708-15.

197. Liu, L., et al., *mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion.* Dev Cell, 2010. **19**(6): p. 845-57.

198. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.* Nature, 2006. **441**(7092): p. 424-30.

199. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.

200. 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.* Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 151-62.

201. Potter, C.J., L.G. Pedraza, and T. Xu, *Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 658-65.

202. Ballif, B.A., et al., *Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous*

*sclerosis tumor suppressors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 667-72.

203. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis.* Cell, 2005. **121**(2): p. 179-93.

204. Roux, P.P., et al., *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13489-94.

205. Kwiatkowski, D.J. and B.D. Manning, *Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways.* Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No. 2**: p. R251-8.

206. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *Rheb fills a GAP between TSC and TOR.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 573-6.

207. Tee, A.R., et al., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb.* Curr Biol, 2003. **13**(15): p. 1259-68.

208. Long, X., et al., *Rheb binds and regulates the mTOR kinase.* Curr Biol, 2005. **15**(8): p. 702-13.

209. Long, X., et al., *Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency.* J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23433-6.

210. Carriere, A., et al., *Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation.* Curr Biol, 2008. **18**(17): p. 1269-77.

211. Sancak, Y., et al., *PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase.* Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 903-15.

212. Vander Haar, E., et al., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 316-23.

213. Wang, L., et al., *PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding.* J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 20036-44.

214. Fonseca, B.D., et al., *PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex.* J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24514-24.

215. Oshiro, N., et al., *The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1.* J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20329-39.

216. Inoki, K., et al., *TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth.* Cell, 2006. **126**(5): p. 955-68.

217. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.* Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.

218. Hara, K., et al., *Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism.* J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14484-94.

219. Lindsley, J.E. and J. Rutter, *Nutrient sensing and metabolic decisions.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2004. **139**(4): p. 543-59.

220. Nicklin, P., et al., *Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy.* Cell, 2009. **136**(3): p. 521-34.

221. Nobukuni, T., et al., *Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14238-43.

222. Findlay, G.M., et al., *A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling.* Biochem J, 2007. **403**(1): p. 13-20.

223. Kim, E., et al., *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 935-45.

224. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1.* Science, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.

225. Tato, I., et al., *Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling.* J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6128-42.

226. Lee, D.F., et al., *IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway.* Cell, 2007. **130**(3): p. 440-55.

227. Dan, H.C., M. Adli, and A.S. Baldwin, *Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha.* Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6263-9.

228. Foster, D.A., *Regulation of mTOR by phosphatidic acid?* Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 1-4.

229. Toschi, A., et al., *Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1411-20.

230. Gan, X., et al., *Evidence for Direct Activation of mTORC2 Kinase Activity by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate.* J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 10998-1002.

231. Huang, J., et al., *The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 4104-15.

232. Martin, J., et al., *Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(4): p. 578-83.

233. Kahn, B.B., et al., *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.* Cell Metab, 2005. **1**(1): p. 15-25.

234. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.* Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.

235. Shaw, R.J., et al., *The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling.* Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 91-9.

236. Takayama, S. and J.C. Reed, *Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(10): p. E237-41.

237. Song, J., M. Takeda, and R.I. Morimoto, *Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 276-82.

238. Kabbage, M. and M.B. Dickman, *The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(9): p. 1390-402.

239. Gotz, R., et al., *Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells.* Nat Neurosci, 2005. **8**(9): p. 1169-78.

240. Briknarova, K., et al., *BAG4/SODD protein contains a short BAG domain.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31172-8.

241. Sondermann, H., et al., *Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors.* Science, 2001. **291**(5508): p. 1553-7.

242. Brehmer, D., et al., *Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(5): p. 427-32.

243. Brive, L., et al., *The carboxyl-terminal lobe of Hsc70 ATPase domain is sufficient for binding to BAG1.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 1099-105.

244. Sondermann, H., et al., *Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33220-7.

245. Arakawa, A., et al., *The C-terminal BAG domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 nucleotide-binding domain for ADP-ATP exchange.* Structure, 2010. **18**(3): p. 309-19.

246. Takayama, S., et al., *Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity.* Cell, 1995. **80**(2): p. 279-84.

247. Kalia, S.K., et al., *BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration.* Neuron, 2004. **44**(6): p. 931-45.

248. Kalia, L.V., et al., *Ubiquitinylation of alpha-synuclein by carboxyl terminus Hsp70-interacting protein (CHIP) is regulated by Bcl-2-associated athanogene 5 (BAG5).* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e14695.

249. Bruchmann, A., et al., *Bcl-2 associated athanogene 5 (Bag5) is overexpressed in prostate cancer and inhibits ER-stress induced apoptosis.* BMC Cancer, 2013. **13**: p. 96.

250. Ying, Z., G. Haiyan, and G. Haidong, *BAG5 regulates PTEN stability in MCF-7 cell line.* BMB Rep, 2013. **46**(10): p. 490-4.

251. Obenauer, J.C., L.C. Cantley, and M.B. Yaffe, *Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3635-41.

252. Esser, C., S. Alberti, and J. Hohfeld, *Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 171-88.

253. Doong, H., et al., *CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins.* J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28490-500.

254. Ni, M. and A.S. Lee, *ER chaperones in mammalian development and human diseases.* FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3641-51.

255. Turano, C., et al., *ERp57/GRP58: a protein with multiple functions.* Cell Mol Biol Lett, 2011. **16**(4): p. 539-63.

256. Garbi, N., et al., *Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57.* Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 93-102.

257. Grillo, C., et al., *Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors.* Free Radic Biol Med, 2006. **41**(7): p. 1113-23.

258. Chichiarelli, S., et al., *Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line.* Arch Biochem Biophys, 2010. **494**(2): p. 178-83.

259. Coe, H., et al., *ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum.* J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6725-38.

260. McClellan, A.J., et al., *Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 736-41.

261. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.

262. Burke, R.E., *Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism.* J Neurochem, 2008. **104**(4): p. 875-90.

263. Fallon, L., et al., *A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 834-42.

264. Imai, Y., M. Soda, and R. Takahashi, *Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35661-4.

265. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.* Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-5.

266. Moore, D.J., *Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 749-53.

267. Moore, D.J., et al., *Parkin mediates the degradation-independent ubiquitination of Hsp70.* J Neurochem, 2008. **105**(5): p. 1806-19.

268. Tamo, W., et al., *Parkin is expressed in vascular endothelial cells.* Neurosci Lett, 2007. **419**(3): p. 199-201.

269. Vazquez-Prado, J., J. Basile, and J.S. Gutkind, *Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors.* Methods Enzymol, 2004. **390**: p. 259-85.

270. Zeng, X.C., et al., *Hsp70 dynamics in vivo: effect of heat shock and protein aggregation.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 21): p. 4991-5000.

271. Zhang, Y., et al., *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13354-9.

272. Murga, C., S. Fukuhara, and J.S. Gutkind, *A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt.* J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12069-73.

273. Geback, T., et al., *TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays.* Biotechniques, 2009. **46**(4): p. 265-74.

274. Bellacosa, A., et al., *Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain.* Oncogene, 1998. **17**(3): p. 313-25.

275. Doong, H., A. Vrailas, and E.C. Kohn, *What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins.* Cancer Lett, 2002. **188**(1-2): p. 25-32.

276. Oh, W.J., et al., *mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide.* EMBO J, 2010. **29**(23): p. 3939-51.

277. Jiang, J., et al., *CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation.* J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 42938-44.

278. Paul, I., et al., *The ubiquitin ligase CHIP regulates c-Myc stability and transcriptional activity.* Oncogene, 2013. **32**(10): p. 1284-95.

279. Qian, S.B., et al., *CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70.* Nature, 2006. **440**(7083): p. 551-5.

280. Shang, Y., et al., *CHIP functions an E3 ubiquitin ligase of Runx1.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(1): p. 242-6.

281. Kohn, A.D., F. Takeuchi, and R.A. Roth, *Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation.* J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21920-6.

282. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism.* Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.

283. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity.* Cell, 2006. **127**(1): p. 125-37.

284. Holmes, D., *PI3K pathway inhibitors approach junction.* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 563-4.

285. Du, K., et al., *TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver.* Science, 2003. **300**(5625): p. 1574-7.

286. McDonough, H. and C. Patterson, *CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems.* Cell Stress Chaperones, 2003. **8**(4): p. 303-8.

287. Fontana, J., et al., *Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release.* Circ Res, 2002. **90**(8): p. 866-73.

288. Kageyama, K., et al., *Overexpression of calreticulin modulates protein kinase B/Akt signaling to promote apoptosis during cardiac differentiation of cardiomyoblast H9c2 cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19255-64.

289. Mearow, K.M., et al., *Stress-mediated signaling in PC12 cells - the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal.* J Neurochem, 2002. **83**(2): p. 452-62.

290. Rane, M.J., et al., *Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation.* J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27828-35.

291. Adachi, M., et al., *Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): p. 77-80.

292. Fan, Y., et al., *Proteasome-dependent inactivation of Akt is essential for 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells.* Apoptosis, 2008. **13**(12): p. 1401-9.

293. Imai, Y., et al., *CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity.* Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 55-67.

294. Li, F., et al., *C terminus of Hsc70-interacting protein promotes smooth muscle cell proliferation and survival through ubiquitin-mediated degradation of FoxO1.* J Biol Chem, 2009. **284**(30): p. 20090-8.

295. Li, W., et al., *Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling.* PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1487.

296. Yang, W.L., et al., *The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation.* Science, 2009. **325**(5944): p. 1134-8.

297. Wu, Y.T., et al., *mTOR complex 2 targets Akt for proteasomal degradation via phosphorylation at the hydrophobic motif.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14190-8.

298. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.* Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.

299. Meric-Bernstam, F. and A.M. Gonzalez-Angulo, *Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy.* J Clin Oncol, 2009. **27**(13): p. 2278-87.

300. Wang, X. and S.Y. Sun, *Enhancing mTOR-targeted cancer therapy.* Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(10): p. 1193-203.

301. Talvas, J., et al., *Phospho-proteomic approach to identify new targets of leucine deprivation in muscle cells.* Anal Biochem, 2008. **381**(1): p. 148-50.

302. Tokutomi, Y., et al., *Oxidation of Prx2 and phosphorylation of GRP58 by angiotensin II in human coronary smooth muscle cells identified by 2D-DIGE analysis.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(4): p. 822-30.

303. Kita, K., et al., *Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin.* FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 199-205.

304. 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. 163-75.

305. Kim, D.H. and D.M. Sabatini, *Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex.* Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **279**: p. 259-70.

306. Oshiro, N., et al., *Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function.* Genes Cells, 2004. **9**(4): p. 359-66.

307. Huang, S. and P.J. Houghton, *Targeting mTOR signaling for cancer therapy.* Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(4): p. 371-7.

308. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress.* Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 310-22.

# A. Artículo original: Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Apr. 2011, p. 1657–1671 Vol. 31, No. 8
0270-7306/11/$12.00 doi:10.1128/MCB.00824-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# Regulation of mTORC1 Complex Assembly and Signaling by GRp58/ERp57▽†

Iliana Ramírez-Rangel,[1]‡ Ismael Bracho-Valdés,[1]‡ Aleida Vázquez-Macías,[1] Jorge Carretero-Ortega,[1] Guadalupe Reyes-Cruz,[2] and José Vázquez-Prado[1]*

*Departments of Pharmacology[1] and Cell Biology,[2] CINVESTAV-IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, 07360, Apartado Postal 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico*

Received 16 July 2010/Returned for modification 8 August 2010/Accepted 28 January 2011

**The mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cell growth and survival via two different multiprotein complexes, mTORC1 and mTORC2. The assembly of these serine-threonine kinase multiprotein complexes occurs via poorly understood molecular mechanisms. Here, we demonstrate that GRp58/ERp57 regulates the existence and activity of mTORC1. Endogenous mTOR interacts with GRp58/ERp57 in different mammalian cells. *In vitro*, recombinant GRp58/ERp57 preferentially interacts with mTORC1. GRp58/ERp57 knockdown reduces mTORC1 levels and phosphorylation of 4E-BP1 and $p70^{S6K}$ in response to insulin. In contrast, GRp58/ERp57 overexpression increases mTORC1 levels and activity. A redox-sensitive mechanism that depends on GRp58/ERp57 expression activates mTORC1. Although GRp58/ERp57 is known as an endoplasmic reticulum (ER) resident, we demonstrate its presence at the cytosol, together with mTOR, Raptor, and Rictor as well as a pool of these proteins associated to the ER. In addition, the presence of GRp58/ERp57 at the ER decreases in response to insulin or leucine. Interestingly, a fraction of $p70^{S6K}$, but not 4E-BP1, is associated to the ER and phosphorylated in response to serum, insulin, or leucine. Altogether, our results suggest that GRp58/ERp57 is involved in the assembly of mTORC1 and positively regulates mTORC1 signaling at the cytosol and the cytosolic side of the ER.**

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a highly conserved Ser/Thr kinase that plays a critical role in fundamental cellular processes such as cell metabolism, growth, proliferation, and migration (10, 14, 22, 44, 52, 54, 55). This kinase is a component of signal transduction cascades activated by growth factor receptors and constitutes an intracellular sensor of nutrient availability, hypoxia, DNA damage, and osmotic stress (3, 24, 44, 55). mTOR exists in two different multiprotein complexes differentially sensitive to the inhibitory effect of rapamycin (32, 40). The rapamycin-sensitive mTOR complex 1 (mTORC1), which regulates protein synthesis and cell growth, consists of mTOR, Raptor, and mLST8 (previously known as GβL) (29). mTORC1 phosphorylates two regulators of protein synthesis: the ribosomal S6 kinase (S6K1) and the inhibitory partner of the translation initiation factor 4E (4E-BP1) (14). Qian and colleagues recently expanded the paradigm on mTORC1 regulation by demonstrating that mTORC1 serves as a sensor of the extent of protein misfolding, helping to maintain the right balance of protein synthesis and degradation (39). The mTOR complex 2 (mTORC2) contains mTOR, Rictor, Sin1, and mLST8. Its catalytic activity is not sensitive to rapamycin although prolonged treatment disrupts the assembly of this complex in certain cell lines (38, 45). mTORC2 has been recognized as the elusive kinase that phosphorylates Akt at serine 473, promoting the maximum activity of this important kinase, implicated in the control of cell survival, metabolism, proliferation, and growth (18, 25, 44, 46). We recently reported that mTORC2 interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF), resulting in Rac activation and cell migration (22). The mechanisms that regulate the formation and stability of mTOR complexes are not completely understood although it is known that both mTORC1 and mTORC2 complexes are regulated by phosphatidic acid (50) and by a complex formed by Tti1 and Tel2 (27), while nutrient availability and redox status have an effect on mTORC1 (47), opening the possibility that proteins that sense cellular redox status can be involved in the assembly of mTORC1 complex.

GRp58 (also known as ERp57) is a widely expressed protein disulfide isomerase that regulates protein-protein interactions via a redox mechanism based on the activity of its two thioredoxin-like domains (28, 37). It has a recognized chaperone function via a mechanism that involves a reduction of disulfide bonds in preformed protein complexes (28, 37). The physiological importance of GRp58 is highlighted by the finding that genetic knockout of GRp58 in mice leads to embryonic lethality (5, 15, 37). GRp58 participates in the assembly of the major histocompatibility complex (16). Although GRp58 has been mainly characterized by its actions at the endoplasmic reticulum (ER), GRp58 knockout cells do not reveal a dramatic effect on ER morphology or function but show an increase in STAT3-dependent signaling, which is attenuated by transfected GRp58 targeted to the ER (5), further supporting the emerging role of GRp58 as a regulator of cytokine-dependent signal transduction and gene expression (4, 35, 51). Available evidence confirms the existence of cytosolic and nuclear pools of GRp58 able to interact with STAT3 (5, 19); moreover,

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Farmacología CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, Apartado postal 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico. Phone: 52 55 5747 3380. Fax: 52 55 5747 3394. E-mail: jvazquez@cinvestav.mx.

‡ I.R.-R. and I.B.-V. contributed equally to this work.

† Supplemental material for this article may be found at http://mcb.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 14 February 2011.

GRp58 is phosphorylated in response to leptin, further supporting its role as a regulator of cytokine-dependent signal transduction (31). In addition, GRp58 alters the dimerization and DNA-binding ability of the E2A subfamily of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins which, upon reduction, can heterodimerize with other bHLH proteins (34). GRp58 has been recognized as a cellular redox sensor that, as part of a cell-adaptative response to oxidative insults, cooperates with Ref-1 in the regulation of gene expression mediated by redox-sensitive transcription factors (17).

The finding that a redox-sensitive mechanism regulates the activity of mTORC1 and the interaction between Raptor and mTOR (47) suggests that proteins with redox-sensing ability are potentially involved in the assembly of mTOR complexes. Here, we describe the identification of GRp58 as an mTOR-interacting protein that modulates the assembly and activity of mTORC1.

## MATERIALS AND METHODS

**Yeast two-hybrid screening.** To generate the bait used for yeast two-hybrid screening, we subcloned the mTOR kinase domain into pGB3 in frame with the sequence coding for the GAL4 DNA-binding domain. A human placenta cDNA library (Clontech) was screened with the mTOR kinase domain using the Matchmaker System III (Clontech) following both the manufacturer's instruction and those of Vazquez-Prado et al. (53). Putative interacting clones were obtained by selecting transformants in medium lacking His/Leu/Trp and checked for α-galactosidase expression by an α-X-Gal (where X-Gal is 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) assay. The specificity of the interaction was determined using pGBKT7-p53 as bait and simian virus 40 (SV40) large T antigen as prey.

**DNA constructs.** prk5-myc-Rictor (Addgene plasmid 1860), prk5-myc-Raptor (Addgene plasmid 1859), and prk5-HA-GβL (where HA is hemagglutinin) (Addgene plasmid 1865) were obtained from Sabatini (43). GRp58 cDNA was subcloned from the yeast two-hybrid prey vector, pACT2-GRp58, into the pCEFL mammalian expression vector harboring three copies of a Flag tag (pCEFL-3×Flag). For pulldown experiments, the mTOR kinase domain was subcloned in frame with the sequence coding for glutathione *S*-transferase (GST) into the mammalian expression vector pCEFL-GST. Yellow fluorescent protein (YFP)-mTOR (pcDNA3/YFP-mTOR) was kindly donated by Shu-Bing Qian, Cornell University (39); fluorescent markers for endoplasmic reticulum (cyan fluorescent protein [CFP]-ER, mitochondria (yellow fluorescent protein [YFP]-tagged), and plasma membrane (monomeric red fluorescent protein [mRFP]-CAAX) were kindly donated by Gyorgy Hajnoczky, Thomas Jefferson University. Enhanced green fluorescent protein (EGFP)-Golgi marker was donated by Tamas Balla, NIH; mCherry-GRp58 was prepared by subcloning GRp58 cDNA from pCEFL-EGFP-GRp58 into pCEFL-mCherry. GST-ERp57 (pGEX-4T-2-DTNDTC-ERp57) was donated by James D. Lechleiter, University of Texas Health Science Center at San Antonio. The short hairpin RNA (shRNA) for GRp58 (shGRp58) was generated based on the sequence of the hairpin (TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGACCCATATGGGAATTATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATAATTCCCATATGGGTCCTTGCCTACTGCCTCGGA) and cloned into pENTR vector, pEN_EmiRc3, and pDSL_hpIP. All other constructs have been previously described (22).

**Cell culture and transfection.** The human embryonic kidney 293 (HEK293) and HEK293T cell lines and COS-7 cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μg/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 250 ng/ml amphotericin B (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% $CO_2$. Cells grown in 10-cm diameter dishes were transfected using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, with 2 μg of each plasmid. Five hours after the initiation of transfection, the medium was replaced with complete DMEM. Cells were used at 48 h posttransfection.

**Immunoprecipitation, pulldown, and Western blot assays.** In mammalian HEK293T cells, the interaction between transfected GRp58 and the kinase domain of mTOR was assessed using mammalian expression constructs of the mTOR kinase domain fused to GST and Flag-tagged GRp58. Two days after transfection, the GST-mTOR kinase domain was isolated by pulldown using glutathione-Sepharose beads, and interacting GRp58 was revealed by Western blotting using anti-Flag antibodies. The potential association of GRp58 to mTORC1 and mTORC2 complexes was assessed by immunoprecipitation of transfected myc-Raptor or myc-Rictor, specific components of each complex, respectively, followed by Western blotting against Flag-GRp58. In order to assess a potential preferential binding of GRp58 with either of the two mTOR complexes, the association of endogenous mTORC1 and mTORC2 with recombinant, bacterially expressed GRp58 was assessed by pulldown; as a control, bacterially expressed GST fused to the Cdc42-Rac interactive binding (CRIB) domain of PAK (GST-PAK-N) was used. Interaction between endogenous mTOR and GRp58 was assessed in HEK293T or HeLa cells maintained in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FBS or in human microvascular endothelial cells (HMEC) maintained in MCDB-131 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF), and 1 μg/ml of hydrocortisone (Sigma). To evaluate whether the interaction of mTOR and GRp58 is modulated by various stimuli, HEK293T cells were deprived of nutrients during 3 h and stimulated for 15 min with 10% FBS, 100 nM insulin, or 52 μg/ml leucine. The effect of rapamycin on the interaction was assessed in cells incubated for 1 or 24 h with this agent. The effect of phenylarsine oxide (PAO) as a modulator of the interaction of mTOR and GRp58 and as an activator of mTORC1 or mTORC2 was assessed in control and GRp58 knockdown HEK293T cells. To obtain whole-cell lysates, cells in 10-cm dishes were placed on ice, rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS), lysed in 1 ml of ice-cold buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 0.3% CHAPS) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin), and immunoprecipitated with anti-mTOR (Santa Cruz), anti-Myc (Covance), or anti-PTEN (Santa Cruz) antibodies. Precipitated proteins were washed four times in 0.3% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) buffer, loaded onto 6% or 10% SDS-PAGE gels, detected by Western blotting using anti-mTOR (Cell Signaling), anti-GRp58 (Santa Cruz), anti-Myc, anti-HA (Covance), anti-Raptor (Cell Signaling), or anti-Rictor (Cell Signaling) antibodies, and revealed with a West Pico system (Pierce Biotechnology) or Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore).

To test whether GRp58 played a role in the phosphorylation of mTORC1 or mTORC2 downstream substrates, HEK293 cells were transfected with Flag-GRp58 or GRp58 shRNA as described earlier. In the case of GRp58 overexpression experiments, 2 or 3 days after transfection (as indicated in figure legends) cells were serum starved for 3 h and then stimulated with 25 nM insulin (5 min) prior to cell lysis. In the case of the knockdown experiments, in which the signaling of mTOR was assessed, transfected cell populations were selected with puromycin. The lysates were analyzed by Western blotting with GRp58 (ERp57) to confirm either overexpression (by at least twice the control levels) or the knockdown (by a reduction of at least half of the endogenous levels of control lysates). The lysates were then used to detect the phosphorylation of different proteins using the following antibodies: phospho-Akt-Ser473 from Santa Cruz Biotechnology; Akt and Flag from Sigma; phospho-$p70^{S6K}$-Thr389, $p70^{S6K}$, phospho-S6-Ser240/244, S6, phospho-4E-BP1-Thr37/46, 4E-BP1, phospho-Akt-Thr450, phospho-glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β)-Ser9, phospho-GSK-3β-mTOR-Ser2448, and mTOR from Cell Signaling Technology. Peroxidase-labeled secondary antibodies were from KPL. Bands were visualized using a West Pico system (Pierce Biotechnology) or Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore).

**Subcellular fractionation.** All the procedures were done on ice; confluent HEK293 cells were washed with ice-cold PBS and then harvested in buffer A (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Harvested cells were disrupted using a Dounce homogenizer by giving 40 strokes. Then, subcellular fractionation was performed by differential centrifugation. Cell homogenates were centrifuged at 800 × *g* for 10 min at 4°C, pellet fractions were discarded, and supernatants were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were centrifuged at 100,000 × *g* for 1 h at 4°C to obtain the endoplasmic reticulum pellet and the cytosolic fraction. The ER pellets were washed with the same buffer and then solubilized in SDS-PAGE sample buffer; the cytosolic fraction was mixed with TNTE buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors. Subsequently, 10 μg of protein was analyzed by Western blotting after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purity of the fractions was confirmed by Western blotting detecting the presence of the specific marker SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase) in the ER and 4E-BP1 in the cytosol. Anti-SERCA mouse monoclonal antibodies were from Affinity (catalog number MA3919).

**Effect of nutrients on the subcellular distribution of mTOR and GRp58.** The effect of fetal bovine serum, insulin, or leucine on the subcellular distribution of mTOR, Raptor, Rictor, 4E-BP1, $p70^{S6K}$, and GRp58 was analyzed on HEK293 cells. In brief, cells were serum starved overnight in DMEM or in DMEM without leucine and stimulated with either 10% FBS, 100 nM insulin, or 52 μg/ml

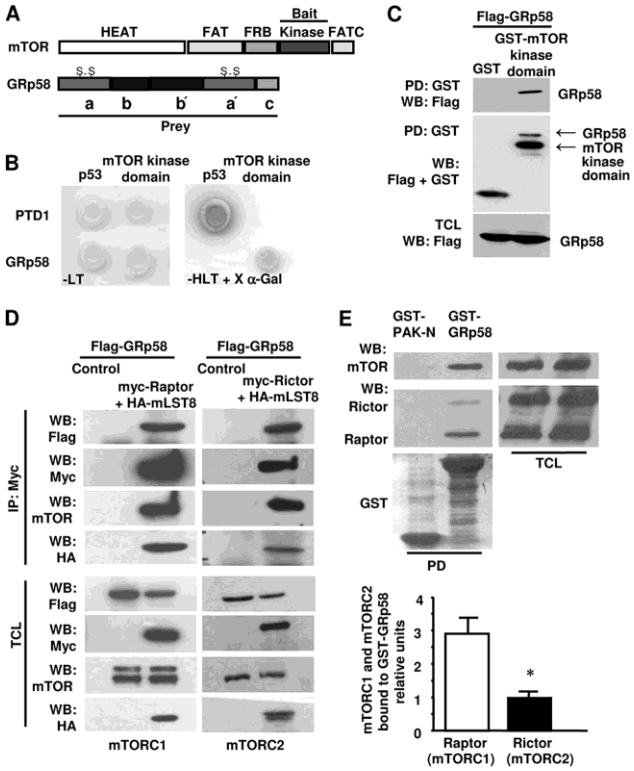



FIG. 1. Identification of GRp58 as an mTOR-interacting protein. (A) Schematic representation of the domains of mTOR depicting the bait used in the yeast two-hybrid screen and the domains of GRp58 depicting the prey that was obtained. (B) GRp58 and a control (T antigen) were tested for interaction with the bait (mTOR kinase domain) or p53 as a control. Yeast grew in medium lacking leucine and tryptophan (−LT), which selects for the presence of the plasmids, and the ones displaying interaction grew under stringency conditions (medium lacking histidine, leucine, and tryptophan [-HLT]). (C) The kinase domain of mTOR fused to GST (GST-mTOR kinase domain) interacts with Flag-GRp58 in HEK293T cells. HEK293T cells were transfected with Flag-GRp58 and GST-mTOR kinase domain or control GST. Total cell lysates were affinity purified with glutathione beads, and both total cell lysates (TCL; bottom panel) and pulldowns (PD upper and middle panels) were resolved on SDS-polyacrylamide gels and analyzed by immunoblotting. WB, Western blotting. (D) Flag-GRp58 is present in multiprotein complexes that contain transfected myc-Raptor (left panel) or myc-Rictor (right panel), HA-mLST8, and mTOR. Two days after transfection, HEK293T cells expressing 3×Flag-GRp58, HA-mLST8, and myc-Raptor or myc-Rictor were used for immunoprecipitations (IP) with anti-Myc antibodies. The presence of 3×Flag-GRp58, HA-mLST8, and endogenous mTOR immunoprecipitated with myc-Raptor or myc-Rictor was assessed by Western blotting using the indicated antibodies. The expression of Flag-GRp58 and mTOR and other indicated proteins was detected in total lysates (TCL) of cells transfected with components of mTORC1 or mTORC2. (E) Recombinant GRp58 shows preferential affinity for endogenous mTORC1 over endogenous mTORC2 expressed in HEK293T cells. Total cell lysates of HEK293T cells expressing comparable amounts of Raptor and Rictor were incubated with glutathione Sepharose beads containing recombinant GST-GRp58 or GST-PAK-N (used as control) previously isolated from bacteria. The presence of endogenous Raptor, Rictor, and mTOR in the GST-GRp58 or GST-PAK-N pulldowns (PD) or total cell lysates was detected by Western blotting. The graph represents the mean and standard error of the mean of four independent experiments. *, $P < 0.05$.

leucine for 5 min. Cells were washed with ice-cold PBS and subjected to the subcellular fractionation protocol.

**Fluorescence microscopy.** The subcellular distribution of fluorescence-tagged mTOR, GRp58, and different membrane markers was assessed in COS-7 cells grown on glass-bottom petri dishes and transfected with the DNAs indicated in the Fig. 9 legend using the Lipofectamine Plus method (Invitrogen). At 24 h after transfection, cells were incubated for a couple of hours in Krebs-Ringer buffer, pH 7.4, and then stimulated with L-leucine (52 μg/ml) or PAO (5 μM). The localization of mTOR, GRp58, and different membrane markers was assessed in live cells using an inverted Nikon Eclipse Ti-E fluorescence microscope, equipped with autofocus system. In addition, control and stimulated cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 20 min at room temperature. Images of fixed cells were acquired with the same microscope using a 60× (numerical aperture, 1.4) oil immersion objective and a zoom of ×1.5. The colocalization analysis was done with the Nikon NIS-Elements software.

**Proliferation assay.** HEK293T cells transiently transfected with GRp58 shRNA or 3×Flag-GRp58 were plated in 96-well flat-bottom plates (10,000 per well) in 100 μl of DMEM. At 36 h posttransfection, cells were starved of serum for 3 h; after this time they were treated with 100 nM insulin and 10% FBS for 24 h. For the last 4 h of the 24-h stimulation period, the cells were pulsed with

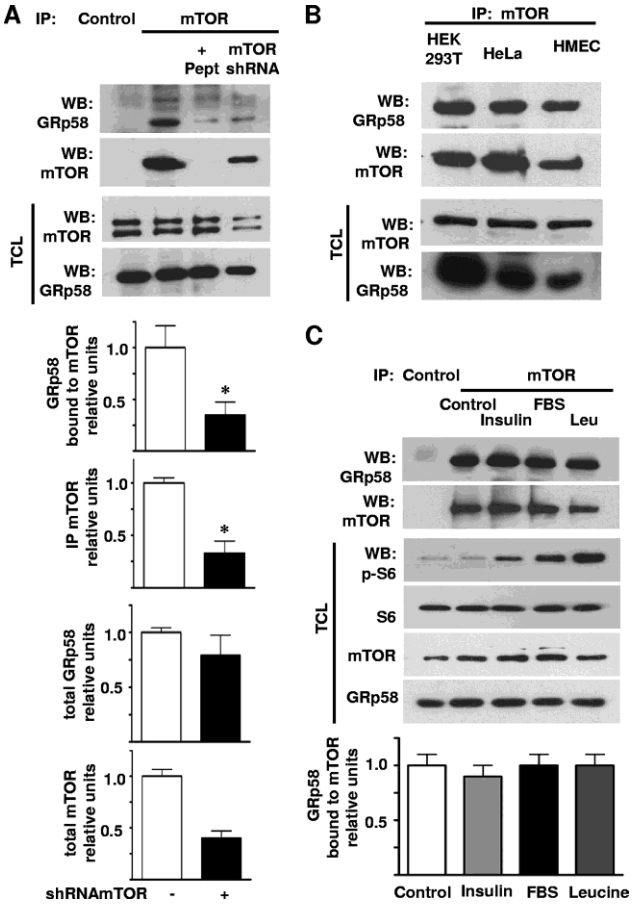



FIG. 2. Endogenous GRp58 interacts with mTOR. (A) The interaction between endogenous GRp58 and mTOR was assessed by immunoprecipitation (IP) followed by Western blotting (WB) using lysates from HEK293T cells. Endogenous mTOR was immunoprecipitated, and endogenous GRp58 was found associated with it. The specificity of the interaction was determined using a peptide competing with mTOR antibodies (+Pept), a lysate from cells in which mTOR was knocked down (mTOR shRNA), or a goat antibody used as a negative control (Control). The presence of GRp58 and mTOR was detected in the immunoprecipitates (upper two panels) and total lysates (TCL; lower two panels) using the indicated antibodies that recognize endogenous proteins. Graphs represent the mean and standard error of the mean of three independent experiments. *, $P < 0.05$ compared to the respective control. (B) The interaction between endogenous GRp58 and mTOR was assessed by immunoprecipitation followed by immunoblotting using lysates from HEK293T and HeLa cells and HMEC as described for panel A. The presence of GRp58 and mTOR was detected in the immunoprecipitates (upper two panels) and total lysates (lower two panels) using the indicated antibodies that recognize endogenous proteins. (C) Effect of various stimuli on the interaction between GRp58 and mTOR. HEK293T cells were serum starved in leucine-free medium for 3 h and then stimulated for 15 min with 10% FBS, 100 nM insulin, or 52 μg/ml leucine as indicated. mTOR was immunoprecipitated, and the presence of GRp58 and mTOR in the immunoprecipitates was detected by Western blotting. Immunoprecipitation with an equal amount of goat antibody was used to control for nonspecific binding (Control). Total cell lysates were used to confirm the activation of mTOR by detecting the phosphorylation of S6. The expression of S6, mTOR, and GRp58 in total lysates was confirmed by Western blotting. The graph at the bottom represents the mean and standard error of the mean of three independent experiments. (D) The oxidizing agent PAO decreases the interaction between GRp58 and mTOR. HEK293 cells were stimulated with PAO (5 μM for 30 min). Then, mTOR was immunoprecipitated from total cell lysates prepared in CHAPS buffer, and the presence of interacting GRp58 and mTOR was detected by Western blotting. The graph represents the mean and standard error of the mean of four independent experiments. *, $P < 0.05$. Total cell lysates from the same experiments were used to detect the presence of GRp58, mTOR, or the indicated proteins and their phosphorylated (p-) versions, i.e., p-S6K and p-4E-BP1 to assess the activation of mTORC1 and p-AKT to assess the activation of mTORC2. The effect of short-term (1 h) and long-term (24 h) incubation with rapamycin (Rapa; 20 ng/ml) in cells stimulated with insulin (100 nM for 15 min) was assessed in parallel. Equivalent experiments were done to assess the effect of PAO or rapamycin on the interaction between Raptor and mTOR (E) or Rictor and mTOR (F).

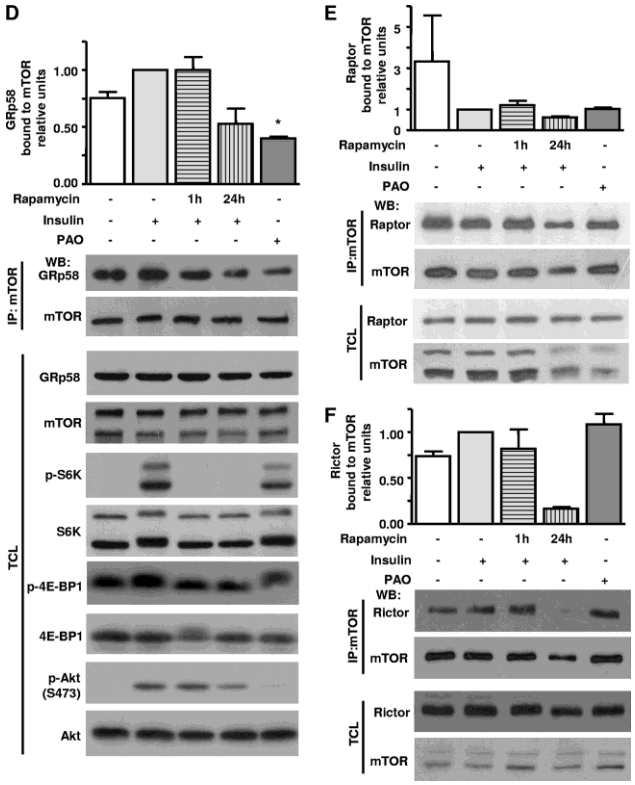



FIG. 2—*Continued.*

bromodeoxyuridine (BrdU). Cell proliferation was measured using a BrdU enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from Roche (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Absorbance at 405 and 492 nm was measured with a microplate reader (Model 550; Bio-Rad, Hercules, CA).

**Statistical analysis.** Statistical significance of the differences among data was determined by analysis of variance and a Student-Newman-Keuls test using GraphPad Prism, version 2.0, software (GraphPad Software, San Diego, CA). A $P$ value of $<0.05$ was considered a statistically significant difference.

## RESULTS

**Identification of GRp58 as an mTOR-interacting protein.** mTOR consists of several functional domains involved in diverse protein-protein interactions (Fig. 1A). In order to identify novel mTOR-interacting partners potentially involved in the regulation of mTOR complexes, we screened a human placental cDNA library using the kinase domain of mTOR as bait in a yeast two-hybrid system. We identified full-length GRp58 as an mTOR-interacting protein (Fig. 1A). In the yeast two-hybrid system, the clone corresponding to GRp58 (prey) interacted specifically with the kinase domain of mTOR; this interaction was specific, as indicated by the growth in restrictive medium, lacking histidine, leucine, and tryptophan (Fig. 1B, −HLT), of yeast transformed just with the combination of the mTOR kinase domain and GRp58 or of the positive control of the system composed of p53 and T antigen, and by the ability of GRp58 and mTOR to promote the expression of α-galactosidase from an integrated reporter system (Fig. 1B). To assess in mammalian cells the interaction of GRp58 with the kinase domain of mTOR, 3×Flag-tagged full-length GRp58 and the kinase domain of mTOR fused to GST were transfected into the human epithelial cell line HEK293T. The corresponding cell extracts were incubated with glutathione-Sepharose beads; GRp58 was detected in GST-mTOR kinase domain pulldown but not in a GST pulldown used as a control (Fig. 1C). Since mTOR exists in two functionally different complexes, mTORC1 and mTORC2, both containing mLST8 but identifiable by distinct associated proteins (Raptor and Rictor, respectively) (25, 29, 38), we investigated whether GRp58 could interact with each mTOR complex. In order to address this question, we explored the presence of GRp58 in mTORC1, isolated by immunoprecipitating myc-tagged Raptor, and in mTORC2, isolated by immunoprecipitating myc-tagged Rictor, using lysates from HEK293T cells transfected

with 3×Flag-GRp58, HA-mLST8, and either myc-Raptor or myc-Rictor. GRp58 was detected in both mTORC1 and mTORC2 immunoprecipitates (Fig. 1D). As expected, mTOR and mLST8 were found as constituents of both complexes (Fig. 1D). We next tested whether recombinant GRp58, under conditions in which it has the opportunity to interact with both mTOR complexes, preferentially selects one over the other. As shown in Fig. 1E, GST-GRp58 but not GST-PAK-N (used as a control) interacted preferentially with mTORC1 over mTORC2, evidenced by a significantly larger amount of Raptor than Rictor present in the GRp58 pulldown, in which, as expected, mTOR was also present. In these experiments, similar levels of endogenous Raptor and Rictor were detected in HEK293T cells (Fig. 1E, upper panel).

Interaction between endogenous GRp58 and mTOR in HEK293T cells was demonstrated by immunoprecipitating mTOR and detecting GRp58 (Fig. 2A). The specificity of the interaction was determined in experiments that showed a significant decrease in the band corresponding to GRp58 in immunoprecipitates obtained with mTOR antibodies preincubated with a specific blocking peptide or in immunoprecipitates from mTOR knockdown cells and that demonstrated its absence in immunoprecipitates obtained using control antibodies (Fig. 2A). The shRNA-mediated decrease in the expression of mTOR was confirmed by Western blotting in total cell lysates (Fig. 2A). In order to determine whether the interaction between endogenous mTOR and GRp58 occurred in different cell types, we immunoprecipitated mTOR and detected its interaction with GRp58 using lysates from HEK293T and HeLa cells and HMEC. As shown in Fig. 2B, GRp58 was found associated to mTOR in the three cell types.

To evaluate whether the interaction between endogenous mTOR and GRp58 can be regulated by conditions that are known to affect the kinase activity of mTOR, we determined the effect of various stimuli on the stability of the mTOR-GRp58 complex. HEK293T cells were deprived of nutrients and stimulated with 10% FBS, insulin, or leucine; then mTOR was immunoprecipitated, and its interaction with GRp58 was determined by Western blotting. None of the conditions employed affected the ability of GRp58 to interact with mTOR (Fig. 2C). The activation of mTOR in response to the different stimuli was confirmed by Western blotting detecting the phosphorylation of S6 protein, a substrate of S6K (Fig. 2C). Collectively, these results indicate that the interaction between mTOR and GRp58, discovered by yeast two-hybrid screening and detected by pulldown of transfected epitope-tagged proteins, occurs between endogenous mTOR and GRp58 in different mammalian cells and that it is not sensitive to variations in the availability of nutrients or growth factors. We then tested the effect of rapamycin on the interaction between GRp58 and mTOR. Since it is known that a short-term incubation with rapamycin affects mTORC1 whereas a chronic incubation with this inhibitor also affects mTORC2 (45), we explored the effect of both conditions on the interaction between GRp58 and mTOR. As shown in Fig. 2D, a 1-h incubation with rapamycin did not affect the interaction between GRp58 and mTOR, whereas it was able to reduce the phosphorylation of S6K and 4E-BP1 without affecting the phosphorylation of Akt, demonstrating its specific effect on mTORC1. Chronic incubation with rapamycin decreased the phosphorylation of mTORC1 and mTORC2 substrates (Fig. 2D) and reduced the interaction of Raptor and Rictor with mTOR (Fig. 2 E and F); it also reduced the interaction between GRp58 and mTOR (Fig. 2D) although not to a significantly reduced level. Since mTORC1 is known to be activated in response to oxidants such as PAO (47), we tested whether this agent affects the interaction between GRp58 and mTOR. As shown in Fig. 2D, PAO produced a significant reduction in the interaction of GRp58 with mTOR. In addition, PAO reduced the interaction between mTOR and Raptor (Fig. 2E), consistent with a previous report (47); interestingly, PAO did not affect the interaction between Rictor and mTOR (Fig. 2F), indicating a lack of effect on mTORC2. These results suggested that GRp58 and PAO preferentially influenced the activity of mTORC1. Consistent with this possibility, PAO showed a positive effect on the phosphorylation of S6K and 4E-BP1, both substrates of mTORC1, without affecting the phosphorylation of Akt at Ser473, known to be phosphorylated by mTORC2 (46).

**Changes in GRp58 expression affect the levels of mTORC1.** Considering the chaperone function of GRp58 (28, 37), we explored whether its interaction with mTOR had a functional impact on the assembly of mTORC1 and mTORC2. In order to investigate this possibility, we assessed the effect of GRp58 shRNA-mediated knockdown or GRp58 overexpression on the interaction of endogenous Raptor, Rictor, or mLST8 with mTOR in HEK293T cells. As shown in Fig. 3A, GRp58 deficiency significantly diminished the presence of Raptor and mLST8 in mTOR immunoprecipitates while the reduction of Rictor associated to mTOR was not significantly different in immunoprecipitates from GRp58 knockdown cells compared to control cells. The expression levels of mTOR, Raptor, Rictor, and mLST8 in total cell lysates from GRp58 knockdown cells were similar to the expression levels of these proteins detected in control cells (Fig. 3B). In contrast, as shown in Fig. 4A (left panel and right upper graph), GRp58 overexpression significantly increased the levels of Raptor and mLST8 interacting with mTOR; while some increase in the levels of Rictor interacting with mTOR was detected, the level did not significantly differ from control immunoprecipitates from cells not overexpressing GRp58 (Fig. 4A, left panel and right upper graph). Overexpression of GRp58 did not increase the levels of mTOR, Raptor, Rictor, or mLST8 in total cell lysates (Fig. 4A, middle panel and right bottom graph). The effect of GRp58 overexpression was also attenuated by GRp58 shRNA-mediated knockdown (Fig. 4B, left panel and right upper graph). Neither GRp58 knockdown nor overexpression altered the levels of mTOR immunoprecipitated (Fig. 3A and 4A). These results demonstrate that GRp58 has a key role in the assembly of mTORC1.

**Changes in GRp58 expression affect the activity of mTORC1 but not of mTORC2.** Since GRp58 preferentially interacted with mTORC1 (Fig. 1E) and influenced the assembly of this complex (Fig. 3 and 4), we next tested whether GRp58 knockdown or overexpression had an effect on the activity of this complex or mTORC2. We explored this possibility by assessing the phosphorylation of 4E-BP1, $p70^{S6K}$, and S6, substrates downstream of mTORC1 (55), and the phosphorylation of Akt at Ser473 and Thr450, both sites recognized as mTORC2 substrates (11, 23, 25, 46). As shown in Fig. 5A, GRp58 knockdown significantly decreased the phosphorylation of 4E-BP1

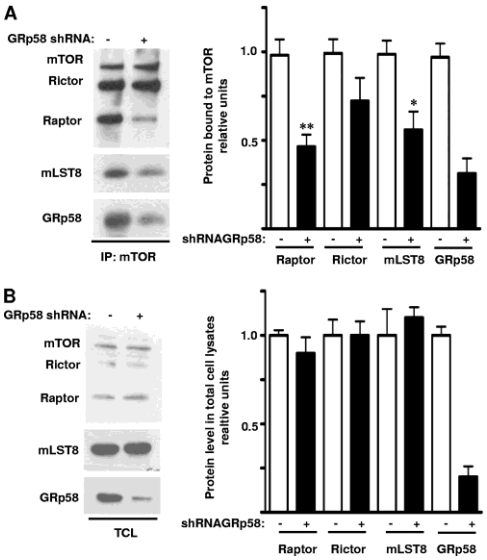



FIG. 3. GRp58 knockdown decreases the levels of mTORC1. HEK293T cells were transfected with GRp58 shRNA or control plasmid. (A) mTOR was immunoprecipitated from GRp58 knockdown or control cells, and the immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting to detect mTOR, Rictor, Raptor, mLST8, and GRp58. The graph on the right represents the mean and standard error of the mean of five independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (compared to the respective control). (B) The expression of mTOR, Rictor, Raptor, mLST8, and GRp58 in total lysates (TCL) of control and GRp58 knockdown cells was analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. The graph on the right represents the results of five independent experiments.

and S6K in response to insulin while the effect on the phosphorylation of S6, which was slightly decreased, did not show a statistically significant difference compared to phosphorylation of control cells (Fig. 5B). The activity of mTORC2 was not affected by GRp58 knockdown, as demonstrated by the similar effects of insulin on the phosphorylation of Akt at Ser473 (Fig. 5C, left panel) or GSK-3β, a known Akt substrate (Fig. 5D), in GRp58 knockdown and control cells. The phosphorylation of Akt at Thr450 was not influenced by insulin or GRp58 knockdown (Fig. 5C, right panel). The phosphorylation of mTOR was not significantly stimulated by insulin or influenced by GRp58 knockdown (Fig. 5E). A parallel signaling cascade, resulting in extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation in response to insulin, was not affected by GRp58 knockdown (Fig. 5F). As shown in Fig. 5G, GRp58 shRNA effectively reduced the expression of this protein. No changes in the expression of 4E-BP1, S6K, S6, Akt, GSK-3β, mTOR, or ERK, detected in total cell lysates, were noticed in response to GRp58 knockdown (Fig. 5A to G). In contrast, GRp58 overexpression increased the basal phosphorylation of 4E-BP1, S6K, and S6 (Fig. 6A and B) while the maximum phosphorylation of these substrates, in response to insulin, was not altered (Fig. 6A and B). GRp58 overexpression did not affect mTORC2 activity, as demonstrated by the lack of effect on the phosphorylation, either basal or in response to insulin, of Akt at Ser473, or the phosphorylation of GSK-3β (Fig. 6C, left panel, and D). The phosphorylation of Akt at Thr450 or the phosphorylation of mTOR was not stimulated by insulin (as already shown in the GRp58 knockdown experiments) and was not affected by GRp58 overexpression. As in the case of the knockdown experiments, the basal or insulin-dependent phosphorylation of ERK was not affected by GRp58 overexpression. No changes in the total expression of 4E-BP1, S6K, S6, Akt, GSK-3β, mTOR, and ERK were noticed in response GRp58 overexpression (Fig. 6A to G). As shown in Fig. 7A, the phosphorylation of 4E-BP1 and S6K due to GRp58 overexpression (Fig. 7B) was sensitive to rapamycin, further indicating that it occurred in response to mTORC1 activation.

**Role of GRp58 in mTORC1 signaling in response to PAO.** Since the oxidant agent PAO promoted the phosphorylation of mTORC1 substrates and affected the interaction between GRp58 and mTOR (Fig. 2D), we tested whether GRp58 is an essential component of the oxidant mechanism that activates mTORC1. First, we demonstrated that PAO promoted the activation of mTORC1 in a time- and dose-dependent manner, as demonstrated by its effect on the phosphorylation of S6K, S6, and 4E-BP1 (Fig. 8A and B), without affecting the activity of mTORC2, as demonstrated by its lack of effect on Akt phosphorylation (Fig. 8A and B). The role of GRp58 in the oxidant mechanism that activates mTORC1 was tested in GRp58 knockdown cells. As shown in Fig. 8C and D, GRp58 knockdown significantly decreased the phosphorylation of S6K and S6 in response to PAO while the effect on the phosphorylation of 4E-BP1, which was just slightly decreased, did not show a statistically significant difference compared to control cells (Fig. 8E). PAO exerted a positive effect on the phosphorylation of ERK via a mechanism that was not affected by GRp58 knockdown (Fig. 8F). Consistent with results shown in Fig. 8A and B, PAO did not promote the phosphorylation of Akt at Ser473 in GRp58 knockdown cells (Fig. 8G). Figure 8H shows the effectiveness of GRp58 shRNA, which significantly reduced the expression of GRp58 without affecting the expression of ERK or the other assayed proteins.

**mTOR and GRp58 coexist in cytosolic and endoplasmic reticulum fractions.** Since mTOR is a cytosolic kinase, eventually associated to the endoplasmic reticulum and other membranous compartments (9, 33, 41, 42), and since GRp58 has been found at the endoplasmic reticulum and also at cytosolic and nuclear fractions (1, 6, 35, 51), the coexistence of mTOR and GRp58 in the same subcellular compartment constitutes a requirement for a physiological role for their interaction. In order to investigate whether mTOR and GRp58 coexist in the same subcellular compartment, we carried out a subcellular fractionation procedure by differential centrifugation of mechanically disrupted HEK293 cells. As shown in Fig. 9A, both mTOR and GRp58 are localized at the cytosolic fraction (supernatant [SN] resulting from centrifugation at $10^5 \times g$) as well as at the fraction corresponding to the endoplasmic reticulum (Fig. 9A, pellet). In addition, Raptor and Rictor, components of mTORC1 and mTORC2, respectively, were also present in both fractions (Fig. 9B). 4E-BP-1 and SERCA were used as markers for cytosolic and endoplasmic reticulum fractions, respectively.

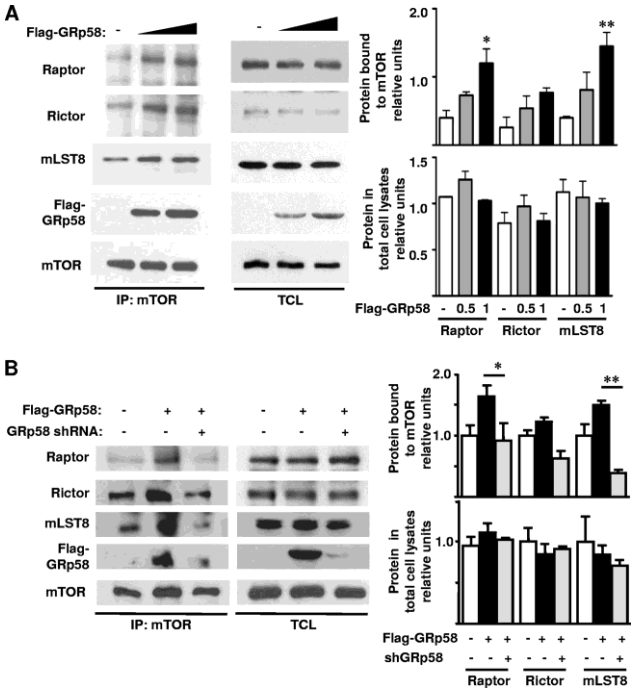



FIG. 4. GRp58 overexpression increases the levels of mTORC1. (A) HEK293T cells were transfected with increasing concentrations of a plasmid encoding 3×Flag-GRp58 or empty vector. Two days after transfection, mTOR immunoprecipitates were prepared and subjected to immunoblot analysis for endogenous proteins, as indicated, or for GRp58 with anti-Flag antibodies (IP:mTOR). The expression of the indicated components of mTOR complexes and Flag-GRp58 was also detected in total lysates (TCL). Graphs on the right represent the results of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (compared to the respective control). (B) The effect of GRp58 overexpression on the levels of mTOR complexes was attenuated with a specific GRp58 shRNA. HEK293T cells were cotransfected with 3×Flag-GRp58 and GRp58 shRNA or with a control plasmid. Three days after transfection, mTOR immunoprecipitates were obtained. Immunoprecipitates (IP:mTOR) and total lysates (TCL) were immunoblotted with the indicated antibodies. Control lysates were obtained from cells transfected with empty vector. The upper graph represents the results of four independent experiments showing the relative levels of Raptor, Rictor, and mLST8 bound to mTOR. The relative levels of Raptor, Rictor, and mLST8 in total cell lysates are represented on the bottom graph. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$.

We next investigated whether the localization of mTOR, Raptor, Rictor, and GRp58 changes in response to different stimuli. Starved HEK293 cells were treated with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 nM insulin, or 52 μg/ml leucine for 5 min, and proteins were analyzed by Western blotting of cytosolic and endoplasmic reticulum fractions. As shown in Fig. 9B, there was a significant decrease in the presence of GRp58 in the endoplasmic reticulum fraction (pellet) obtained from cells stimulated with insulin or leucine ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) while there was no significant effect of these stimuli on the distribution of mTOR, Raptor, or Rictor. We further explored the possible association of mTORC1 substrates to the endoplasmic reticulum fraction; as shown in Fig. 9C, S6K but no 4E-BP-1 was associated to the endoplasmic reticulum fraction and was phosphorylated in response to the mentioned stimuli; as expected, both S6K and 4E-BP-1 were found in the cytosolic fraction and were phosphorylated in response to serum, insulin, and leucine. In order to test whether the subcellular distribution of mTOR and GRp58 was compatible with a partial localization of these proteins at the endoplasmic reticulum or potentially other membranous compartments, we compared the localization of YFP-mTOR and mCherry-GRp58 with the localization of different fluorescent markers for membranous compartments including the plasma membrane (mRFP-CAAX), endoplasmic reticulum (CFP-ER), Golgi apparatus (EGFP-Golgi), and mitochondria (tagged with YFP) in transfected COS7 cells, which were selected because they showed clear differences in the distribution of the different markers (Fig. 9D). Both mTOR and GRp58 showed a partially diffused localization, consistent with a fraction of them being cytosolic, and the other fraction was present at subcellular structures more similar to the distribution of the ER marker (Fig. 9D). Thus, we investigated whether mTOR, GRp58, and the ER marker colocalize when transfected in the same cells and determined the potential effect of Leu and PAO on their localization. As shown in Fig. 9E (left panel), mTOR

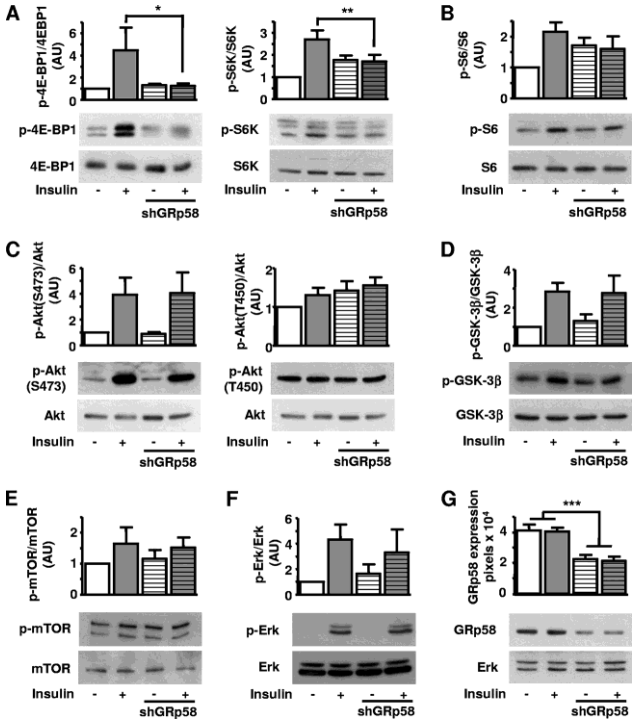



FIG. 5. mTORC1 signaling decreases in GRp58 knockdown cells. HEK293 cells were transfected with GRp58 shRNA or control plasmid. Transfected cell populations were selected with puromycin and used for experiments 7 days after transfection in order to achieve significant reduction on endogenous GRp58 expression. Six days after transfection, control and GRp58 knockdown cells were serum starved overnight and, the day after, stimulated with 50 nM insulin for 5 min, as indicated. (A) Effect of insulin on the phosphorylation of the mTORC1 substrates 4E-BP-1 and S6K. (B) Phosphorylation of S6, an S6K substrate representing a downstream target of mTORC1. The effect of GRp58 knockdown on mTORC2 signaling is shown in panels C and D, determined by the phosphorylation of Akt or GSK-3β. (E) Effect on mTOR phosphorylation. (F) Effect on ERK phosphorylation. (G) Expression of endogenous GRp58 in control and GRp58 knockdown cells, a representative blot, and the expression of endogenous ERK, used as control, are shown. Graphs represents the mean and standard error of the mean of three to eight independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$. Representative blots of the indicated phosphorylated and total proteins are shown below the respective graphs (A to F). AU, arbitrary units.

and GRp58 showed similar localizations in cotransfected cells, a fraction of which is compatible with colocalization at endomembranous compartments. When cotransfected with the ER marker, both mTOR and GRp58 showed a distribution compatible with their partial localization at the ER (Fig. 9E, second and third panels, respectively). The simultaneous expression of both mTOR and GRp58 with the ER marker also showed that the distribution of the three is compatible with their colocalization at some regions of the ER (Fig. 9E, right panel). Stimulation with either L-Leu or PAO of cells simultaneously expressing fluorescent mTOR, GRp58, and the ER marker did not dramatically change the localization of these proteins (Fig. 9F and G) compared to control, nonstimulated conditions (Fig. 9E). Representative videos of experiments done in live cells are presented as supplemental material.

**Changes in GRp58 expression affect cell proliferation in response to insulin or serum.** Since mTORC1 activity is known to have a positive effect on cell proliferation (13, 21), we decided to test whether changes in GRp58 expression, which we identified here as a novel mTOR interacting protein, affect cell proliferation. Thus, we evaluated the effect of GRp58 overexpression or knockdown on the proliferation of cells in response to insulin or serum. As shown in Fig. 10, GRp58-overexpressing cells showed a significant increase in proliferation relative to control cells under basal and stimulated conditions. In contrast, GRp58 knockdown interfered with the proliferative effect of insulin or serum (Fig. 10).

## DISCUSSION

Here, we demonstrate that GRp58 interacts with mTOR and regulates the levels and activity of mTORC1. Based on our results, we can postulate that GRp58, a redox-sensitive molecular chaperone, facilitates the assembly of mTORC1 and its

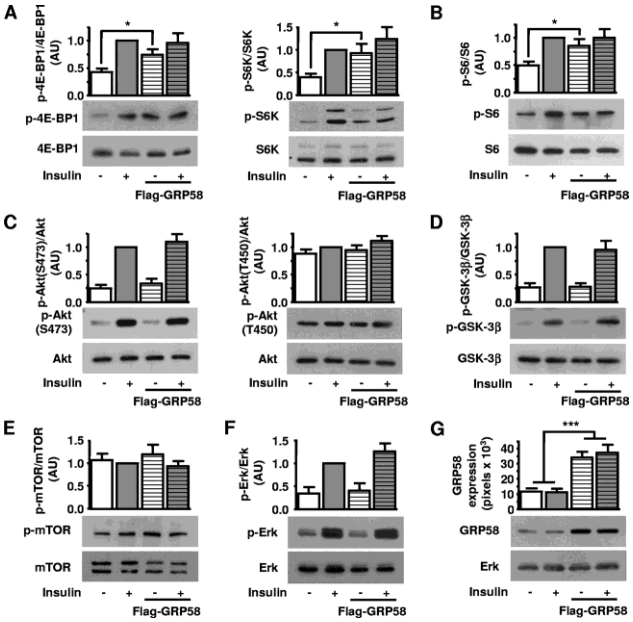



FIG. 6. mTORC1 signaling increases as a consequence of GRp58 overexpression. HEK293 cells were transfected with 3×Flag-GRp58 or control plasmid. Two days after transfection, cells were deprived of serum for 3 h and then stimulated with 25 nM insulin for 5 min prior to cell lysis. The experiments in which a significant overexpression of GRp58 was achieved were analyzed by Western blotting using antibodies to detect the phosphorylation of the indicated mTORC1 and mTORC2 substrates (A and C) and their respective downstream targets (B and D) or the phosphorylation of mTOR (E) and ERK (F) using the indicated antibodies. (G) Overexpression of GRp58 was detected with a monoclonal antibody that also recognized the endogenous protein. A representative Western blot is shown, as well as the expression of ERK in total cell lysates, which was used as control. Graphs in panels A to F represent the mean and standard error of the mean of 10 to 13 independent experiments. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Representative blots of the indicated phosphorylated and total proteins are shown below the respective graphs. AU, arbitrary units.

ability to sense oxidizing agents. These findings are consistent with the recently described redox-sensitive mechanism in the regulation of the Raptor-mTOR complex (47).

We observed that recombinant GRp58 preferentially interacts with endogenous mTORC1 over mTORC2, suggesting a differential role of GRp58 as a modulator of mTORC1 over mTORC2. This possibility aligns with the known differences in the upstream mechanisms of activation of mTOR complexes

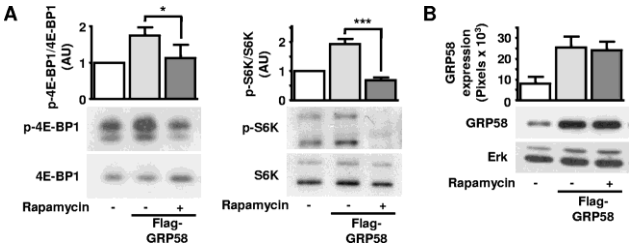



FIG. 7. The increase in mTORC1 signaling due to GRp58 overexpression is sensitive to rapamycin. HEK293 cells overexpressing GRp58 were incubated with 20 ng/ml rapamycin for 1 h, and the phosphorylation of mTORC1 substrates was determined by Western blotting using antibodies against phosphorylated 4E-BP1 or S6K. (A) Graph represents the results of three (4E-BP1) and four (S6K) independent experiments. Representative blots of the indicated phosphorylated and total proteins are shown below the respective graphs. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. (B) overexpression of GRp58 was detected with a monoclonal antibody that also recognized the endogenous protein. A representative Western blot is shown, as well as the expression of ERK in total cell lysates, which was used as a control. AU, arbitrary units.

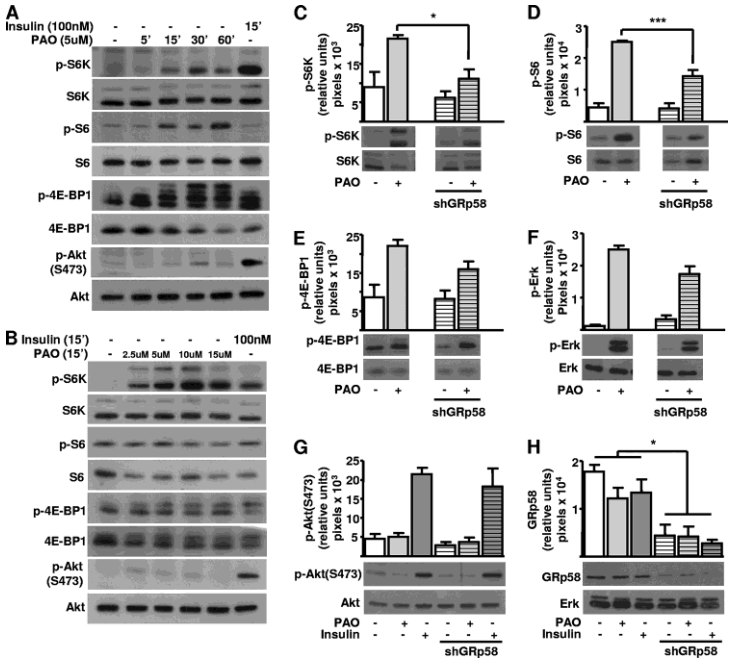



FIG. 8. Role of GRp58 in mTORC1 signaling in response to PAO. (A and B) PAO promotes the activation of mTORC1 but not of mTORC2 in a time- and dose-dependent manner. HEK293 cells were stimulated for the indicated times and with the indicated concentrations of PAO or insulin. The phosphorylation of S6K, S6, and 4E-BP1, indicative of mTORC1 activation, and the phosphorylation of AKT at Ser473, indicative of mTORC2 activation, were assessed by Western blotting using phospho-specific antibodies, as well as the total expression of these proteins using antibodies that recognize them regardless of their phosphorylation status. (C to H) Equivalent experiments were done in GRp58 knockdown HEK293 cells to detect the effect of decreased expression of GRp58 on the activity of mTORC1 (C to E), mTORC2 (G), or ERK (F) in response to PAO (5 μM for 30 min). (H) Expression of endogenous GRp58 in control and GRp58 shRNA (shGRp58) transfected cells. Graphs represent the mean and standard error of the mean of three to four independent experiments. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

(24). Our data suggest a dual role of GRp58 related to its interaction with mTOR. First, it has a positive effect on the assembly of mTORC1, as demonstrated by a reduction in the presence of Raptor and mLST8 in mTOR immunoprecipitates of GRp58 knockdown cells and by an increase in their association to mTOR in GRp58-overexpressing cells. Since the expression of Raptor, Rictor, mLST8, or mTOR was not altered in total cell lysates and since the amount of immunoprecipitable mTOR was comparable under the different experimental conditions, the results also suggest that GRp58 has an effect on the assembly and not the stability of mTOR complexes. Second, GRp58 modulates the function of mTORC1; since the kinase domain of mTOR constitutes the GRp58-interacting site, the positive effect of GRp58 on mTORC1 activity under basal conditions is putatively due to a direct stimulation of mTOR catalytic activity by GRp58, an effect that was sensitive to rapamycin, a specific inhibitor of mTORC1. In addition, GRp58 can also be part of the mechanism used by mTORC1 to detect upstream signals, as indicated by a decrease in the mTORC1 response to insulin in GRp58 knockdown cells. This possibility is also consistent with a mechanism by which mTORC1 responds to changes in cell redox conditions. According to Sarvassov and Sabatini, a redox mechanism influences the activity of mTORC1 (47); our results showing an effect of GRp58 on the function of mTORC1 in response to the oxidizing agent PAO suggest that, by interacting with mTORC1, GRp58 could be part of the redox-sensing mechanism attributed to mTORC1 (47). In response to nutrients, Raptor dissociates from mTOR, facilitating the phosphorylation of its specific substrates (30). Here, we found that PAO exerts a similar effect on the interaction of GRp58 with mTOR, which decreases in response to PAO, an oxidizing agent previously reported to induce dissociation of Raptor and mTOR (47). In addition, GRp58/ERp57 knockdown significantly decreases the phosphorylation of $p70^{S6K}$ and S6 in response to PAO, further supporting the participation of GRp58/ERp57 as a critical component of the mTOR redox-sensing mechanism. In this regard, a phospho-proteomic approach oriented to identify new targets of leucine deprivation in muscle cells suggested some correlation between mTOR and GRp58, as indicated by an increase in GRp58 phosphorylation in response to leucine deprivation (49).

The mechanism by which GRp58 regulates the assembly of

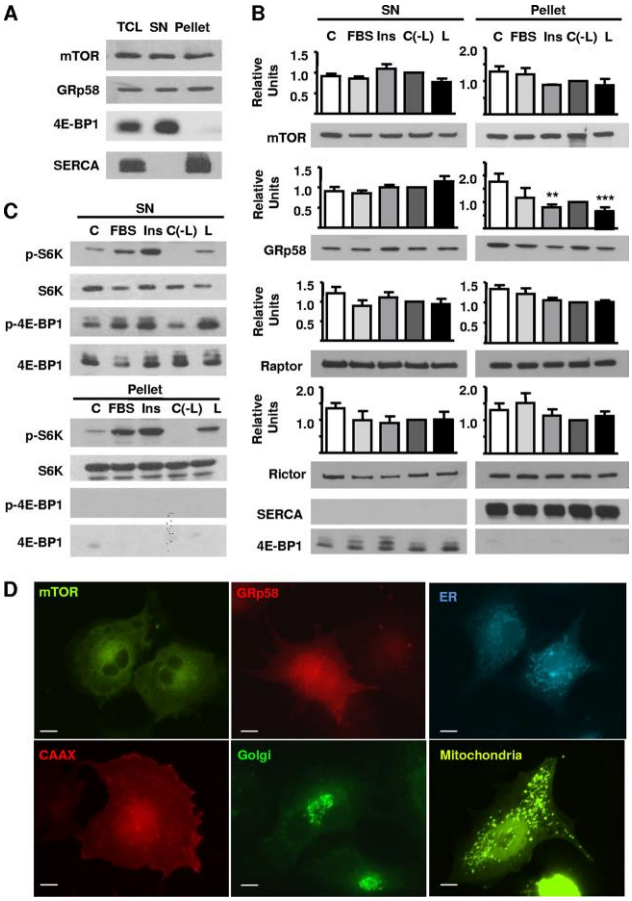



FIG. 9. Subcellular distribution of mTOR and GRp58. (A) HEK293 cells were subjected to a subcellular fractionation protocol as described in experimental procedures; 10 μg of the cytosolic fraction (SN) or the endoplasmic reticulum fraction (Pellet) was analyzed to detect the presence of mTOR and GRp58. 4EBP-1 and SERCA2 were detected as cytosolic and endoplasmic reticulum markers, respectively. (B) HEK293 cells were incubated overnight in serum-free medium (C) or serum-free medium also lacking leucine [C(−L)] and then stimulated for 5 min with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 nM insulin (Ins), or 52 μg/ml leucine (L). Cells were fractionated, and proteins were detected by Western blotting using specific antibodies. Bars represent the mean densitometric values of mTOR, GRp58, Raptor, and Rictor from three independent experiments; vertical lines represent the standard error of the mean (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, with respect to control). (C) The presence and phosphorylation of S6K and 4E-BP1 on cytosolic (SN) and endoplasmic reticulum (Pellet) fractions from cells stimulated as indicated were detected by Western blotting using phospho-specific antibodies (pS6K and p4E-BP1) or antibodies that detect these proteins regardless of their phosphorylation status. (D) Subcellular distribution of mTOR, GRp58, and markers for the endoplasmic reticulum (ER), plasma membrane (CAAX), Golgi apparatus, and mitochondria was observed in COS-7 cells transfected with YFP-mTOR, mCherry-GRp58, CFP-ER, mRFP-CAAX, EGFP-Golgi, and YFP-mitochondria, respectively. At 24 h after transfection, cells were fixed and photographed using a Nikon Eclipse Ti-E fluorescence microscope. YFP-mTOR was artificially detected as a green protein when transfected alone or with mCherry-GRp58. (E) Equivalent experiments were done to detect the subcellular localization of different combinations of cotransfected mTOR, Grp58, and the ER marker in serum-starved cells or in cells stimulated for 15 min with L-leucine (52 μg/ml) (F) or PAO (5 μM) (G). Bar, 10 μm. Representative experiments done in live cells are available in the supplemental material.

mTORC1 could be dependent on its ability to catalyze the formation and/or isomerization of disulfide bonds (2, 48). In this regard, it has been described that the FATC (FAT carboxyl-terminal) domain of yeast TOR1 presents a structural motif consisting of an α-helix and a disulfide-bonded loop. Upon reduction of this disulfide bond, a strong conformational change occurs, increasing the flexibility of the loop region. Moreover, point mutants in this region, in which cysteines were

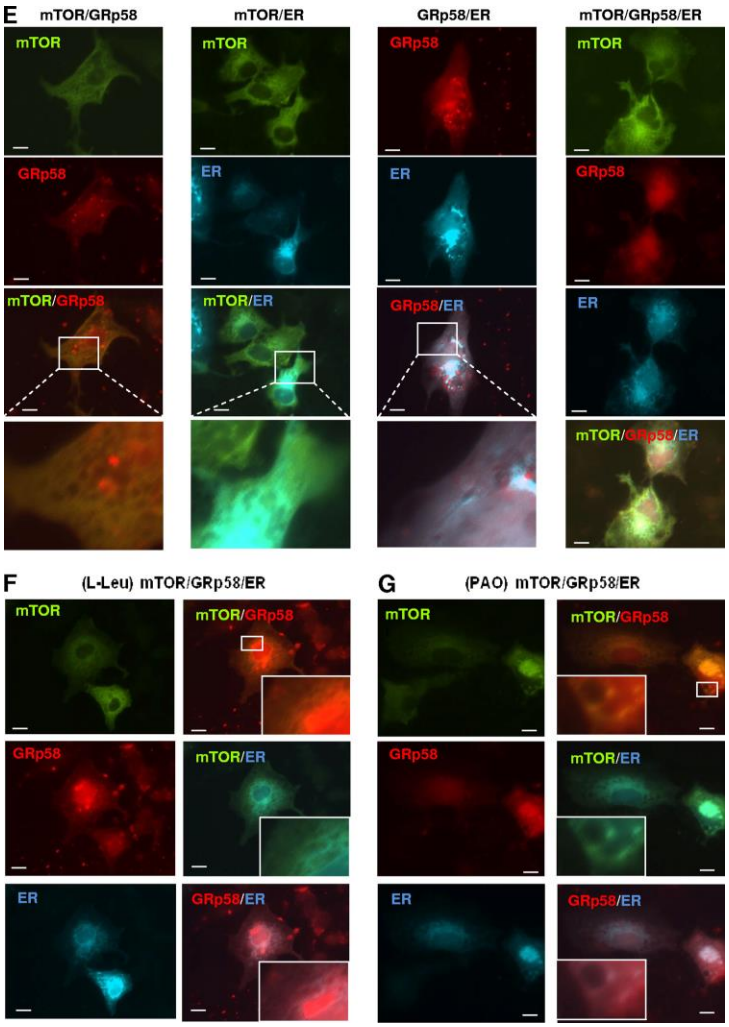



FIG. 9—*Continued.*

replaced by serines, altered the interacting properties of FATC with other regions of TOR and with other cellular partners (7). Accordingly, Sarvassov and Sabatini demonstrated that thiol oxidants decrease the interaction between Raptor and mTOR, whereas a reducing reagent stabilizes this complex (44). In addition, it has been recently demonstrated that an elevated oxidative stress modifies TORC1 and prevents its binding to the FKBP12-rapamycin complex, ultimately leading to rapamycin resistance (36). Collectively, these studies suggest the regulation of TOR pathway by a redox-sensitive mechanism which, according to our present data, can be based on the interaction between mTOR and GRp58.

We found that mTOR and GRp58 coexist in cytosolic and endoplasmic reticulum fractions, opening the possibility that their interactions occur associated to different subcellular compartments. Additional evidence supporting a functional role for mTORC1 associated to the endoplasmic reticulum is the fact that this fraction contains $p70^{S6K}$ phosphorylated in samples from cells stimulated with serum, insulin, or leucine. An alternative possibility is that $p70^{S6K}$ translocates to the endo-

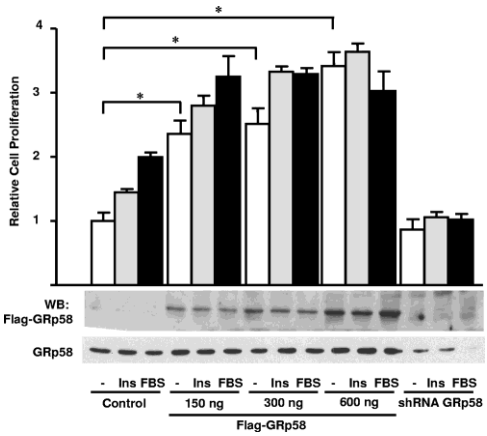



FIG. 10. Changes in the expression of GRp58 affect cell proliferation in response to insulin or serum. HEK293T cells were transfected with 3×Flag-GRp58, GRp58 shRNA, or control plasmid, as indicated. At 36 h posttransfection, $10^4$ cells were seeded in 96-well plates and deprived of serum for 3 h. Then, cells were treated with 100 nM insulin (Ins) or 10% FBS for 24 h. BrdU was added, and the cells were incubated for an additional 4 h. BrdU incorporation was determined as described in Materials and Methods. The graph represents the mean ± standard deviation of cell proliferation compiled from three independent experiments performed in quadruplicate. *, $P < 0.01$. Representative blots of the expression of transfected GRp58 detected with anti-Flag or an antibody that also detects endogenous GRp58 are shown.

plasmic reticulum upon phosphorylation; however, the levels of $p70^{S6K}$ associated to this fraction were similar in control and stimulated cells, further supporting the former interpretation. The requirement of mTORC1 translocation to membranous compartments as part of its mechanism of activation in response to amino acids was recently demonstrated by Sabatini and colleagues (41, 42). Our results are consistent with their findings and extend the possibilities in terms of the identity of membranous organelles linked to mTORC1 activation since these investigators identified late endosomes and lysosomes as the organelles to which the activation of mTORC1 is linked. Interestingly, Rheb, a small GTPase that directly activates mTORC1, has been found associated to the endoplasmic reticulum via a carboxyl-terminal farnesylation, which is essential for the oncogenic effects of a constitutively active Rheb mutant (20, 26). Altogether, these findings support an emerging role for membranous organelles as intervening components in the assembly and activation of mTORC1, providing a spatial element of regulation that might also contribute to restrict the phosphorylation of specific substrates, as suggested by the presence and phosphorylation of $p70^{S6K}$ associated to the endoplasmic reticulum fraction while 4E-BP-1, the other widely recognized substrate of mTORC1, was not associated to this subcellular fraction.

Our study revealed that GRp58 has a key role in cellular proliferation. In HEK293T cells, GRp58 overexpression induced cellular proliferation, whereas GRp58 knockdown prevented the proliferative effect of insulin and serum, sustaining the essential role of GRp58 in cellular proliferation. It is well known that the mTOR pathway is a fundamental regulator of cellular proliferation under normal (18) and malignant conditions (8, 12). Our data suggest that the intervention of GRp58 in cell proliferation can be attributed, at least in part, to its interaction with mTOR, although we cannot rule out an mTOR-independent mechanism in the proliferative responses observed in cells in which the expression of GRp58 was altered.

In conclusion, we have identified GRp58 as a novel mTOR-interacting protein that promotes the assembly and activation of mTORC1.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Shu-Bing Qian, Gyorgy Hajnoczky, Tamas Balla, James D. Lechleiter, and David Sabatini, who kindly provided DNA constructs. Technical assistance provided by Estanislao Escobar Islas, Margarita Valadez Sánchez, David Pérez, and Jaime Estrada is acknowledged.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grants 61127 (to J.V.P.) and 79429 (to G.R.C.). I.R.-R. and I.B.-V. are graduate students supported by fellowships from CONACyT.

## REFERENCES

1. **Adikesavan, A. K., E. Unni, and A. K. Jaiswal.** 2008. Overlapping signal sequences control nuclear localization and endoplasmic reticulum retention of GRP58. Biochem. Biophys. Res. Commun. **377:**407–412.
2. **Beynon-Jones, S. M., A. N. Antoniou, and S. J. Powis.** 2006. Mutational analysis of the oxidoreductase ERp57 reveals the importance of the two central residues in the redox motif. FEBS Lett. **580:**1897–1902.
3. **Chen, J.** 2004. Novel regulatory mechanisms of mTOR signaling. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279:**245–257.
4. **Chichiarelli, S., et al.** 2010. Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. Arch. Biochem. Biophys. **494:**178–183.
5. **Coe, H., J. Jung, J. Groenendyk, D. Prins, and M. Michalak.** 2010. ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. **285:**6725–6738.
6. **Coe, H., and M. Michalak.** 2010. ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. Int. J. Biochem. Cell Biol. **42:**796–799.
7. **Dames, S. A., J. M. Mulet, K. Rathgeb-Szabo, M. N. Hall, and S. Grzesiek.** 2005. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. J. Biol. Chem. **280:**20558–20564.
8. **Dancey, J. E.** 2006. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. Cancer Biol. Ther. **5:**1065–1073.
9. **Drenan, R. M., X. Liu, P. G. Bertram, and X. F. Zheng.** 2004. FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. J. Biol. Chem. **279:**772–778.
10. **Easton, J. B., and P. J. Houghton.** 2006. mTOR and cancer therapy. Oncogene **25:**6436–6446.
11. **Facchinetti, V., et al.** 2008. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. EMBO J. **27:**1932–1943.
12. **Fasolo, A., and C. Sessa.** 2008. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. Expert Opin. Investig. Drugs **17:**1717–1734.
13. **Fingar, D. C., and J. Blenis.** 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene **23:**3151–3171.
14. **Fingar, D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow, and J. Blenis.** 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev. **16:**1472–1487.
15. **Garbi, N., G. Hammerling, and S. Tanaka.** 2007. Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. Curr. Opin. Immunol. **19:**99–105.
16. **Garbi, N., S. Tanaka, F. Momburg, and G. J. Hammerling.** 2006. Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. Nat. Immunol. **7:**93–102.
17. **Grillo, C., et al.** 2006. Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors. Free Radic. Biol. Med. **41:**1113–1123.

18. **Guertin, D. A., et al.** 2006. 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. Dev. Cell **11:**859–871.
19. **Guo, G. G., et al.** 2002. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. J. Interferon Cytokine Res. **22:**555–563.
20. **Hanker, A. B., et al.** 2010. Differential requirement of CAAX-mediated posttranslational processing for Rheb localization and signaling. Oncogene **29:**380–391.
21. **Hay, N., and N. Sonenberg.** 2004. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. **18:**1926–1945.
22. **Hernandez-Negrete, I., et al.** 2007. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. J. Biol. Chem. **282:** 23708–23715.
23. **Ikenoue, T., K. Inoki, Q. Yang, X. Zhou, and K. L. Guan.** 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. EMBO J. **27:**1919–1931.
24. **Jacinto, E.** 2008. What controls TOR? IUBMB Life **60:**483–496.
25. **Jacinto, E., et al.** 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. Cell **127:**125–137.
26. **Jiang, H., and P. K. Vogt.** 2008. Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. Oncogene **27:**5729–5740.
27. **Kaizuka, T., et al.** 2010. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. J. Biol. Chem. **285:**20109–20116.
28. **Khanal, R. C., and I. Nemere.** 2007. The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. Curr. Med. Chem. **14:**1087–1093.
29. **Kim, D. H., and D. M. Sabatini.** 2004. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279:**259–270.
30. **Kim, D. H., et al.** 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell **110:**163–175.
31. **Kita, K., et al.** 2006. Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. FEBS Lett. **580:**199–205.
32. **Li, W., et al.** 2007. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. Circ. Res. **100:**79–87.
33. **Liu, X., and X. F. Zheng.** 2007. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. Mol. Biol. Cell **18:**1073–1082.
34. **Markus, M., and R. Benezra.** 1999. Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. J. Biol. Chem. **274:**1040–1049.
35. **Ndubuisi, M. I., G. G. Guo, V. A. Fried, J. D. Etlinger, and P. B. Sehgal.** 1999. Cellular physiology of STAT3: where's the cytoplasmic monomer? J. Biol. Chem. **274:**25499–25509.
36. **Neklesa, T. K., and R. W. Davis.** 2008. Superoxide anions regulate TORC1 and its ability to bind Fpr1:rapamycin complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105:**15166–15171.
37. **Ni, M., and A. S. Lee.** 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. FEBS Lett. **581:**3641–3651.
38. **Polak, P., and M. N. Hall.** 2006. mTORC2 Caught in a SINful Akt. Dev. Cell **11:**433–434.
39. **Qian, S. B., et al.** 2010. mTORC1 links protein quality and quantity control by sensing chaperone availability. J. Biol. Chem. **285:**27385–27395.
40. **Rosner, M., and M. Hengstschlager.** 2008. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. Hum. Mol. Genet. **17:**2934–2948.
41. **Sancak, Y., et al.** 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. Cell **141:**290–303.
42. **Sancak, Y., et al.** 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science **320:**1496–1501.
43. **Sarbassov, D. D., et al.** 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr. Biol. **14:**1296–1302.
44. **Sarbassov, D. D., S. M. Ali, and D. M. Sabatini.** 2005. Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. **17:**596–603.
45. **Sarbassov, D. D., et al.** 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell **22:**159–168.
46. **Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini.** 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science **307:**1098–1101.
47. **Sarbassov, D. D., and D. M. Sabatini.** 2005. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. J. Biol. Chem. **280:**39505–39509.
48. **Satoh, M., A. Shimada, A. Kashiwai, S. Saga, and M. Hosokawa.** 2005. Differential cooperative enzymatic activities of protein disulfide isomerase family in protein folding. Cell Stress Chaperones **10:**211–220.
49. **Talvas, J., et al.** 2008. Phospho-proteomic approach to identify new targets of leucine deprivation in muscle cells. Anal. Biochem. **381:**148–150.
50. **Toschi, A., et al.** 2009. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. Mol. Cell. Biol. **29:**1411–1420.
51. **Turano, C., S. Coppari, F. Altieri, and A. Ferraro.** 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. J. Cell Physiol. **193:** 154–163.
52. **Varma, S., and R. L. Khandelwal.** 2007. Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB. Biochim. Biophys. Acta **1770:**71–78.
53. **Vazquez-Prado, J., J. Basile, and J. S. Gutkind.** 2004. Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. Methods Enzymol. **390:**259–285.
54. **Wang, X., and C. G. Proud.** 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. Physiology (Bethesda) **21:**362–369.
55. **Wullschleger, S., R. Loewith, and M. N. Hall.** 2006. TOR signaling in growth and metabolism. Cell **124:**471–484.

# B. Artículo original en revisión: AKT ubiquitination and degradation via Hsp70/Parkin complex is facilitated by its interaction with Bag5.

AKT ubiquitination and degradation via the Hsp70/Parkin complex is facilitated by its interaction with Bag5

**Ismael Bracho-Valdes[1], Paola Moreno-Alvarez[1], Estanislao Escobar-Islas[1], Adán Olguín-Olguín[1], Jorge Carretero-Ortega[1], J. Alberto Olivares-Reyes[3], Guadalupe Reyes-Cruz[2], J. Silvio Gutkind[4], and José Vázquez-Prado[1*]**

From the Departments of [1]Pharmacology, [2]Cell Biology, and [3]Biochemistry CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. Col. San Pedro Zacatenco, 07360, México D.F., México and [4]Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20852, USA

**Running title:** AKT/PKB degradation is regulated by interacting BAG5.

*Address correspondence to: José Vázquez-Prado.
Departamento de Farmacología. CINVESTAV-IPN.
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. Col. San Pedro Zacatenco, 07360 . Apartado postal 14-740, 07000 México, D.F. MEXICO. Phone: (52-55) 5747-3380. Fax: (52-55) 5747-3394
E-mail: jvazquez@cinvestav.mx.

**Keywords**: AKT/PKB, BAG-5, Bcl-2 associated athanogene 5, ubiquitin-dependent degradation, Parkin, Hsp70.

---

**Background:** AKT/PKB, potentially modulated by ubiquitin-dependent degradation, regulates cell survival, metabolism and migration.
**Results:** Starvation contributes to ubiquitin-dependent degradation of AKT via BAG5, Hsp70 and Parkin.
**Conclusion:** AKT signaling and stability is finely regulated by BAG5.
**Significance:** Altered mechanisms of AKT signaling, linked to metabolic pathologies and cancer, might be targeted pharmacologically by understanding how AKT expression is regulated.

**Abstract**

The serine threonine kinase AKT/PKB regulates cell survival, metabolism, proliferation and migration. Thus, AKT activity and stability must be tightly regulated to keep balanced these fundamental processes. However, despite their broad impact, the mechanisms that target AKT to degradation during critical starvation remain elusive. Here, we demonstrate that BAG5, a chaperone regulator and a novel AKT-interactor, attenuates AKT stability. This effect was exacerbated by inhibition of Hsp90 and protein synthesis. BAG5 was more effective in promoting AKT degradation in the presence of 17AAG, an anti-cancer agent being assessed in clinical trials, whereas BAG5 knockdown attenuated AKT degradation under these stressful AKT-destabilizing conditions. BAG5 in coordination with Hsp70 and Parkin targeted AKT to ubiquitination-dependent degradation. In contrast, BAG5 knockdown attenuated Hsp70-dependent AKT-degradation. AKT and BAG5 were reciprocally regulated, under serum starved conditions BAG5 interacted with AKT, whereas in HGF stimulated cells BAG5 was phosphorylated and dissociated from AKT. Functional assays indicated that BAG5 knockdown increased AKT phosphorylation at Ser473 whereas BAG5 overexpression

reduced AKT activation and cell migration. Our model suggests that AKT signaling and stability is attenuated under starvation via BAG5, which targets AKT for degradation, while reduction of BAG5 protein levels increases AKT expression and signaling.

---

The serine/threonine kinase AKT (also known as PKB) plays an integral role in multiple signals from growth factor receptors, G proteins coupled receptors and adhesion receptors, among many others which, involving the actions of this fundamental kinase, maintain metabolic homeostasis and cell survival, promote proliferation and contribute to generate cell motility and polarity (1-3). Thus, different signaling inputs have the potential to tightly control AKT distribution and kinase activity through interactions with phosphorylated products of phosphatidylinositol or with regulatory proteins (4,5), and as a consequence of its phosphorylation at Thr308 and Ser473 by regulatory kinases such as PDK1 and mTORC2, respectively. Although these events represent the best known mechanisms that regulate AKT signaling, this pleiotropic kinase is also regulated by controlling its expression and stability (6-10). Growth factors activate the PI3K/AKT signaling pathway whereas their absence initiates an apoptotic stress in which AKT prosurvival activities are inhibited, initially via dephosphorylation and eventually through its proteasomal-dependent degradation. In fact, AKT is ubiquitinated and degraded under growth factor limiting conditions (10). In addition, subcellular restricted degradation of this kinase has been linked to acquisition and maintenance of cell polarity (9). Current studies highlight the importance of controlling AKT expression and broad interest exist to understand the pathways that regulate the stability of this kinase and those that lead its degradation under normal and pathological circumstances. It has been reported that integrity of AKT is promoted by mTORC2 which phosphorylates this fundamental kinase at Thr450 during its synthesis at ribosomes (11). On the other hand, different pathways contribute to AKT downregulation. These include caspase-dependent and independent mechanisms related to oxidative stress (12) and the ubiquitin/proteasome system. However, the identity of E3 ligases involved in situations that down-regulate unstimulated AKT, such as starvation of growth factors and polarized degradation, is currently unknown. Interesting recent reports have determined the participation of different E3 ligases as regulators of phosphorylated, fully active AKT which, via an ubiquitination–dependent degradation mechanism, lead to the desensitization of the PI3K/AKT signaling pathway. Thus, as well as dephosphorylation, ubiquitination has been proposed as a mechanism to shut down AKT signaling. In this regard, at the nucleus AKT is ubiquitinated by TTC3 and degraded (13). In addition, the mitochondrial ubiquitin ligase Mulan targets active, Ser473-phosphorylated, AKT to degradation (14,15). Also, in response to ionizing radiation, the E3 ligase Ret finger protein 2 (RFP2) is putatively involved in AKT degradation (16). Interestingly, mTORC2, which co-translationally stabilizes AKT folding and also promotes its maximal activation by phosphorylation at Ser-473, contributes to its degradation via ubiquitination linked to the phosphorylation of this residue at the hydrophobic motif, as it has been revealed by the increased stability of non-phosphorylatable AKT (17). Importantly, AKT ubiquitination can also have a positive role on signaling by this kinase. In this regard, TRAF6 mono-ubiquitinates AKT leading to its association with the plasma membrane as a step forward to its activation in response to insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (18), whereas epidermal growth factor (EGF) involves the Skp2-SCF complex as the E3 ligase that contributes, by ubiquitination, to the

activation of AKT (19). Similarly, in response to insulin-like growth factor, phosphorylated AKT is ubiquitinated at the plasma membrane by Nedd4-1 which, through this posttranslational modification, promotes AKT trafficking to the perinuclear region where it is sorted to the nucleus or to proteasomal degradation (20).

AKT stability and signaling is intrinsically linked to its interaction with molecular chaperones such as Hsp90 and Hsp70. Hsp90 has been related to the co-translational stabilization of AKT (21,22), whereas Hsp70 has been linked to either AKT stability or degradation (23). The mechanism by which Hsp70 leads to AKT degradation remains unsolved, but it might involve, as we propose here, the participation of interacting proteins such as BAG5 (Bcl-2 associated athanogene 5) that may constitute a functional bridge between them. BAG5 is a multidomain protein that belongs to a group of co-chaperones, it interacts with the nucleotide binding domain of Hsp70 promoting the exchange of ADP for ATP that activates this molecular chaperone (24). In addition, BAG5 interacts with Parkin, an E3 ubiquitin ligase that targets diverse substrates to degradation via the ubiquitin proteasome system (25). Hsp70 activity as a chaperone goes beyond its traditional role in the assembly and folding of recently synthesized peptides. It has become apparent that it regulates protein degradation through the intervention of chaperone-dependent E3 ubiquitin ligases. The mechanism by which chaperone clients are targeted to ubiquitination is not fully understood, but it might involve the participation of chaperone interacting proteins that would switch the balance from protein folding to protein degradation. Different BAG proteins, members of a family constituted by 6 members whose diversity is increased by alternative splicing, regulate protein stability (26,27). The common structural motif present in all BAG proteins is a BAG domain known to interact with the ATPase domain of Hsp70. Whereas most BAG proteins contain one BAG domain, BAG5 contains four. Here, we tested the hypothesis that BAG5, which we identified as an AKT-interacting protein, directly targets AKT to a degradation system composed by Hsp70 and the E3 ligase Parkin, which would be active during critical growth factor starvation.

## Experimental Procedures

**Yeast Two-hybrid Screening.** The mouse AKT1-K179M kinase dead domain subcloned into pGB3, in frame with the DNA–binding domain of GAL4, was used as bait to screen a human fetal brain cDNA library (Clontech) by the yeast two-hybrid system, using the Matchmaker System III (Clontech) following the manufacturer´s instructions with some modifications, as previously described (28). Putative interacting clones were selected in media lacking His/Leu/Trp, and by their positive reaction for alpha-galactosidase using X-alpha Gal assay as a visible indicator of activity. The specificity of the interaction was confirmed using p53 and SV40 large T antigen as bait and prey respectively.

**Plasmids and DNA Constructs.** The mouse AKT1-K179M kinase dead domain was subcloned by PCR using the following primers: >AKT kdom 5' BamHI ataGGATCCtttgagtacctgaaactact, >AKT kdom 3' EcoRI ataGAATTCaaagaaccggtgctgcatga. BAG5 cDNA was subcloned from the yeast two hybrid prey pACT2 vector into pCMV-HA, pCMV-Myc and pCEFL-EGFP mammalian expression vectors. For pull down experiments, full length BAG5 or constructs including the linker region alone (BAG5 N87-P181) or extended to the amino terminus (BAG5 M1-P181) or the carboxyl terminus (BAG5 N87-Y447), containing the first BAG domain or the last three BAG domains, respectively, were subcloned by PCR, in frame with the sequence coding for GST into the

mammalian expression vector pCEFL-GST. The following primers were used: BAG5-5'BamHI ataGGATCCatggatatgggaaaccaacatcc, BAG5-5'N87-BamHI ataGGATCCaaccacccacaccggattg, BAG5-3'P181-EcoRI ataGAATTCtcaaggatgtgcatcctcggaaagcg, BAG5-3'EcoRI ataAATTCtcagtactcccattcatcag. The shRNA for BAG5 was generated based on the sequence of the hairpin >shRNAhBAG5-669-HP_63610 TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGGTATCA CACTTTAACCAAATAGTGAAGCCAC AGATGTATTTGGTTAAAGTGTGATACCT TTGCCTACTGCCTCGGA and cloned into pENTR vector. Plasmids coding for EGFP-Hsp70 (29), from Lois Greene, Ph.D. NHLBI, NIH, Bethesda, MD USA, and Myc-Parkin (30), from Ted Dawson, M.D./Ph.D, Johns Hopkins University Institute for Cell Engineering, Baltimore, MD USA, were obtained from Addgene (plasmids 15215 and 17612, respectively). All other plasmids have been described previously (31,32)

**Cell culture and transfection.** The Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T) and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM;; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μg/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% $CO_2$. Cells were transfected transiently for 48 or 72 h with Polyfect (Qiagen) according to the instructions of the manufacturer.

**Immunoprecipitation, pulldown and Western blot assays.** Whole cell lysates were obtained from cells grown in 10 cm Petri dishes, washed with PBS (pH 7.4), and lysed with ice-cold TNTE lysis buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 and 5 mM EDTA) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (20mM β-glycerophosphate, 1mM sodium vanadate, and 1mM sodium fluoride). For immunoprecipitations, whole-cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm in a refrigerated bench-top microcentrifuge (Eppendorf) for 10 min at $4^{o}$C. Supernatants were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C. Immunoprecipitates were harvested by incubation with protein A/G agarose beads for 2 h at $4^{o}$C in a rocking platform and washed five times with lysis buffer. Then boiled in 1X Laemmli sample buffer for 5 min. Immunoprecipitates and 20 μg of total proteins were separated by SDS-PAGE (using 6% or 10% resolving gels), transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (PDVF, Millipore) for 2.5 h at 320 mAmp. Protein concentrations in total cell lysates were determined using a DC protein assay kit (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T (0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.4) for 1 h at room temperature, then washed twice with TBS-T and incubated with appropriate antibodies. For most experiments, primary antibodies were used at 1:5000 dilution in TBS-T incubated overnight at 4°C. Membranes were rinsed with TBS-T and incubated with specific secondary antibodies conjugated to HRP (1:10,000-1:30,000) in blocking solution for 1 h at room temperature and revealed using Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore). The interaction between transfected BAG5 and AKT, either full length or the indicated domains, was assessed in HEK293T cells using expression constructs of Myc- or GST-tagged BAG5 and HA-tagged AKT1, or its kinase dead domain (AKT-KDD, K179M) fused to EGFP. For comparison, in some experiments HA-tagged ERK was cotransfected with HA-AKT and GST-BAG5 constructs, adjusted to reach expression levels similar to HA-AKT. Two days after

transfection, GST-BAG5 was isolated by pull down using 40µl of glutathione sepharose 4B beads for 2 h at 4°C, with rotation, and interacting AKT was revealed by western blot using anti-HA or GFP antibodies. For experiments in which AKT was immunoprecipitated with HA antibodies, interacting Myc-BAG5 was revealed by western blot using anti-Myc antibodies. In order to test for interactions of BAG5 with Hsp70 and Parkin, cells were co-transfected with GST-BAG5, HA-AKT, and either EGFP-Hsp70 or Myc-Parkin, control experiments included GST instead of GST-BAG5. After 36 h, cells were incubated for 12 h in serum-free media, then 20 µM MG132 was added and incubation continued for additional 4 h. Cells were lysed in TNTE buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors and pulldown was done as indicated above. The potential interaction between endogenous BAG5 and AKT was assessed by immunoprecipitation of BAG5 followed by western blot against AKT with lysates obtained from serum starved Hela cells treated with MG132 for 12 h. To evaluate the effect of AKT stimulation on its interaction with BAG5, cells were serum-starved overnight in DMEM and either stimulated with 10 ng/ml HGF for 15 min or the corresponding vehicle. Primary antibodies with the following specificity were used: AKT (Sigma), phospho-AKT (Thr450), phospho-AKT (Ser473), phospho-ERK, S6 ribosomal protein, GSK3β (all from Cell Signaling Technology), BAG5 (Imgenex), Rac1 (BD-Biosciences), HA and GFP (Covance), Myc (Sigma), ERK2 and GST (from Santa Cruz Biotechnology). Protein A and protein G-agarose were purchased from Millipore. The glutathione-Sepharose 4B was obtained from GE Healthcare Life Sciences.

**Fluorescence Microscopy.** The subcellular distribution of AKT and BAG5 was assessed in Hela cells grown on fibronectin-coated (20 µg/ml) coverslips in Petri dishes and transfected with HA-tagged AKT and Myc-tagged BAG5. Two days after transfection, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 20 min at room temperature, washed five times with PBS and permeabilized with 100% methanol for 6 min at −20°C. The localization of AKT and BAG5 was detected with HA and Myc antibodies, revealed by indirect immunofluorescence with secondary antibodies coupled to rhodamine and Cy5, respectively. Cells were sequentially incubated with HA and rhodamine-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 45 min at room temperature, then the secondary antibody was blocked before incubation with Myc antibodies followed by anti-mouse coupled to Cy5. Cells were observed using a DMIRE2 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Deerfield, IL) with a 63×, numerical aperture 1.4 oil immersion objective and a zoom of 4. The colocalization analysis was done with the Leica confocal software, LCS lite.

**AKT stability and *in vivo* ubiquitination assay.** To explore the effect of BAG5, Hsp70 and Parkin on AKT stability, cells were transfected with increasing amounts of plasmids coding for these proteins and HA-AKT as indicated in figure legends. In some experiments, a knockdown approach was used to assess the contribution of BAG5 to AKT degradation. In these cases, a specific BAG5 shRNA in pENTR was used, whereas controls were transfected with pENTR containing a non-related unspecific sequence. The effect of AKT activation on its sensitivity to be regulated by overexpression of BAG5 was assessed by comparing the effect of increasing concentrations of BAG5 in serum starved cells or cells stimulated with 10% serum. In some experiments, cells were incubated under what we called AKT-destabilizing conditions (ADC) consisting of serum-free media supplemented with 5µM CHX, to inhibit

protein synthesis, and 1μM 17AAG for different times up to 24 hours. To inhibit proteasome activity, cells were incubated with 20μM MG132 for 4 h. For *in vivo* ubiquitination assays, HeLa cells were transfected with plasmids coding for HA-Ubiquitin and Myc-BAG5 alone or with Myc-Parkin or EGFP-Hsp70. After 36 h, cells were starved with serum-free media for 12 h. Then incubated with 20μM MG132 for 4 h and lysed in TNTE buffer. Endogenous AKT was immunoprecipitated with a specific antibody as described above. Samples were boiled 5 min to elute proteins from beads in 1X Laemmli sample buffer. Immunoprecipitates and total cell lysates were resolved by SDS-PAGE using 6% gels and transferred onto PDVF membrane for immunoblotting analyses. Ubiquitinated AKT was visualized using anti-HA antibodies to reveal HA-tagged ubiquitin covalently bound to immunoprecipitated AKT. Hsp90 inhibitor 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) and cycloheximide (CHX) were purchased from Sigma, MG132 was from Calbiochem.

**BAG5 phosphorylation assays.** To test whether AKT played a role in the phosphorylation of BAG5, HEK293 cells in 10-cm dishes were transfected with Myc-BAG5 and control empty plasmid or plasmids coding for HA-AKT, myr-AKT or AKT-K179M, corresponding to wild type, constitutively active and dominant negative versions of AKT. Two days after transfection, serum starved cells were metabolically labeled for 4 h at 37$^{o}$C in 5 ml of Pi-free DMEM containing 0.1% (w/v) BSA and 100 μCi/ml $^{32}$Pi. After labeling, cells were washed with ice-cold DPBS and lyzed in 50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% (v/v) NP40, 1% (w/v) Na deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, containing 20 mM NaF, 10 mM Na pyrophosphate, 5 mM EDTA, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μg/ml pepstatin, 10 μg/ml benzamidine, 1 mM PMSF and 1 μM okadaic acid. Then, cell lysates were pre-cleared by being incubated with 2% (v/v) protein G plus/protein A-agarose for 1 h at 4$^{o}$C and immunoprecipitation of Myc-tagged BAG5 was performed by adding a high affinity myc antibody (1 μl) and 2% (v/v) protein G plus/protein A-agarose followed by incubation overnight at 4$^{o}$C. After washing of the sepharose-bound immune complexes in solubilization buffer lacking protease inhibitors, $^{32}$P-labeled phospho-BAG5 were eluted in Laemmli sample buffer for 1 h at 48$^{o}$C and resolved by SDS-PAGE (10% resolving gel) after loading equal amounts of protein in each lane prior to visualization in a Typhoon TRIO Variable Mode Imager (GE Healthcare).

**AKT phosphorylation.** To explore the effect of BAG5 knockdown or overexpression on AKT activation, in conditions in which BAG5 does not affect AKT stability, cells were transfected with increasing amounts BAG5-specific shRNA or Myc-BAG5 and maintained in 10% FBS-supplemented media. Then, phosphorylation of AKT at Ser-473 was detected by western blot in cells starved for 12 h and, in some experiments, treated with increasing concentrations of HGF as indicated in the corresponding figures.

**Wound healing and chemotaxis assays.** The effect of BAG5 on cell migration was assessed by wound healing and chemotaxis assays. Confluent cultures of HeLa cells, transfected with EGFP or EGFP-tagged BAG5, were scraped with a 10 μl pipette tip, washed with PBS and incubated in DMEM supplemented with 10 μg/ml HGF or 10% FBS. To prevent cell proliferation, 12 μM mitomycin (Sigma) was included during the whole incubation period after the wounding. Twenty-four hours later, cells were fixed and fluorescent cells that moved towards the wounded area were

counted. Chemotaxis assays were done in Boyden chambers essentially as previously described (33,34). Briefly, bottom wells were filled with serum-free DMEM containing 0.1% bovine serum albumin (used as vehicle) and either 10 μg/ml HGF or 10% FBS and covered with a polycarbonate filter (8 μm pore; Neuro Probe), previously coated with 2% gelatin (from bovine skin, type B, Sigma). The chamber was assembled following instructions provided by the manufacturer. Then serum starved transfected HeLa cells, suspended in serum-free media supplemented with 0.1% bovine serum albumin, were placed in the upper wells (50,000 cells/well) of a 48 well chamber. Cells were left to migrate for 6 h. Then the filters were fixed with methanol, stained with crystal violet, and nonmigrating cells that remained at the upper side of the filter were removed with a cotton swab. Filters were placed on a glass slide and scanned. Densitometric quantification of migrating cells was determined with the ImageJ software.

**Statistical analysis.** All experiments were repeated at least three independent times. Results were analyzed by one way ANOVA and student t test using the Graph Pad software, version 5, and represented as means +/- standard errors, indicating statistically significant differences when < 0.05.

## Results

**Identification of BAG5 as an AKT-interacting protein.** AKT is a key serine/threonine kinase constituted by a pleckstrin homology domain followed by a central catalytic kinase domain and a regulatory domain extended towards the carboxyl-terminus (Figure 1A). In order to identify new potential regulators or substrates with affinity for the catalytic domain of AKT, we used its kinase domain, with a K179M mutation characteristic of a dominant negative version of this kinase (AKT-KDD) (35), as bait in a yeast two-hybrid assay to screen a human fetal brain cDNA library and cloned full length BAG5 as an AKT-interacting protein (Fig. 1A). In the yeast two hybrid system, the specificity of the interaction between AKT and BAG5 was demonstrated by the growth of cells in the absence of histidine, attributable to the expression of Gal4-dependent genes that also promoted the expression of an α-galactosidase reporter, only of those cells transformed with the combination of plasmids coding for AKT-KDD and BAG5 or, as positive controls, p53 and the SV40 large T antigen (pTD1), used due to their known interaction (Figure 1B, right panel). Yeast grew in media lacking leucine and tryptophan, which selected for the presence of the different transformed plasmids (regardless of potential protein interactions) (Fig. 1B, left panel), further indicating that in media lacking histidine, leucine and tryptophan (-HLT), the absence of growth in cells transformed with AKT-KDD and pTD1 or BAG5 and p53 (Figure 1B, right panel) was in fact due to the lack of interactions between these proteins. These results confirmed the specificity of interaction between AKT and BAG5 in the yeast two hybrid system. To assess whether AKT and BAG5 interact in mammalian cells, the human epithelial cell line HEK293T was transfected with full length AKT1 and BAG5, tagged with HA in the case of AKT and either Myc or GST in the case of BAG5, and the potential interaction between these proteins was tested by co-immunoprecipitation or pulldown. Consistent with the results of the yeast two-hybrid assay, Myc-BAG5 co-immunoprecipitated with HA-AKT (Fig. 1C), whereas HA-AKT was detected in the GST-BAG5 pulldown, but not in the control pulldown containing an equivalent amount of isolated GST (Fig. 1D).

BAG5 belongs to a group of chaperone regulators whose structure is characterized by the presence of at least one BAG domain (26,36). In this case, BAG5 contains four BAG domains, one at the amino terminus followed

by a linker sequence and three additional BAG domains towards the carboxyl terminus (Fig. 1A) (25-27). To identify the region of BAG5 that interacts with AKT, and considering that the only site in this protein that corresponds to a partially conserved AKT phosphorylation consensus motif corresponds to threonine 152 (LR**K**A**R**YH**T**LT), located within the linker region, we generated three different BAG5 constructs, fused to GST, in all of which the linker region was present (Figure 1E, right panel, upper section). Pull-down assays revealed the importance of the BAG5 linker region for its interaction with AKT, as revealed by the ability of all GST-BAG5 constructs, containing this region, but not GST-alone, to interact with AKT (Figure 1E, left panel, upper section). The BAG5 linker region, extending from N87 to P181 showed the higher level of interaction with AKT, even though this construct was expressed at lower levels compared to other BAG5 constructs (Figure 1E, left panel, middle section). The interaction was specific as indicated by the absence of AKT in the pull down of GST and the lack of significant interaction between ERK and BAG5 constructs (Fig. 1E, left panel, upper section). In these experiments, transfection of HA-AKT and HA-ERK was adjusted to obtain similar levels of expression of both kinases (Figure 1E, left panel, lower section). Moreover, the catalytic domain of AKT (with the mutation K179M equivalent to the bait used in the yeast two hybrid system), in this case fused to EGFP, specifically interacted with the BAG5 linker region, expressed as a GST-fusion protein, but not with GST used as control, as revealed by its presence just in the lane corresponding to pulled down GST-BAG5(N87-P181) (Fig. 1F, left panel). We next examined by co-immunoprecipitation the interaction between AKT and BAG5 endogenously expressed in HeLa cells. As shown in Figure 1G, AKT interacted with BAG5 as revealed by its presence in the lane in which immunoprecipitated BAG5 was electrophoresed, whereas it was barely detectable in the control lane in which a non-related antibody was used as control during the immunoprecipitation.

**AKT and BAG5 co-localize at the cell periphery.** To determine the subcellular distribution and possible colocalization of AKT and BAG5, HeLa cells were transfected with HA-tagged AKT and Myc-tagged BAG5. Confocal microscopy analysis showed that AKT was mainly distributed at the cytosol and associated to the plasma membrane (Fig. 1H, first picture), whereas BAG5 was also visualized at the cell periphery (Fig. 1H, second picture). These coexpressed proteins exhibited a similar localization pattern, mainly at the cell periphery. Noteworthy that BAG5 subcellular localization when it was coexpressed with AKT, showed the distribution observed in the representative example in 45 % of cells (9/20). AKT and BAG5 colocalization was detected at the plasma membrane, in the overlapped image (Fig. 1H, third and fourth pictures), as yellow stained regions indicated by arrowheads in figure 1H, fourth picture.

**BAG5 promotes AKT ubiquitination and degradation.** Evidence that guided to a potential involvement of BAG5 as a regulator of AKT stability emerged from initial experiments in which the interaction between AKT and BAG5 was characterized in mammalian cells. We found that different constructs of BAG5 reduced the expression of cotransfected AKT or its kinase domain (see total cell lysates, TCL, in Fig. 1D, E and F). Thus, considering that BAG proteins are recognized as chaperone regulators and in particular BAG5 regulates protein stability through Hsp70 and modulates the activity of Parkin, an E3 ligase involved in the progression of Parkinson disease, we wanted to evaluate the role of BAG5 as a potential

modulator of AKT stability. As shown in Figure 2A, GST-tagged BAG5 significantly decreased the levels of the dominant negative mutant of the catalytic domain of AKT (EGFP-AKT-KDD). Moreover, increasing levels of Myc-BAG5 resulted in a decrease of AKT expression (Fig. 2B, left), as detected either with HA antibodies that recognized cotransfected AKT and with antibodies that detected the phosphorylation of this kinase at Thr450, a site whose phosphorylation has been considered critical for AKT posttranslational stability (11,37,38). The specificity of BAG5 over AKT stability was further evidenced by the lack of effect on GSK-3β and ERK expression that remained unaltered despite BAG5 overexpression (Fig. 2B, left). In contrast, shRNA-mediated knockdown of BAG5 significantly increased the expression of transfected AKT detected by western blot with anti-HA antibodies (Fig. 2B, right).

We then assessed the effect of BAG5 on AKT expression in a situation known to put AKT stability at limit (8) consisting of starvation in conditions in which protein synthesis and Hsp90 chaperone activity were inhibited. These AKT destabilizing conditions (ADC, serum free media containing 5μM cycloheximide and 1 μM 17AAG) lead to a time-dependent reduction in the expression of AKT which was more noticeable when Myc-BAG5 was coexpressed (Fig. 2C). Consistent with previous results, BAG5 also reduced the levels of phospho-AKT (T450) without affecting the levels of endogenous Rac used as control (Fig. 2C). Figure 2D shows that HA-AKT protein levels were significantly reduced by exposure to ADC conditions, being this effect more pronounced in cells expressing Myc-BAG5. In contrast, BAG5 knockdown significantly interfered with the effect of ADC to reduce AKT expression (Fig. 2E), further confirming that BAG5 promotes AKT destabilization. ERK and Rac protein levels, used as controls, did not change their expression in response to ADC regardless of changes in the expression of BAG5, either by overexpression or knockdown (Fig. 2B, C and E). In order to start exploring the mechanism by which BAG5 promoted AKT degradation, we assessed whether AKT was targeted to ubiquitination via BAG5. *In vivo* ubiquitination assays using HeLa cells transfected with plasmids coding for HA-ubiquitin and Myc-BAG5 revealed that BAG5 indeed promoted ubiquitination of endogenous AKT (Fig 2F), as revealed by western blot with anti-HA antibodies that evidenced a smear of ubiquitin covalently bound to immunoprecipitated AKT (Fig. 2F, lane 4). In the presence of MG132, a potent proteasome inhibitor, BAG5 leads to a higher accumulation of ubiquitinated AKT (Fig. 2F, lane 5 vs 6). Altogether, these results indicate that BAG5 promoted AKT degradation via ubiquitination.

**Hsp70 mediates AKT degradation promoted by BAG5.** BAG5 is a known modulator of Hsp70 activity (24,25) and this molecular chaperone has been reported as a controller of AKT stability (23). Thus, we tested the hypothesis that BAG5 promotes AKT ubiquitination and degradation via the intervention of Hsp70. First, we evaluated the existence of a complex including AKT, BAG5 and Hsp70 in HEK293T by pull-down experiments of GST-BAG5. Consistent with previous results, HA-AKT interacted with BAG5 (Fig. 3A, left panel). In addition, Hsp70 (tagged with EGFP) interacted with BAG5 and reduced the amount of AKT present in the pulldown (Fig. 3A, left panel), suggesting that Hsp70 competed with AKT in the interaction with BAG5. As expected, BAG5 caused a reduction in AKT levels and this effect was more evident in the presence of Hsp70, as observed by western blot using anti-HA antibodies in total cell lysates (Fig. 3A, right panel). The expression of Hsp70 and BAG5 was confirmed in total cell lysates using anti-EGFP and GST antibodies. Interestingly,

while Hsp70 contributed to the degradation of AKT, it did not affect the expression of BAG5. Consistent with previous studies (23) Hsp70 reduced the expression of AKT, both endogenous and transfected (detected with anti-HA antibodies) and this effect was more pronounced with increasing amounts of transfected Hsp70 (Fig. 3B), which did not affect the expression of S6 used as control. Furthermore, Hsp70 overexpression promoted AKT ubiquitination, an effect that was exacerbated in the presence of MG132 (Fig. 3C). Interestingly, the effect of Hsp70 as a promoter of AKT degradation was significantly reduced in BAG5 knockdown cells (Fig. 3D). This effect was specific as indicated by the equal expression of ERK as well as S6 in conditions in which Hsp70 was overexpressed both in control or BAG5 knockdown cells, suggesting that BAG5 contributes to the role of Hsp70 as a promoter of AKT degradation (Fig. 3D).

**Parkin promotes AKT ubiquitination and degradation and contributes to the effect of BAG5.** Previous reports described the interaction between BAG5 and the E3 ubiquitin ligases Parkin and CHIP in events associated with degeneration of dopaminergic neurons (25,39). On the other hand, E3 ligases such as CHIP cooperate with molecular chaperones such as Hsp70 to promote ubiquitination and degradation of selected protein targets via the ubiquitin proteasome system (40-43). Thus, we tested the hypothesis that Parkin promotes AKT ubiquitination and degradation and contributes to the effect of BAG5. In order to assess this possibility, we first investigated whether Parkin interacts with BAG5 and regulates its interaction with AKT. As shown in Figure 4A, left panel, Myc-tagged Parkin interacted with GST-BAG5 and inhibited the interaction of HA-AKT. Parkin also contributed to reduce the expression of AKT as detected in total cell lysates by western blot with HA antibodies (Fig.4A, right panel). In addition, the expression of BAG5 was also reduced by the expression of Parkin, as evidenced by a decrease in the amount of GST-BAG5 detected in the pulldown. To further characterize the effect of Parkin on AKT stability, cells were transfected with HA-AKT and increasing amounts of Parkin, Consistent with initial observations, increasing expression of Parkin led to a dose-dependent decrease of AKT protein levels, without affecting the stability of GSK-3β used as control (Fig. 4B). Furthermore, Parkin was able to promote ubiquitination of endogenous AKT (Fig. 4C). In order to assess whether Parkin and BAG5 when expressed together are more effective as promoters of AKT degradation, cells were transfected with BAG5 and Parkin at protein levels that had a weak AKT destabilizing effect (Fig. 4D, upper panel, lanes 2 and 3 compared to lane 1), with the idea that they would have a stronger effect when expressed together. As predicted, when such amounts of Parkin and BAG5 were transfected jointly, their AKT destabilizing effect was significantly increased (Fig. 4D, upper panel, lane 4 and bottom graph), being even more effective than the effect of higher levels of BAG5 and Parkin transfected independently with four times the amount of plasmid used in the previous condition (Fig. 4D, upper panel, compare lanes 5 and 6 with lane 4). The specificity of the effect was confirmed by assessing the expression of ERK, which remained unaffected regardless of Parkin and BAG5 expression. These findings collectively suggest a potential involvement of Parkin in the ubiquitination and degradation of AKT resulting from its interaction with BAG5.

**Phosphorylation of BAG5 by AKT correlates with a reduction on the interaction between them.** Since the ability of BAG5 to promote AKT degradation was particularly effective in conditions that put AKT stability to the limit (Fig. 2C), we hypothesized that AKT stimulation modulates

its interaction with BAG5 as a consequence of the phosphorylation of this interactor. To start addressing this possibility, HeLa cells transfected with HA-AKT and Myc-BAG5 were stimulated with hepatocyte growth factor (HGF), then AKT was immunoprecipitated with HA antibodies and the presence of BAG5 bound to it was assessed by western blot using anti Myc antibodies. Controls included non-stimulated cells in which vehicle was added instead of HGF and cells in which just BAG5 or AKT were transfected. As shown in Figure 5A, left panel, BAG5 more effectively interacted with HA-AKT in non-stimulated cells (- HGF), whereas the amount of BAG5 that interacted with HA-AKT in HGF-stimulated cells was significantly reduced (Fig. 5A left panel, upper section and graph at the bottom). As expected, HGF effectively induced AKT and ERK activation as demonstrated by their phosphorylation visualized in total cell lysates (Fig. 5A, right panel). These results suggest that activation of AKT disrupts its interaction with BAG5. A possible mechanism that explains why the interaction between AKT and BAG5 is disrupted upon AKT stimulation, is that AKT phosphorylates BAG5 resulting in a reduction of its affinity for the kinase. To assess this possibility, the phosphorylation of BAG5 was tested in HEK293T cells transfected with myristoylated-AKT, which has been demonstrated to be a constitutively active kinase (44), or either wild type or kinase dead variants. Controls included cells in which AKT was not transfected. Cells were incubated with radioactive orthophosphate and phosphorylation of immunoprecipitated Myc-BAG5 was detected by autoradiography. As shown in Figure 5B, BAG5 was phosphorylated under basal conditions (in the absence of transfected AKT) and this phosphorylation was significantly increased in cells expressing constitutively active myristoylated AKT, or wild type AKT, but not in cells overexpressing the catalytically inactive mutant version of this kinase. These observations placed BAG5 as a potential AKT substrate and support the hypothesis that unphosphorylated BAG5 preferentially interacts with unstimulated AKT.

**BAG5 modulates AKT phosphorylation and HGF-dependent cell migration.** AKT activation is achieved via phosphorylation at Thr308 and Ser473, which are located at the kinase and the regulatory carboxyl-terminal domains, respectively. The phosphorylation of these sites is critical to allow the intervention of this kinase in multiple processes including cell migration and can be monitored to detect its activation status (2,45). Thus, considering the reciprocal regulation occurring between AKT and BAG5, we hypothesized that besides being a promoter of AKT degradation under adverse nutritional conditions, BAG5 might also regulate AKT activation and cell migration in conditions in which the stability of the kinase is not particularly compromised. In order to test this hypothesis, we explored the influence of BAG5 on AKT activity evidenced by its phosphorylation at Ser473 and in cell migration studied tested by wound healing and chemotactic assays.

We initially assessed the effect of knocking-down or overexpressing BAG5 on the phosphorylation status of AKT at Ser473. Consistent with a regulatory role of BAG5 on AKT activation, the phosphorylation of AKT was reciprocally affected by expression of BAG5, whereas BAG5 knockdown increased AKT phosphorylation, this posttranslational modification was progressively inhibited by increasing amounts of Myc-BAG5 (Fig. 6A, upper panel). In order to assess this effect in cells stimulated with HGF, HeLa cells were transfected with an amount of HA-BAG5 that would not affect AKT stability. Then, cells were stimulated with increasing doses of HGF and the phosphorylation of AKT and ERK, used as control, was detected by western blot. AKT phosphorylation at Ser473 was

stimulated by HGF in a dose-dependent manner and this phosphorylation was attenuated when HA-BAG5 was expressed at two different doses, in conditions in which the expression of total AKT remained comparable (Fig. 6B). The specificity of this effect is evident when comparing the influence of BAG5 on AKT and ERK phosphorylation. While BAG5 attenuated the phosphorylation of AKT, it did not affect the phosphorylation of ERK assessed in the same total cell lysates (Fig. 6B).

To determine the influence of BAG5 on cell migration, a complex cellular event known to involve AKT activation (2,45), migration of HeLa cells transfected with EGFP or BAG5 fused to this fluorescent protein (EGFP-BAG5) was assessed by wound healing assays, whereas the effect of HA-tagged BAG5 was tested in chemotaxis assays in Boyden chambers. Wound healing assays revealed that expression of BAG5 significantly reduced HeLa cell migration in response to HGF (detected by the migration of BAG5-tagged fluorescent cells into the wounded area) (Fig. 6C), whereas it showed a similar tendency in cells stimulated with serum, although it did not reach a statistically significant difference. Chemotaxis assays also revealed that BAG5 interfered with HGF-dependent cell migration without significantly altering the response to fetal bovine serum (Fig. 6D).

Altogether, our findings suggest a mechanism of reciprocal regulation between BAG5 and AKT depicted in the model presented in Figure 6E. Accordingly, AKT interacts with BAG5 under resting unstimulated cell conditions. When the nutritional status gets critical, BAG5 targets AKT to ubiquitination and degradation with the participation of the molecular chaperone Hsp70 and the E3 ligase Parkin. On the contrary, upon cell stimulation, AKT is activated controlling multiple processes including cell migration and escapes from BAG5-dependent regulation by phosphorylating it and reducing their mutual interaction. This reciprocal regulation depends on the levels of expression of BAG5 which, besides contributing to target AKT for degradation, also modulates AKT activation at doses that do not affect AKT expression (Fig. 6E).

## Discussion

Clinical studies in cancer patients have confirmed the importance of targeting the PI3K/AKT signaling pathway, which is frequently exacerbated due to activating mutations in genes encoding key components of this signaling route (46). PI3K/AKT also play a central role in metabolic diseases such as diabetes and obesity. Our findings demonstrate a novel mechanism of regulation of AKT stability. Accordingly, we postulate a model in which AKT is degraded as a consequence of its interaction with BAG5 which, under starvation conditions interacts with AKT and targets this kinase to ubiquitination with the participation of the molecular chaperone Hsp70 and the E3 ligase Parkin. This process would help to fine tune the apoptotic threshold when starvation conditions are critical, but would be turned off by dissociation of AKT from BAG5 in response to growth factors, resulting from the phosphorylation of BAG5 by AKT (depicted in the model presented in Fig. 6E).

Our results suggest that BAG5 promotes a decrease of AKT synthesis or contributes to its degradation. We found that BAG5, mainly through an internal region containing a pseudo-BAG domain, interacts with the serine/threonine kinase domain of AKT. Full length BAG5, as well as the minimal interacting region extending from N87 to P181, promotes a decrease of AKT expression. Moreover, the short interacting region of BAG5 reduces the expression of individually expressed AKT kinase domain. Since BAG5 is known to interact with the

molecular chaperone Hsp70 and the E3 ligase Parkin (24,25) and, as we show here, overexpression of either BAG5, Hsp70 or Parkin induces AKT ubiquitination and degradation, we hypothesized that BAG5 regulates AKT degradation through a pathway that includes the participation of Hsp70 and Parkin. This is consistent with the reported mechanism of a protein complex formed by Hsp70 and Parkin, which acts as a molecular switch that determines the degradation of Parkin substrates as a consequence of Parkin dissociation (47). In that case, Parkin dissociates from Hsp70 upon interaction of Hsp70 with CHIP, thus CHIP serves as an indirect controller of Parkin activity (47). Similarly, BAG5 might be a regulator of Parkin activity due to its ability to interact with both Hsp70 and Parkin, thus modulating AKT degradation through the sequential effect of these proteins. Therefore, according to our results, BAG5 captures AKT under starvation conditions and presents it to the Hsp70/Parkin complex which, similarly to the action of CHIP, could be sensitive to BAG5, resulting in the ubiquitination and degradation of AKT. Consistent with this model, Dickey and colleagues demonstrated that small molecules that allosterically inhibit the Hsp70 ATPase activity lead to a decrease on AKT levels (23). Particularly, an increase on Hsp70 levels combined with inhibition of its ATPase activity renders AKT unstable and results in an overall decrease of its expression (23). Our results also show that Hsp70 overexpression reduces AKT levels and further support the participation of BAG5 in the system, as indicated by the reduced effect of Hsp70 in BAG5 knockdown cells, suggesting that BAG5 in fact modulates the action of Hsp70 towards AKT. Since BAG5 promotes Hsp70 refolding activity (24), our observations extend the possibilities of how this chaperone is controlled by including BAG5 as a dual element able to modulate Hsp70 (as reported) but also bringing AKT to the complex. Intriguingly, different variants of Hsp70 have opposite effects on AKT stability, further emphasizing the existence of a refined mechanism of control of AKT stability (23).

Parkin, an ubiquitin ligase whose activity is enhanced by interacting proteins, promotes AKT degradation when acting together with BAG5. This interpretation is supported by experiments in which suboptimal doses of Parkin and BAG5 when transfected together exert a stronger effect compared to either Parkin of BAG5 alone, even when transfected at four times higher doses. Similarly, Parkin is indirectly regulated by CHIP which was revealed as a Hsp70-interacting protein that promotes ubiquitination of Parkin targets. The underlying mechanism involves CHIP-promoted dissociation of Hsp70 from Parkin complexes (47). A plausible explanation of the role of Parkin in BAG5-dependent AKT degradation is that upon interacting with BAG5, AKT may undergo a conformational change provoked by Hsp70, thus acquiring the most suitable conformation to become a target for Parkin-dependent ubiquitination.

The effect of BAG5 on AKT stability is regulated by growth factor signaling. We found that AKT interacts with BAG5 under stressful serum starvation conditions but dissociates in response to hepatocyte growth factor. This correlates with the phosphorylation of BAG5, suggesting a mechanism of action linked to the signaling status of the cell. Our results contribute to reconcile the apparently conflicting observations on the role of BAG5 on cell viability, as it has been demonstrated that either promotes cell death or survival (25,48).

Several differences can be highlighted among reported mechanisms of control of AKT ubiquitination/degradation and the mechanism described in this study. Here, we described a mechanism relevant under critical serum starvation. In contrast, fully active AKT, phosphorylated at Ser473, is

preferentially ubiquitinated and targeted to degradation by the E3 ligase Mulan (14). In addition, it is known that Mulan is a mitochondrial protein with its ring finger E3-ligase active domain exposed to the cytosol (15), implying that Mulan-dependent ubiquitination of AKT occurs associated to the cytosolic face of the mitochondria. As we showed here, BAG5 colocalizes with AKT at the cell periphery, suggesting this subcellular location as the site of BAG5-dependent AKT ubiquitination.

As in the case of BAG5, TRB3, other endogenous inhibitor of AKT, interacts with this kinase under poor nutritional conditions. As mentioned, the interaction between AKT and BAG5 occurs under starvation conditions; similarly, TRB3, an inhibitor that interferes with the phosphorylation of AKT at Thr308, preferentially interacts with AKT in the liver of fasted mice, as detected in immunoprecipitates from whole liver (5). Although TRB3 inhibits AKT without affecting its expression, it regulates other proteins acting as an adaptor that leads its degradation. In particular, it interacts with acetyl-coenzyme A carboxylase and regulates its degradation through association with the E3 ligase COP1 (49). According to our results, BAG5 has a dual influence on AKT, it targets the kinase to degradation under critical serum starvation, but also affects its activation in conditions in which AKT stability is not altered. This regulation is reciprocal as evidenced by the phosphorylation of BAG5 by AKT which correlates with a reduction of the interaction between these proteins. Thus, this reciprocal mechanism fine tunes the regulation of AKT under critical and stimulated conditions as depicted in the model shown in Figure 6E.

Altered mechanisms related to AKT regulation are involved in cancer and metabolic diseases. Thus, downregulation of AKT expression is of clinical interest in oncology. Finding the mechanisms that determine the apoptotic threshold will contribute to optimize anti-oncogenic therapies, many of which are particularly oriented to promote apoptotic death of cancer cells. On the contrary, degenerative diseases emerge from undesirable premature cell loss, thus promoting cell survival is a therapeutic goal in these situations. Our results showing that BAG5 levels correlate with AKT stability open the possibility for future studies in which modulation of BAG5 expression and activity would increase the effectiveness of pharmacological strategies targeting the PI3K/AKT signaling pathway.

**References.**


1. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) *Cell* **129**(7), 1261-1274
2. Xue, G., and Hemmings, B. A. (2013) *J Natl Cancer Inst* **105**(6), 393-404
3. Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(1), 9-22
4. Franke, T. F. (2008) *Sci Signal* **1**(24), pe29
5. Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., and Montminy, M. (2003) *Science* **300**(5625), 1574-1577
6. Du, K., and Tsichlis, P. N. (2005) *Oncogene* **24**(50), 7401-7409
7. Liao, Y., and Hung, M. C. (2010) *Am J Transl Res* **2**(1), 19-42
8. Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tsichlis, P., and Rosen, N. (2002) *J Biol Chem* **277**(42), 39858-39866
9. Yan, D., Guo, L., and Wang, Y. (2006) *J Cell Biol* **174**(3), 415-424
10. Riesterer, O., Zingg, D., Hummerjohann, J., Bodis, S., and Pruschy, M. (2004) *Oncogene* **23**(26), 4624-4635

11. Oh, W. J., Wu, C. C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L. A., Finlan, M., Roux, P. P., Su, B., and Jacinto, E. (2010) *EMBO J* **29**(23), 3939-3951
12. Martin, D., Salinas, M., Fujita, N., Tsuruo, T., and Cuadrado, A. (2002) *J Biol Chem* **277**(45), 42943-42952
13. Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A. J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T., and Noguchi, M. (2009) *Dev Cell* **17**(6), 800-810
14. Bae, S., Kim, S. Y., Jung, J. H., Yoon, Y., Cha, H. J., Lee, H., Kim, K., Kim, J., An, I. S., Um, H. D., Park, I. C., Lee, S. J., Nam, S. Y., Jin, Y. W., Lee, J. H., and An, S. (2012) *Cell Res* **22**(5), 873-885
15. Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S., and Joazeiro, C. A. (2008) *PLoS One* **3**(1), e1487
16. Joo, H. M., Kim, J. Y., Jeong, J. B., Seong, K. M., Nam, S. Y., Yang, K. H., Kim, C. S., Kim, H. S., Jeong, M., An, S., and Jin, Y. W. (2011) *Eur J Cell Biol* **90**(5), 420-431
17. Wu, Y. T., Ouyang, W., Lazorchak, A. S., Liu, D., Shen, H. M., and Su, B. (2011) *J Biol Chem* **286**(16), 14190-14198
18. Yang, W. L., Wang, J., Chan, C. H., Lee, S. W., Campos, A. D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B. C., Lin, X., Darnay, B. G., and Lin, H. K. (2009) *Science* **325**(5944), 1134-1138
19. Chan, C. H., Li, C. F., Yang, W. L., Gao, Y., Lee, S. W., Feng, Z., Huang, H. Y., Tsai, K. K., Flores, L. G., Shao, Y., Hazle, J. D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M. C., Nakayama, K. I., and Lin, H. K. (2012) *Cell* **149**(5), 1098-1111
20. Fan, C. D., Lum, M. A., Xu, C., Black, J. D., and Wang, X. (2013) *J Biol Chem* **288**(3), 1674-1684
21. Sun, J., and Liao, J. K. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(12), 2238-2244
22. Yun, B. G., and Matts, R. L. (2005) *Cell Signal* **17**(12), 1477-1485
23. Koren, J., 3rd, Jinwal, U. K., Jin, Y., O'Leary, J., Jones, J. R., Johnson, A. G., Blair, L. J., Abisambra, J. F., Chang, L., Miyata, Y., Cheng, A. M., Guo, J., Cheng, J. Q., Gestwicki, J. E., and Dickey, C. A. (2010) *J Biol Chem* **285**(4), 2498-2505
24. Arakawa, A., Handa, N., Ohsawa, N., Shida, M., Kigawa, T., Hayashi, F., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2010) *Structure* **18**(3), 309-319
25. Kalia, S. K., Lee, S., Smith, P. D., Liu, L., Crocker, S. J., Thorarinsdottir, T. E., Glover, J. R., Fon, E. A., Park, D. S., and Lozano, A. M. (2004) *Neuron* **44**(6), 931-945
26. Kabbage, M., and Dickman, M. B. (2008) *Cell Mol Life Sci* **65**(9), 1390-1402
27. Takayama, S., and Reed, J. C. (2001) *Nat Cell Biol* **3**(10), E237-241
28. Vazquez-Prado, J., Basile, J., and Gutkind, J. S. (2004) *Methods Enzymol* **390**, 259-285
29. Zeng, X. C., Bhasin, S., Wu, X., Lee, J. G., Maffi, S., Nichols, C. J., Lee, K. J., Taylor, J. P., Greene, L. E., and Eisenberg, E. (2004) *J Cell Sci* **117**(Pt 21), 4991-5000
30. Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24), 13354-13359
31. Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(5), 1747-1758
32. Murga, C., Fukuhara, S., and Gutkind, J. S. (2000) *J Biol Chem* **275**(16), 12069-12073
33. Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernandez-Garcia, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., and Vazquez-Prado, J. (2010) *Mol Pharmacol* **77**(3), 435-442

34. Guzman-Hernandez, M. L., Vazquez-Macias, A., Carretero-Ortega, J., Hernandez-Garcia, R., Garcia-Regalado, A., Hernandez-Negrete, I., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vazquez-Prado, J. (2009) *J Biol Chem* **284**(27), 18334-18346
35. Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998) *Oncogene* **17**(3), 313-325
36. Doong, H., Vrailas, A., and Kohn, E. C. (2002) *Cancer Lett* **188**(1-2), 25-32
37. Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., and Jacinto, E. (2008) *EMBO J* **27**(14), 1932-1943
38. Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K. L. (2008) *EMBO J* **27**(14), 1919-1931
39. Kalia, L. V., Kalia, S. K., Chau, H., Lozano, A. M., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2011) *PLoS One* **6**(2), e14695
40. Paul, I., Ahmed, S. F., Bhowmik, A., Deb, S., and Ghosh, M. K. (2013) *Oncogene* **32**(10), 1284-1295
41. Shang, Y., Zhao, X., Xu, X., Xin, H., Li, X., Zhai, Y., He, D., Jia, B., Chen, W., and Chang, Z. (2009) *Biochem Biophys Res Commun* **386**(1), 242-246
42. Qian, S. B., McDonough, H., Boellmann, F., Cyr, D. M., and Patterson, C. (2006) *Nature* **440**(7083), 551-555
43. Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Hohfeld, J., and Patterson, C. (2001) *J Biol Chem* **276**(46), 42938-42944
44. Kohn, A. D., Takeuchi, F., and Roth, R. A. (1996) *J Biol Chem* **271**(36), 21920-21926
45. Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K., and Takahashi, M. (2005) *Dev Cell* **9**(3), 389-402
46. Holmes, D. (2011) *Nat Rev Drug Discov* **10**(8), 563-564
47. Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., and Takahashi, R. (2002) *Mol Cell* **10**(1), 55-67
48. Bruchmann, A., Roller, C., Walther, T. V., Schafer, G., Lehmusvaara, S., Visakorpi, T., Klocker, H., Cato, A. C., and Maddalo, D. (2013) *BMC Cancer* **13**, 96
49. Qi, L., Heredia, J. E., Altarejos, J. Y., Screaton, R., Goebel, N., Niessen, S., Macleod, I. X., Liew, C. W., Kulkarni, R. N., Bain, J., Newgard, C., Nelson, M., Evans, R. M., Yates, J., and Montminy, M. (2006) *Science* **312**(5781), 1763-1766

**Acknowledgments**

We acknowledge Margarita Valadez Sánchez, David Pérez and Jaime Estrada for technical assistance provided. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grants 152434 (to J.V.P.) and 079429 (to G.R.C.). I.B.-V. is a Ph.D. student supported by fellowship from CONACyT.

**Figure Legends.**

**Figure 1. BAG5 interacts with AKT. A)** Schematic representation of AKT and BAG5 structures indicating as Bait and Prey their corresponding interacting domains. **B)** BAG5 and AKT interact in the yeast two hybrid system. AKT-KDD (dominant negative mutant of the catalytic domain of AKT) was used as bait to screen a human fetal brain cDNA library in a yeast two-hybrid system. A full length clone of BAG5 was identified as a novel AKT-interactor protein. The specificity of the interaction between BAG5 and AKT was determined using p53

and pTD1 (T antigen) as negative control bait and prey, respectively, whereas the known interaction between p53 and T antigen served as positive control of the system. All yeast grew on media lacking leucine and tryptophan (-LT, which selects for the presence of the plasmids, left) but only those in which interactions occurred grew in media lacking histidine, leucine and tryptophan and were positive for the activity of α-galactosidase (-HLT+ Xα-Gal, right). **C** and **D)** Transfected AKT and BAG5 interact in mammalian cells. HEK-293T cells were co-transfected with HA-AKT and Myc-BAG5 (C) or with HA-AKT and GST-BAG5 (D), as indicated. Total cell lysates (TCL) were either immunoprecipitated using anti-HA antibodies (C, IP:HA) or pulled-down using glutathione beads (D, PD:GST). BAG5 that coimmunoprecipitated with AKT was detected with Myc-specific antibodies (C) whereas AKT that interacted with pulled-down BAG5 was detected with HA-specific antibodies (D); the expression of both proteins was confirmed in total cell lysates (C and D, TCL). **E)** BAG5 linker region (N87-P181) interacts with AKT but not with ERK. The illustrated BAG5 constructs including the N87-P181 linker region alone or extended towards the first or last three BAG domains fused to GST were used to identify the region in BAG5 that interacts with AKT, the specificity of the interaction was confirmed by comparison against ERK. GST was used as a negative control. GST-BAG5 pull-down assays were performed in HEK-293T cells transiently co-transfected with HA-AKT and HA-ERK and either one of the indicated BAG5 constructs. The ability of either AKT or ERK (both tagged with HA) to interact with BAG5 constructs was revealed by western blot using anti HA antibodies. Graph represents the mean densitometric values of HA-AKT bound to BAG5 obtained from three independent experiments (mean ± S.E.M). **F)** BAG5-linker region (N87-P181) interacts with the kinase dead domain of AKT. The interaction between GST-BAG5-linker region (N87-P181) and EGFP-AKT-KDD was determined by pull-down assays using glutathione resin, the fraction of AKT-KDD that interacted with BAG5-linker region was revealed by western blot using EGFP antibodies (left panel), whereas its expression cas confirmed in total cell lysates (TCL, right panel). **G)** Endogenous AKT interacts with BAG5. HeLa cells lysates were used to immunoprecipitate endogenous BAG5 and the presence of AKT bound to it was revealed by western blot in the immunoprecipitate (IP) whereas its expression was confirmed in TCL. As a negative control (C) a non related antibody (anti-PAK) was used instead of the anti-BAG5 antibody. The arrows indicate the bands corresponding to AKT, BAG5 or IgG heavy chain. **H)** Subcellular distribution of AKT and BAG5 in HeLa cells. HeLa cells were transfected with HA-AKT and Myc-BAG5. Forty eight hours post-transfection cells were fixed and stained with anti-HA and anti-Myc antibodies as described in Material and Methods and analyzed by confocal microscopy. Merged images show co-localization of AKT and BAG5 as yellow stained areas indicated by arrowheads in F. Bar, 20μm.

**Figure 2. BAG5 promotes AKT ubiquitination and degradation. A)** BAG5 overexpression reduces AKT-KDD protein levels. HeLa cells were transiently transfected with AKT-KDD and BAG5 (fused to EGFP and GST, respectively) or AKT-KDD and GST, as indicated. AKT-KDD and BAG5 expression was detected by western blot in total cell lysates using anti-EGFP or anti-GST specific antibodies, respectively. Graph shows the densitometric analysis of AKT-KDD expression in the presence or absence of BAG5 of three independent experiments. Mean ± S.E.M, ***,$p<0.001$ compared with the effect of GST, used as control. **B)** AKT protein levels are reciprocally regulated by changes in the expression of BAG5. Increasing amounts of Myc-BAG5 induce a decrease of AKT protein expression detected by western blot anti HA or anti-phospho-AKT (Thr450) (left panel), without altering the expression of GSK-3β or ERK detected in the

same total cell lysates. On the contrary, BAG5 knockdown (shBAG5) results in an increase of HA-AKT protein levels coincident with the decrease of BAG5 expression (right panel). Bars represent the densitometric values of AKT expression in control and BAG5 knockdown cells according to the blots of three independent experiments. Mean ± S.E.M., **, p<0.01. **C)** BAG5 accelerates AKT degradation under AKT destabilizing conditions (ADC). HeLa cells transiently transfected with HA-AKT and Myc-BAG5 were treated with 5μM of cycloheximide (CHX) and 1μM of 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) in serum-free media, a condition known to destabilize AKT (8), during the indicated times. The expression of AKT, phospho-AKT (T-450) and BAG5 was detected by western blot in total cell lysates (anti-HA for AKT and anti Myc for BAG5), as well as the expression of Rac, used as loading control. **D)** Graph represents the mean densitometric values of HA-AKT detected in total cell lysates at 0 and 12 h time points of ADC treatment in the presence or absence of Myc-BAG5, determined in three independent experiments. Means ± SEM, *, p< 0.0.5. **E)** BAG5 knockdown attenuates the degradation of AKT under ADC treatment. HeLa cells were transfected with HA-AKT and shRNA-BAG5 during 60 hours, followed by ADC treatment during 12 hours, as indicated. AKT, BAG5, ERK and Rac protein levels were analysed by western blot with the indicated antibodies, Rac and ERK served as a loading controls. Graphs represent the densitometric analysis of AKT and BAG5 protein levels of three independent experiments. Mean ± SEM, *, p<0.05. **F)** BAG5 promotes AKT ubiquitination. HeLa cells were transfected with HA-Ubiquitin and Myc-BAG5. Thirty six hours after transfection, cells were serum-starved overnight then left untreated or treated with 20μM of MG132 during 6 hours. AKT was immunoprecipitated from total cell lysates and the presence of ubiquitinated AKT was detected as a high molecular smear in the immunoblots using an anti-HA antibodies.

**Figure 3. Hsp70 mediates AKT degradation promoted by BAG5. A)** BAG5 interacts with AKT and Hsp70. HEK-293T cells were transiently transfected with HA-AKT either in the presence or absence of GST-BAG5 alone or with EGFP-Hsp70, as indicated. GST-BAG5 was isolated by pull-down (PD:GST) from total cell lysates (TCL) using glutathione beds. The interaction of HA-AKT and EGFP-Hsp70 proteins with BAG5 was detected in the pull down, whereas their expression was confirmed in total cell lysates (TCL), using anti-HA or anti-EGFP antibodies, respectively. **B)** Hsp70 promotes AKT degradation. HeLa cells transiently transfected with HA-AKT and increasing amounts of EGFP-Hsp70 were analyzed by western blot of total cell lysates for the expression of AKT (anti-HA and anti-AKT), Hsp70 (anti-EGFP) and S6, 48 hours post-transfection. Anti-S6 immunoblot served as a loading control. **C)** Hsp70 overexpression promotes AKT ubiquitination. HeLa cells were transfected with HA-Ubiquitin and EGFP-Hsp70. Thirty six hours after transfection, cells were serum-starved overnight then treated with 20μM of MG132, or vehicle, during 6 hours, as indicated. AKT was immunoprecipitated from total cell lysates and the presence of ubiquitinated AKT was detected as a high molecular smear in the immunoblots using an anti-HA antibodies. The expression of AKT and Hsp70 was confirmed in total cell lysates (TCL) using anti-AKT or EGFP antibodies, respectively, as indicated. Graph at the bottom illustrates the densitometric analysis of ubiquitinated AKT either in the presence or absence of Hsp70. Bars represent Mean ± SEM or three independent experiments, *, p<0.05. **D)** Hsp70 requires BAG5 to promote AKT degradation. HeLa cells were transiently transfected with shRNA-BAG5 for 24 hours, then cells were transfected again with HA-AKT and EGFP-Hsp70 for 48 hours more to achieve 72 hours of shRNA BAG5 effect. AKT, Hsp70, BAG5, ERK and S6 levels were analysed by immunoblot

using antibodies against HA or EGFP for transfected AKT and Hsp70, respectively, or antibodies that recognize endogenous BAG5, AKT, ERK or S6 as indicated. ERK and S6 immunoblots served as loading controls. Graph at the bottom illustrates the densitometric analysis of HA-AKT expression in the presence or absence of Hsp70 and the effect of BAG5 knockdown on the effect of Hsp70. Bars represent Mean ± SEM of three independent experiments, ***, $p<0.01$.

**Figure 4. Parkin promotes AKT ubiquitination and degradation and contributes to the effect of BAG5. A)** Parkin interacts with BAG5 apparently displacing AKT. HEK-293T cells were transiently transfected with HA-AKT and GST-BAG5 including or not Myc-Parkin, as indicated. GST-BAG5 was isolated by pulldown from total cell lysates and the presence of interacting AKT and Parkin was revealed by western blot in the pulldowns using anti-HA or Myc antibodies, respectively (PD: GST, left panel), whereas their expression was confirmed in total cell lysates (TCL, right panel). **B)** Parkin overexpression promotes AKT degradation. HeLa cells were co-transfected with HA-AKT and increasing amounts of Myc-Parkin. AKT protein levels were analysed by western blot with anti-HA antibodies. The expression of Parkin was confirmed by anti-Myc western blot. GSK-3β immunoblot served as a loading control. **C)** Parkin promotes AKT ubiquitination. HeLa cells were transiently transfected either with HA-Ubiquitin, Myc-Parkin or both, as indicated. Cells were serum-starved, then AKT was immunoprecipitated from total cell lysates and ubiquitinated AKT was detected by immunoblot using anti-HA antibodies. Where indicated, 20μM MG132 was included during the last 6 hours of the starvation period. Expression of transfected Parkin and endogenous AKT was confirmed in total cell lysates (TCL, anti-Myc antibody was used to reveal transfected Parkin). Bars represent densitometric values of the ubiquitination levels of AKT, Mean ± SEM of three independent experiments, *, $p<0.05$. **D)** Coexpression of BAG5 and Parkin contribute to reduce AKT expression. HeLa cells were co-transfected with HA-AKT and either low (0.25μg) amounts of Myc-BAG5, Myc-Parkin or both, or high (1μg) amounts of Myc-BAG5 or Myc-Parkin, as indicated. The levels of AKT protein were analysed by immunoblot using anti-HA antibodies. -ERK immunoblot served as a loading control. The expression of BAG5 and Parkin was confirmed by western blot using anti-Myc antibodies, two different exposures of the same blot are shown. Graph at the bottom illustrates the effect on AKT expression of low doses of Bag5 and Parkin acting independently or together, as indicated. Bars represent mean ± SEM values (n=3). *, $p< 0.05$.

**Figure 5. Phosphorylation of BAG5 by AKT correlates with a reduction on the interaction between them. A)** AKT degradation induced by BAG5 preferentially occurs under serum starvation conditions. HeLa cells were co-transfected with HA-AKT and increasing amounts of Myc-BAG5. Thirty six hours post-transfection, cells were incubated with serum-free or serum-supplemented media during additional 12 hours. Expression of AKT, GSK-3β and BAG5 was analyzed by immunoblot in total cell lysates. GSK-3β served as a loading control. **B)** AKT activation attenuates its interaction with BAG5. HeLa cells transfected with HA-AKT, Myc-BAG5 or both were incubated overnight in serum-free media, then stimulated, or not, with HGF during 15 min, as indicated. AKT was immunoprecipitated from total cell lysates using anti-HA antibody (IP:HA) and interacting-BAG5 was detected by anti-Myc western blot. The expression of AKT and BAG5 was confirmed in total cell lysates (TCL) using anti-HA and anti-Myc antibodies, respectively. The effect of HGF on AKT and ERK activation was detected with phospho-specific antibodies. Expression of ERK in total cell lysates served as a loading control.

Graph represents the densitometric analysis of Myc-BAG5 that interacted with AKT according to the results of three independent experiments. Bars represent mean ± S.E.M. *, $p<0.05$. AU, stands for arbitrary units. **C)** AKT phosphorylates BAG5. Cells were transfected with Myc-BAG5 and one of the following AKT constructs: HA-AKT (wild type), myr-AKT (N-myristoylated-AKT, constitutively active) or kinase-negative mutant AKT (AKT-K179M). Twenty four hours post-transfection, cells that were starved of serum overnight were metabolically labeled with $^{32}P$ orthophosphate. BAG5 was isolated by immunoprecipitation with anti-Myc antibodies and its phosphorylation was detected by autoradiography. Graph represents the densitometric analysis of BAG5 phosphorylation levels determined in three independent experiments. Bars represent mean ± S.E.M. *, $p<0.05$. **,$p<0.01$. AU, stands for arbitrary units.

**Figure 6. BAG5 modulates AKT activation and HGF-dependent cell migration. A)** BAG5 expression reciprocally correlates with AKT activation in conditions in which AKT stability is not affected. HeLa cells transiently transfected with increasing amounts of shRNA-BAG5 or Myc-BAG5 were used to detect AKT activation by western blot in total cell lysates with a phospho-AKT (Ser473) specific antibody. The expression of total AKT as well as endogenous and transfected Myc-BAG5 was confirmed in the same samples, as indicated. **B)** BAG5 attenuates the activation of AKT in response to HGF, without affecting the activation of ERK. HeLa cells transfected with control vector and low (0.25μg) or high (1μg) amounts of HA-BAG5 were serum starved and stimulated with increasing amounts of HGF during 15 minutes. Then, activation of AKT and ERK was detected by western blot using phospho-specific antibodies, whereas their expression was confirmed using antibodies that detect endogenous proteins. The expression of transfected BAG5 was confirmed using anti-HA antibodies. **C)** BAG5 diminishes HGF-dependent wound healing cell migration. HeLa cells transiently transfected with EGFP or EGFP-tagged-BAG5 or were subjected to wound-healing assays and migration of fluorescent cells into the wounded area was analyzed by fluorescence microscopy at 24 hours after incubation with HGF or 10% fetal bovine serum (FBS). Dashed lines show the edges of the wound at the beginning of the experiment. Graph at the bottom represents the number of fluorescent cell that migrated into the wounded area and includes the results of three independent experiments. Mean ± S.E.M values. *, $p<0.05$. **D)** BAG5 diminishes HGF-dependent chemotactic cell migration. HeLa cells transfected with BAG5 or control plasmid were subjected to chemotaxis assays in Boyden chambers in which they were stimulated with HGF or 10% FBS, as indicated. Graph represents the analysis of relative cell migration determined in three independent experiments. Mean ± S.E.M values. *, $p<0.05$. A representative result is shown at the bottom of the graph. **E)** Model depicting the proposed mechanism of AKT regulation by BAG5. Under starved conditions and BAG5 overexpression, AKT interacts with BAG5 which promotes AKT inhibition and, with the participation of Hsp70 and Parkin, leads to its degradation. When AKT signaling pathway is stimulated, the interaction between AKT and Bag5 decreases, coincident with AKT-dependent Bag5 phosphorylation.

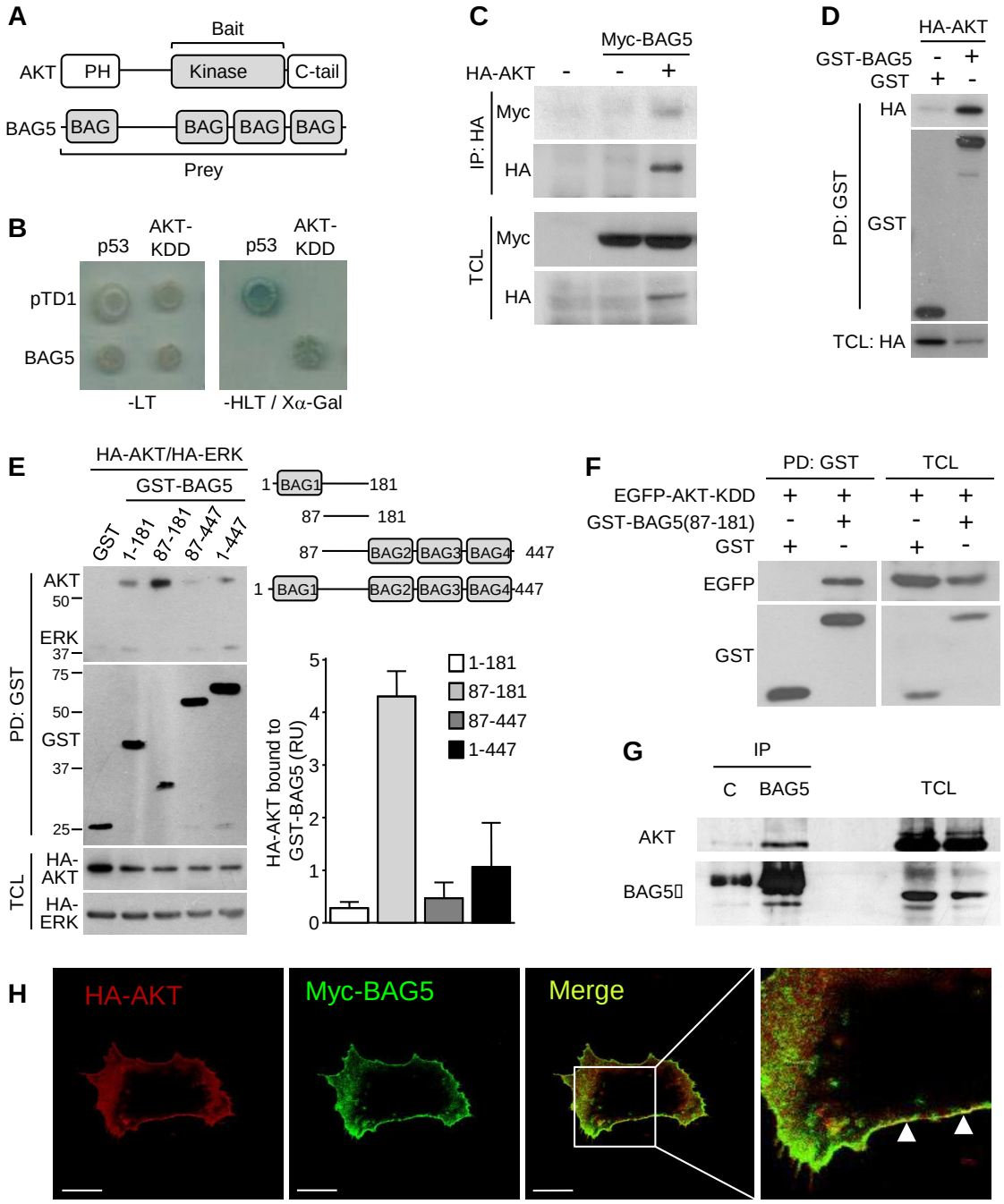



Figure 1. BAG5 interacts with AKT.

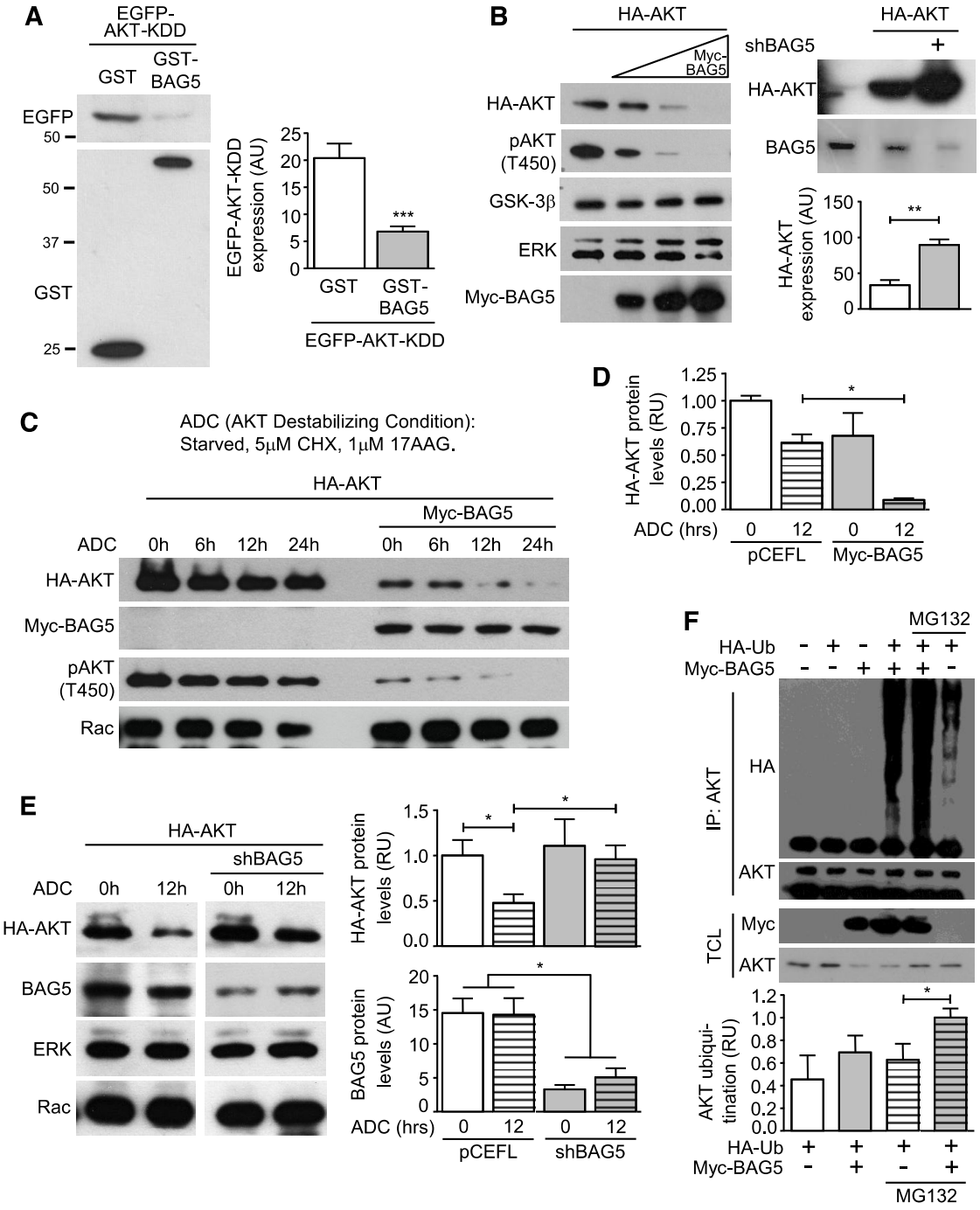



Figure 2. BAG5 promotes AKT ubiquitination and degradation.

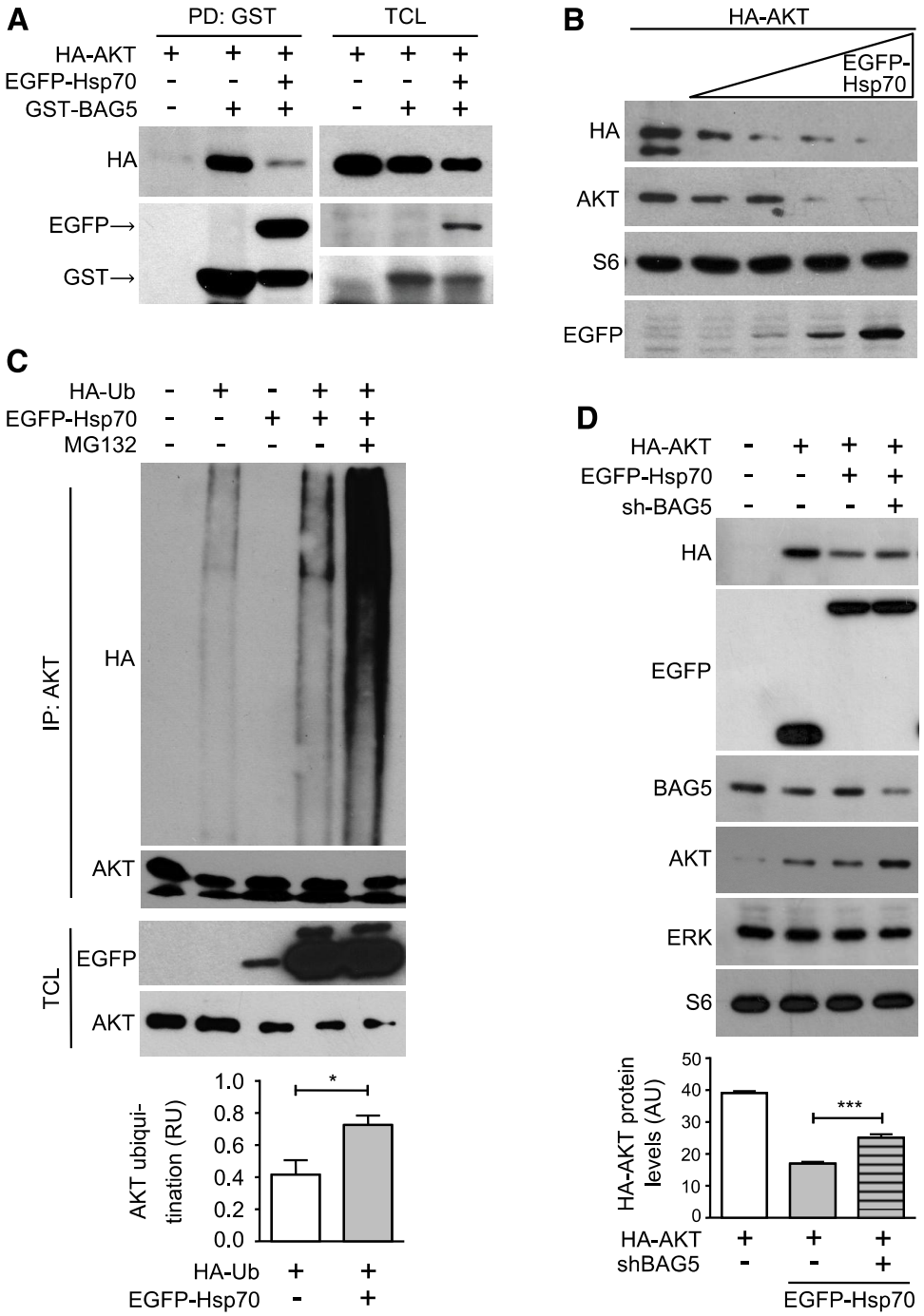



Figure 3. HSP70 mediates AKT degradation promoted by BAG5.

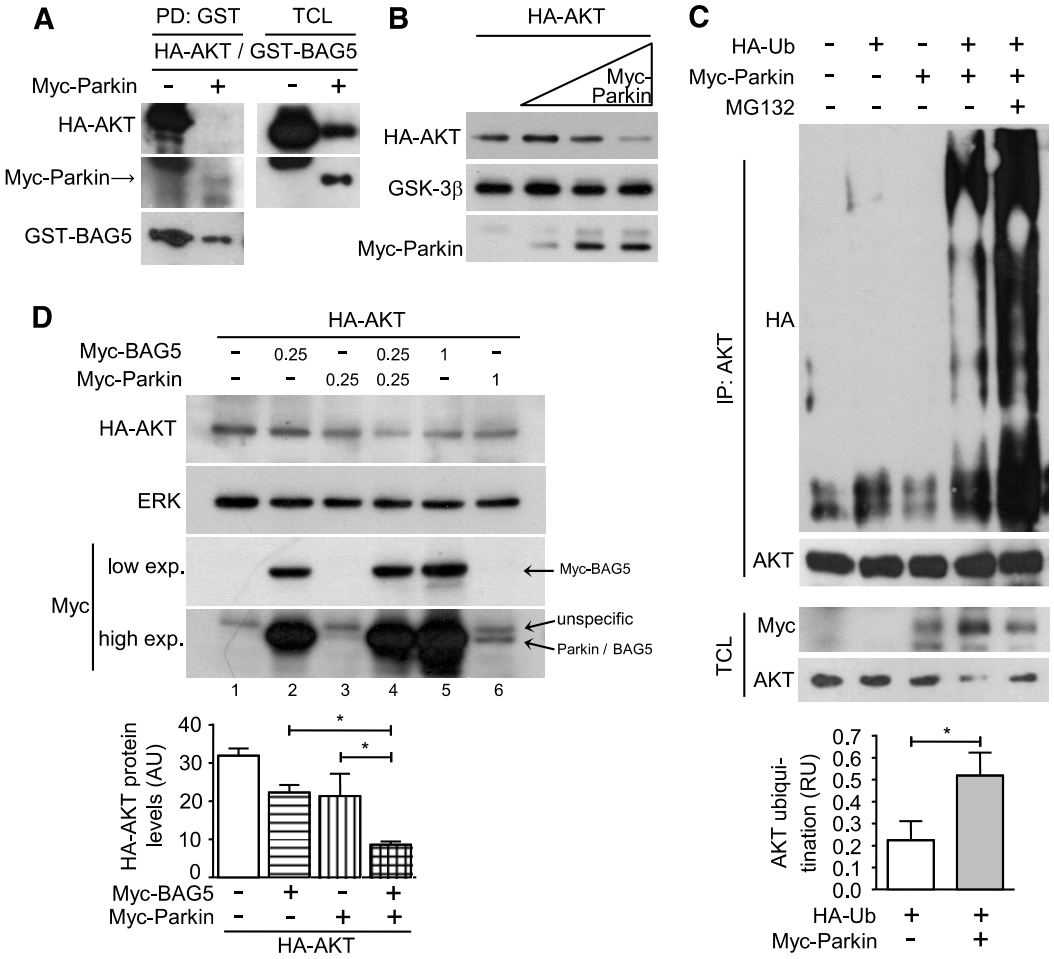



Figure 4. Parkin promotes AKT ubiquitination and degradation and contributes to the effect of BAG5.

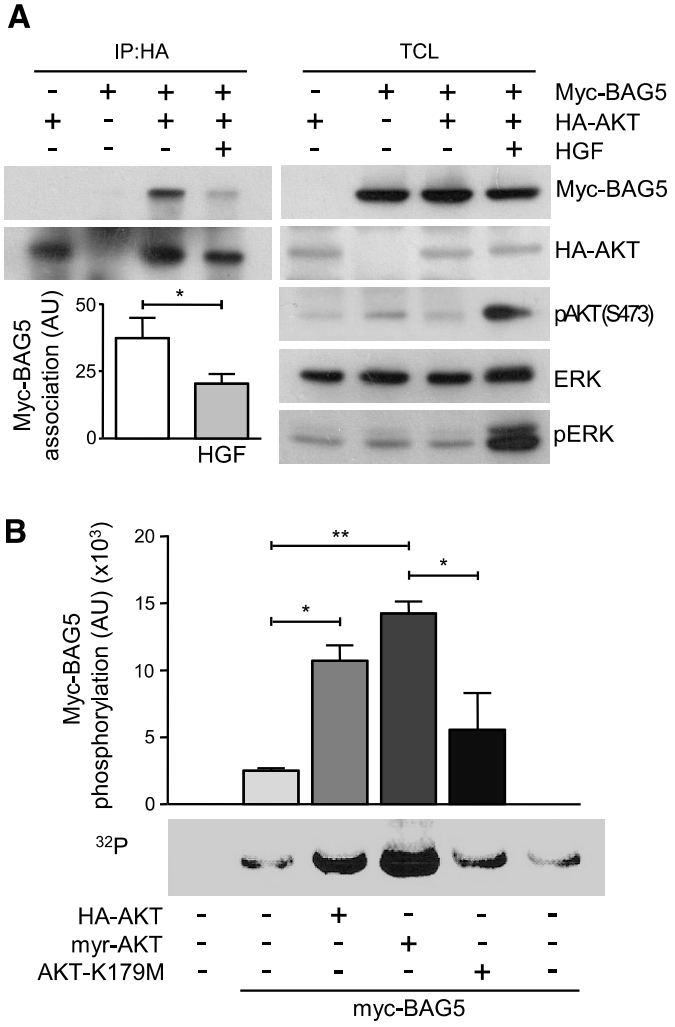



Figure 5. Phosphorylation of BAG5 by AKT correlates with a reduction on the interaction between them.

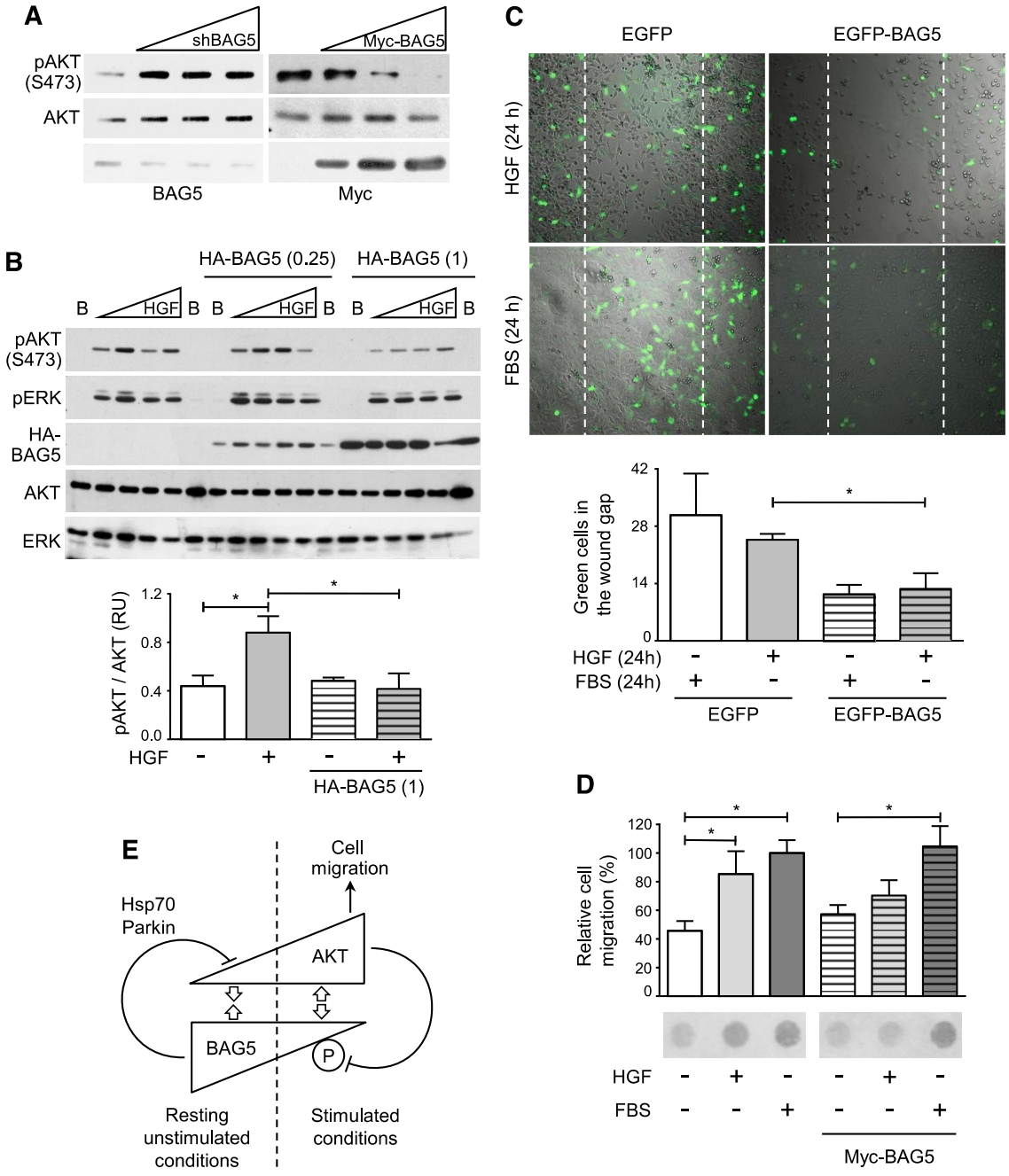



Figure 6. BAG5 modulates AKT phosphorylation and HGF-dependent cell migration.

C. Artículo de revisión: mTORC1- and mTORC2-interacting proteins Keep their multifunctional partners focused.

IUBMB *Life*, 63(10): 896–914, October 2011

## *Critical Review*

# mTORC1- and mTORC2-interacting Proteins Keep Their Multifunctional Partners Focused

**Ismael Bracho-Valdés, Paola Moreno-Alvarez, Israel Valencia-Martínez, Evelyn Robles-Molina, Lydia Chávez-Vargas and José Vázquez-Prado**
*Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508.Col. San Pedro Zacatenco, 07000 México D.F., México*

*Summary*

**The mammalian target of rapamycin, best known as mTOR, is a phylogenetically conserved serine/threonine kinase that controls life-defining cellular processes such as growth, metabolism, survival, and migration under the influence of multiple interacting proteins. Historically, the cellular activities blocked by rapamycin in mammalian cells were considered the only events controlled by mTOR. However, this paradigm changed with the discovery of two signaling complexes differentially sensitive to rapamycin, whose catalytic component is mTOR. The one sensitive to rapamycin, known as mTORC1, promotes protein synthesis in response to growth factors and nutrients via the phosphorylation of p70S6K and 4EBP1; while the other, known as mTORC2, promotes cell migration and survival via the activation of Rho GTPases and the phosphorylation of AKT, respectively. Although mTORC2 kinase activity is not inhibited by rapamycin, hours of incubation with this antibiotic can impede the assembly of this signaling complex. The direct mechanism by which mTORC2 leads to cell migration depends on its interaction with P-Rex1, a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor, while additional indirect pathways involve the intervention of PKC or AKT, multifunctional ubiquitous serine/threonine kinases that activate effectors of cell migration upon being phosphorylated by mTORC2 in response to chemotactic signals. These mTORC2 effectors are altered in metastatic cancer. Numerous clinical trials are testing mTOR inhibitors as potential antineoplasic drugs. Here, we briefly review the actions of mTOR with emphasis on the controlling role of mTORC1 and mTORC2-interacting proteins and highlight the mechanisms linked to cell migration.** © 2011 IUBMB
**IUBMB *Life*, 63(10): 896–914, 2011**

**Keywords** mTOR; mTORC1; mTORC2; P-Rex1; Rac; AKT; rapamycin; Rictor; Raptor.

Received 21 June 2011; accepted 14 July 2011
Address correspondence to: José Vázquez-Prado; Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, Apartado postal 14-740, 07000 México D. F., Mexico. Tel: +52-55 5747-3380. Fax: +52-55 5747-3394. E-mail: jvazquez@cinvestav.mx

ISSN 1521-6543 print/ISSN 1521-6551 online
DOI: 10.1002/iub.558

**Abbreviations** mTOR, mammalian target of rapamycin; TOR, target of rapamycin; RBD, Ras binding domain; GEF, guanine nucleotide exchange factor; eIF3, eukaryotic initiation factor 3; PAK, p21-activated kinase.

## INTRODUCTION

The serine–threonine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) plays an essential role in cell metabolism, growth, proliferation, differentiation, and survival. This 289 kDa protein, constituted by 2549 amino acids, bears a complex architecture characterized by the presence of multiple HEAT repeats at the amino-terminal half and a serine–threonine kinase domain at the carboxyl-terminus, flanked by regulatory FAT and FATC regions, also present in other homologous kinases (Fig. 1) (*1–4*). This structure provides the binding sites for multiple proteins that transiently or constitutively interact with this kinase, regulating its activity, subcellular localization, and defining the existence of at least two independent multiprotein complexes (mTORC1 and mTORC2) (Fig. 1), with different regulatory properties and cellular activities, whose assembly is also regulated by mTOR-interacting proteins. Besides being the core of signaling pathways activated in response to nutrients and growth factors, mTOR is a sensor of energy balance and oxidative status (*1, 5–8*). Recently, mTOR has been recognized as a regulator of the cytoskeleton, via an emerging signaling pathway linked to the activation of Rho GTPases, revealed as one of the rapamycin-resistant mTOR-dependent effects, resulting from the actions of mTORC2 (*9, 10*). This novel effector system leads to the activation of Rac, a small GTPase of the Rho family, characterized by its ability to promote cell protrusions, called lamellipodia, filled with newly polymerized F-actin, via direct interactions of mTORC2 with the Rac-specific guanine nucleotide exchange factor P-Rex1 (*11*), and via AKT-dependent or PKCα-dependent pathways activated by these kinases upon being phosphorylated

by mTORC2 (*12, 13*). These mTORC2 effectors are altered in different examples of metastatic cancer. Current investigations are searching for mTOR inhibitors as potential antitumoral drugs.

Given the critical role of mTOR in various physiological processes including cell migration, growth, metabolic homeostasis, and immune response, it is expected that mTOR inhibitors, currently being developed and tested for clinical use in pathological conditions characterized by abnormal function of this pathway, will have broad clinical impact (*14, 15*). Proof of the clinical benefit of rapamycin analogues is their immunosuppressive efficacy in organ transplanted patients. Upon its binding to FKBP12, its intracellular receptor, rapamycin selectively inhibits mTORC1 due to an allosteric effect resulting from interaction of this complex with a region, known as FRB, adjacent to the kinase domain of mTOR (Fig. 1) (*16, 17*). Point mutations in the FRB region prevent binding of FKBP12–rapamycin complex to mTOR, thereby conferring rapamycin resistance (*18–20*). Recent efforts have been focused on the synthesis of new mTOR inhibitors targeting the kinase domain with the goal of inhibiting both mTOR complexes. An interesting example is BEZ235, an inhibitor of both mTORC1 and mTORC2, and also of PI3K, already in clinical trials with cancer patients (*21*). Expectations for new therapies based on the inhibition of mTOR have been raised for cancer, chronic inflammatory diseases, and pathological conditions linked to the progression of diabetes, among others. Actually, using "mTOR inhibitor" as a keyword in a search query at the clinicaltrials.gov web page resulted in a list of 1,134 studies, most of them dealing with cancer patients. Two hundred ninety four of them correspond to clinical trials with patients having different types of metastatic cancer. Initial promising studies have encouraged further investigations aiming to understand the molecular intricacies connecting mTOR with cell migration, with the expectation of identifying novel molecular targets associated to this pathway and small molecules able to inhibit them, and that eventually would evolve into new antimetastatic treatments.

## RAPAMYCIN AND THE TARGET OF RAPAMYCIN

The Easter Sunday of 1722, the Dutch navigator Jacob Roggeveen arrived to Rapa Nui (the Polynesian name of the land that he baptized as Easter Island) (*22*). Two hundred and fifty years later, in the 1970s, the antibiotic rapamycin was isolated

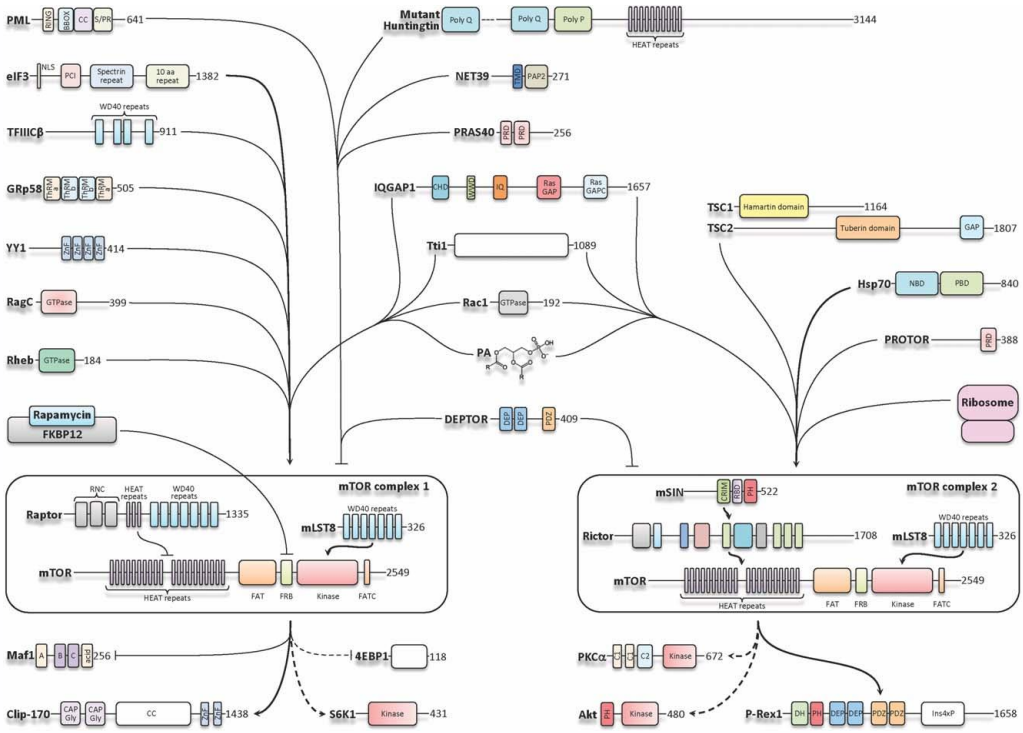



**Figure 1.**

from a strain of *Streptomyces hygroscopicus* obtained from a soil sample of Easter Island (*23, 24*). Rapamycin (Rapamune, RAPA, sirolimus, $C_{51}H_{79}NO_{13}$), a lipophilic macrolide, initially identified as a potent antifungal agent, was later revealed as a very effective immunosuppressor (*25–27*). Twenty years ago, genetic studies with rapamycin-resistant mutant yeast led to the identification of the target of rapamycin (TOR). Two homologous TOR genes exist in yeast and at least one of them in all the genome-sequenced eukaryotic organisms. TOR1, which is sensitive to rapamycin, promotes protein synthesis, cell growth, and cell cycle progression, whereas TOR2 corresponds to a rapamycin-resistant version that controls cell polarity via the action of Rho GTPases (*28*). Interestingly, *Tor1* deficiency can be replaced by *Tor2*, but *Tor1* is unable to substitute *Tor2* functions (*29*) . In *Sacharomyces cerevisiae*, TORC2 is organized in Tor2 kinase in concert with Avo1, Avo2, Avo3, Bit61, and Lst8 (*30*), this complex controls the distribution of actin cytoskeleton during cell division or budding (*30–32*). TOR-dependent fundamental events have been studied in diverse experimental models. Everywhere, TOR controls protein translation, cell growth,

**Figure 1.** mTOR complexes and their functional interacting partners. The serine/threonine kinase mTOR constitutes the catalytic subunit of two evolutionarily conserved complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). Raptor, the defining component of mTORC1, helps the complex to recognize its substrates. Rictor and mSIN1 are defining components of mTORC2. mSIN1 joins the complex through Rictor. It contains a Ras binding domain (RBD) and a Pleckstrin homology domain (PH), most probably involved in the regulation of mTORC2 by Ras and phospholipids. Both complexes include mLST8, a protein similar to the G$\beta$ subunit of heterotrimeric G proteins. Since many proteins have been identified as interacting partners of mTOR complexes, here we illustrate just those whose functional interactions among endogenous proteins have been reported. They are grouped according to their ability to promote (↓) or inhibit (⊥) mTOR complexes (top) and those that function as downstream effectors of mTOR complexes (bottom). As essential components of mTORC1 and mTORC2, we considered only those proteins that are phylogenetically conserved and constitute equivalent complexes in yeast and other model organisms.

Proteins that exhibit a positive role on mTOR activity include Rheb, a small GTPase that interacts with the kinase domain of mTOR activating it (*78*). Rag GTPases that promote the association of mTORC1 onto the surface of late endosomes and lysosomes in response to amino acids (*100, 101*). The transcription factor Yin-Yang-1 (YY1), which together with PGC1$\alpha$ (PPAR$\gamma$ coactivator 1$\alpha$) promotes the expression of mitochondrial genes necessary for the maintenance of the mitochondrial oxidative function in skeletal muscle cells (*129*). GRp58/ERp57 that regulates the assembly of mTORC1 and its response to oxidizing conditions (*8*). TFIIIC, a DNA-binding factor that recruits mTOR to the nucleus where it activates the transcription of RNA polymerase III-dependent 5S rRNA and tRNA genes by phosphorylation of MAF1, a polymerase III repressor (*193*); and eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) which, as a scaffold, promotes activation of S6K, positively modulating cap-dependent translation (*194*). On the contrary, other proteins have an inhibitory effect on mTORC1, these include PRAS40 (*54, 55, 82, 83*), the tumor suppressor PML (*115*), NET39 (Nuclear Envelope Transmembrane protein 39) (*195*), mutant huntingtin (*196*), and DEPTOR, which is an inhibitor of both complexes (*60*). Rapamycin in complex with FKBP12 inhibits mTORC1 by interaction with mTOR–FRB region.

The activation of mTORC2 has been associated with Protor and Hsp70. Protor plays an important role for the activation SGK1 in the kidney (*197–199*). Hsp70 was identified as a Rictor interacting protein that regulates the assembly of mTORC2 and its kinase activity (*141*). The TSC1/TSC2 complex (which is an upstream activator of mTORC1) has been directly associated to the activation of mTORC2 (*139*). Association of mTORC2 with ribosomes is stimulated by insulin and has been considered part of the activation of mTORC2 (*142*). Although the association of MTORC2 with ribosomes occurs in absence of active protein synthesis (*142*), this complex phosphorylates nascent AKT in the turn motif, stabilizing it (*200*).

Some proteins interact with both mTOR complexes and activate them. IQGAP1 [Isoleucin-Glutamine (IQ) and GTP-activating protein] acts as a scaffold that promotes cell growth and proliferation presumably via a direct interaction with mTORC1 (*201*), and also facilitates the activation of AKT (*202*). Tti1 (Tel two interacting protein 1) constitutively interacts with mTOR and positively regulates the activity, assembly and stability of both complexes (*203*). Interestingly, the Rho GTPase Rac1 is required for the activation of both complexes in response to growth factors present in serum and facilities the localization of mTOR complexes at the plasma membrane, suggesting that this association is directly related to the activation of both mTOR complexes (*187*). As a second messenger produced by PLD, phosphatidic acid has been identified as an activator of mTORC1 and mTORC2 presumably by facilitating the assembly or stabilizing both mTOR complexes (*96, 204*).

Other proteins that interact with mTOR complexes act as downstream effectors. P-Rex1, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, promotes cell migration in response to mTOR activation (*11*). Clip-170 (cytoplasmic linker protein of 170 kDa) is phosphorylated by mTOR increasing its affinity for the growing side of microtubules (*205*). In neurons, this interaction favors the bridging between microtubules and the actin cytoskeleton by association of Clip-170 with IQGAP1, regulating dendritic morphology (*206*). As mentioned, by phosphorylation of Maf1 (an inhibitor of RNA polymerase III), mTOR regulates the expression of ribosomal components and tRNA (*193, 207, 208*). Also shown in dotted line are classical effectors of both mTOR complexes.

proliferation, apoptosis, and actin dynamics. TOR genes, already sequenced in algae, slime molds, plants, worms, flies, and various mammals, share about 40 to 60% identity at primary sequence (*33–35*). In mammals, although the name mTOR has prevailed, other names initially given to this protein are FRAP (FKBP12-rapamycin associated protein) and RAFT (rapamycin and FKBP12 target) (*3, 16, 35–37*). TOR in other organisms is identified by preceding the name by a letter referring to the specific group; for instance, *Drosophila* TOR is known as dTOR, *Caenorhabditis elegans* TOR as CeTOR and zebrafish Tor as zTOR, whereas, as mentioned, mammalian TOR is known as mTOR. The presence of TOR along the eukaryotic evolution highlights its vital importance. In fact, mice embryos die when their genes coding for mTOR or other basic components of mTOR complexes are knocked out (*38–43*).

## MTOR, THE CATALYTIC CORE OF TWO COMPLEXES: MTORC1 AND MTORC2

mTOR belongs to a group of atypical high molecular weight protein kinases related to phosphoinositide-3-kinase, referred as the PIKK family of kinases (*44–47*). Proteomic analysis of immunoprecipitated mTOR revealed the existence of two independent multiprotein complexes (mTORC1 and mTORC2) in which mTOR, the unique protein product of a single gene, is the catalytic core (Fig. 1) (*9, 10, 48, 49*). Surprisingly, one of these complexes (mTORC2) is not inhibited by rapamycin. They represent the functional equivalents of two yeast TOR proteins encoded by independent genes, one of them also known to be resistant to the inhibitory action of rapamycin (*30, 50*). The discovery of mTORC2 raised new expectations regarding its potential participation in multiple cellular processes, previously believed to be independent of mTOR due to their progression in the presence of rapamycin. Different cellular functions have been attributed to mTORC1 and mTORC2 and explained by their differential substrate specificity and their interaction with different partners. Thus, the classical rapamycin-sensitive events are now attributed to mTORC1, whereas novel mTORC2-dependent events are being discovered by their sensitivity to new mTOR inhibitors targeting the kinase domain of both complexes, but resistance to rapamycin and their requirement on the expression of mTOR and Rictor, an mTORC2-specific component whose expression determines the existence of mTORC2 complex, explaining why the function of this complex is commonly assessed by knockdown of Rictor. The multiple functions of mTOR are properly controlled in time and space by mTOR-interacting partners, which can be constitutive elements of the complexes or dynamic regulatory partners (Fig. 1).

The identity of mTORC1 and mTORC2 is defined by whether Raptor or Rictor, respectively, are part of the complex (Fig. 1). The respective homologues in yeast are KOG1 and AVO3 (see below) (*29*). Raptor is a 150 kD protein with three HEAT repeats at the amino terminus and seven WD40 repeats at the carboxyl-terminus that recruits mTORC1 substrates. This protein dissociates from the complex in response to aminoacids and other stimuli (*1, 48, 51*). The interaction of Raptor with mTORC1 is inhibited by rapamycin, which inhibits the intervention of Raptor in the presentation of substrates to the complex. Rictor, on the other hand, a 192 kDa protein with no identifiable domains, forms a rapamycin-insensitive complex with mTOR (*9, 10*). Pianissimo, the Rictor homologue in *Dictyostelium*, participates in the chemotactic response elicited by gradient of extracellular cAMP recognized by cAR1, a G protein-coupled receptor (*52*).

Many other proteins have been identified as partners of mTOR (Fig. 1). mLST8/G$\beta$L is a 38 kD protein that interacts with the kinase domain of mTOR and it has been considered a constitutive element of both complexes (*53*). Nevertheless, it seems to be particularly relevant as a component of mTORC2, as demonstrated by a knockout approach that evidenced the critical role of mLST8 as an essential element in the assembly of mTORC2. Although the precise mechanism of assembly of this complex is unknown, the absence of detectable Rictor/mTOR complexes in mLST8 knockout cells suggests that mLST8 stabilizes the interaction between Rictor and mTOR (*40*).

From a functional perspective, proteins with affinity for mTORC1 or mTORC2 can be distinguished as those that receive the input of diverse signaling cascades elicited by growth factors, chemoattractants, nutrients, oxidants, and changes in energy levels, and those considered mTOR effectors that link this kinase to specific cellular responses (Figs. 1 and 2). Some proteins interact constitutively with mTOR complexes, while others are transient partners regulated by phosphorylation, availability of nutrients, energy levels or oxidant status of the cell. PRAS40 is an inhibitor of mTORC1 (Figs. 1 and 2). PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kD) binds Raptor and negatively regulates mTORC1 activity. Once phosphorylated by AKT, PRAS40 is released from the complex and mTORC1 activity is increased (Fig. 2) (*54, 55*). mTORC2 contains mSIN as an additional specific partner (*5, 56*). mSIN1 is considered a functional equivalent of AVO1, which in *Sacharomyces cerevisiae* is involved in the polarization of the actin cytoskeleton, and RIP3, a *Dictyostelium discoideum* TORC2 component critically involved in chemotaxis downstream of Ras (see below) (*52*). mSIN1 contains an RBD (Ras binding domain) and a PH domain (pleckstrin homology domain) important for the localization of this protein at the plasma membrane (*57*). mSIN1 is critical for the function of mTORC2 related to the phosphorylation of AKT at Ser-473 (*42*). In addition, mSin1 has been proposed as a determinant in the dynamic localization of mTORC2, explained by putative lipid interactions established by the PH domain and protein interactions dependent on the RBD (*42, 43*). Three of the existing isoforms of mSIN interact with mTOR, providing a source of diversity for mTORC2s (*43*). An additional interactor of mTORC2 is Protor, also known as PRR5 (proline-rich protein5), which interacts with Rictor (*58*). Intriguingly, Protor1 and -2 knockout mice show no defects on the phosphorylation of AKT or PKC$\alpha$ at their hydro-

phobic or turn motifs, but are unable to properly phosphorylate SGK1, at least in the kidney (*59*).

Two mTOR–interacting proteins, P-Rex1 and DEPTOR, contain DEP domains (Fig. 1) (*11, 60*). P-Rex1 is a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor (RacGEF) that exerts an effector role downstream of mTOR, which directly stimulates this GEF by interacting with its DEP domains, leading to the activation of Rac and cell migration (*11*). P-Rex1 architecture includes a DH-PH module characteristic of the family of Rho-GEFs with homology to *dbl*, followed by two DEP and two PDZ domains in tandem and a long carboxyl terminus (*61*). A second member of the P-Rex1 family, known as P-Rex2 (with two splicing variants) (*62*), also interacts with mTOR (*11*). The most recent DEP-domain containing protein identified as an mTOR interactor is DEPTOR, a 48 kD protein with two tandem DEP domains at the amino terminus and a PDZ domain at the carboxyl-terminus (Fig. 1). DEPTOR inhibits mTOR by interacting with the mTOR-FAT domain (Fig. 1) (*60*). The precise role of each protein known to interact with mTOR has not been fully revealed; as mentioned, their proposed actions include the identification of substrates, as links to target mTOR complexes to specific subcellular locations, or helping to the assembly of each mTOR complex.

The list of proteins that interact with mTOR or its partners is growing (Fig. 1), their characterization is helping to clarify why so many stimuli lead to the activation of mTOR, where and when mTORC1 and mTORC2 are regulated, and their potential implications in health and disease. GRp58 (also known as ERp57) regulates the assembly of mTORC1. It interacts with the kinase domain of mTOR and modulates its activity in response to oxidizing conditions (*63*).

Although mTORC2 is not sensitive to rapamycin, presumably due to a physical interference of mTORC2 subunits with the mTOR–FRB region, chronic treatment with rapamycin decreases the levels of mTORC2 by interfering with the assembly of this complex (*64*). A short splicing variant of mTOR of approximately 80 kDa has been described, this isoform lacks the HEAT repeats and the FAT domain, but interacts with Raptor and Rictor forming functional mTORC1 and mTORC2 complexes (*65*).

Given the structural complexity of mTOR and its partners displaying multiple potential protein interacting surfaces, along with the increasing number of identified mTORC1 or mTORC2 interactors and their proven or potential regulatory role on mTOR signaling, it seems arbitrary to decide whether each new identified protein that interacts with mTOR, Raptor or Rictor, should be considered or not part of the respective mTOR complex or just, depending on its functional characterization, an upstream regulator, downstream effector or transient interactor. We believe that a good principle to consider, to make that decision, is to reserve the adjective for phylogenetically conserved proteins that have equivalent TOR partners in yeast or other model organisms. Thus, we had this criteria in mind to choose the proteins included on each mTOR complex presented in Fig. 1.

## MTORC1: A CRITICAL TRANSDUCER OF RECEPTOR-DEPENDENT AND INTRACELLULAR SIGNALS THAT CONTROL CELL GROWTH AND METABOLISM

### *Receptor-Dependent Activation of mTORC1*

Multiple agonists regulate metabolism, growth, proliferation, and survival, acting on cell surface plasma membrane receptors, such as receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors, that stimulate mTOR through the activation of the PI3K-AKT and the Ras-ERK-RSK signaling pathways (Fig. 2) (*5, 66–68*). Two agonist-dependent mechanisms of activation of mTORC1 have in common the intervention of phosphorylation events by AKT that suppresses inhibitory controls (Fig. 2). The initial and best characterized mechanism involves the phosphorylation of TSC2 (tuberous sclerosis 2, also known as tuberin) (*69*) which, in complex with TSC1, keeps inhibited the small GTPase Rheb, an upstream activator of mTORC1 (or dTOR in *Drosophila*) (*70–77*). Rheb is a member of the Ras superfamily of GTP-binding proteins that directly binds to the amino terminal small lobe of mTOR catalytic domain (*78, 79*). Once TSC2 is phosphorylated by AKT, its GAP activity toward Rheb is reduced, letting this small G protein, loaded with GTP, ready to activate mTORC1 (*69, 80, 81*). The second mechanism by which AKT activates mTORC1 depends on the removal of PRAS40 from mTORC1 upon being phosphorylated by AKT (Fig. 2) (*54, 55, 82–84*).

Other inhibitory phosphorylations of TSC2 that result on the activation of mTORC1 depend on Erk1/2 (Extracellular-signal-Regulated Kinase 1/2) (*85, 86*) and RSK1 (p90 Ribosomal S6 Kinase 1) (*85, 87*). Additionally, RSK promotes mTORC1 kinase activity by phosphorylating Raptor (Fig. 2) (*88*).

Alternative pathways can signal to mTORC1. For example, Wnt activates mTORC1 by inhibiting glycogen synthase kinase 3$\beta$ (GSK3$\beta$). This is consistent with the observation that GSK3$\beta$ phosphorylates TSC2 stimulating its GAP activity on Rheb and the subsequent inhibition of mTORC1 (Fig. 2) (*89, 90*). In a mouse model of familial adenomatous polyposis, the Wnt pathway promotes the formation and growth of intestinal polyps via mTOR. Suggesting that mTOR inhibitors may be useful in the prevention and treatment of colonic adenomas with Wnt signaling activation (*91*). Other example, linked to cancer progression, is the activation of mTORC1 by TNF$\alpha$, a powerful proinflammatory cytokine that inhibits the TSC1–TSC2 complex via the phosphorylation of TSC1 by IKK$\beta$ (Fig. 2). This pathway promotes inflammation-related tumor-induced angiogenesis, contributing to cancer progression (*92*). Interestingly, antibodies detecting the IKK$\beta$-dependent phosphorylation site on TSC1 gave positive signals in tumor samples of breast cancer patients and the positive results correlated with poor patient outcome (*92*). Additionally, IKK$\alpha$ associates with mTORC1 in an AKT-dependent manner, resulting in the activation of mTORC1 (*93*).

Receptor-mediated events that lead to mTORC1 activation usually depend on PI3K, a lipid kinase that phosphorylates

phosphatydilinositol,4,5-biphosphate to generate phosphatidylinositol,3,4,5-triphosphate (PIP3), a second messenger that marks the membrane at the sites where PI3K-depending signaling is taking place, recruiting proteins with affinity for PIP3 at the right moment and place (*94*). This second messenger recruits PDK1 and Akt to the plasma membrane and promotes the initial, PDK1-dependent, phosphorylation of AKT at Thr-308 that enables this kinase to phosphorylate some of its targets, including TSC2 (*40*). Phosphatidic acid is another activator of mTORC1 that presumably acts by facilitating the assembly or stabilization of mTOR complexes (*95, 96*). Full activation of AKT occurs after this kinase is phosphorylated at Ser-473 by mTORC2 (Fig. 2) (*41–43*). Thus, AKT is an upstream activator of mTORC1 and a downstream effector of mTORC2 (Fig. 2). Other cross-regulatory mechanisms of communication between mTORC1 and mTORC2 signaling have been documented, highlighting the biological importance of keeping these complexes tightly regulated in any given cell (see below).

### *mTORC1 As a Sensor of Nutritional Status*

Whereas AKT-dependent phosphorylation of TSC2 and PRAS40 participate in the activation of mTORC1 in response to growth factors; this complex responds to amino acids without the participation of TSC1/2, but still requiring Rheb. Leucine appears to be most effective amino acid stimulant of mTORC1 signaling (*97, 98*). Recent data implicate Rag proteins, a family of four related small GTPases, as a link between amino acids and mTORC1 activation. RagGTPases switch to an active conformation, which binds Raptor, in the presence of amino acids. This promotes recruitment of mTORC1 onto the surface of late endosomes and lysosomes at the perinuclear zone, region where it meets the so-called Ragulator complex, necessary for the activation of mTORC1 at this subcellular location (*99*), that contains its activator Rheb (Figs. 2 and 3) (*100, 101*). Amino acids modulate GTP loading of Rheb (*102*), while nutritional starvation promotes dissociation of Rheb from mTORC1 (*79*). Another mechanism by which amino acids activate mTORC1 depends on hVps34 (the class 3 PI3K) (Fig. 2) (*103*).

### *mTORC1 As a Sensor of Energy, Stress and Redox Conditions*

A reduction on the intracellular levels of energy have a negative impact on the activity of mTORC1. The serine/threonine kinase AMPK responds to AMP, which increases when ATP decreases, and reduces the intracellular demand of ATP linked to mTORC1-dependent functions, such as protein synthesis, by phosphorylating TSC2 and Raptor under energy limiting conditions (Fig. 2). TSC2 phosphorylated by AMPK shows increased GAP activity towards Rheb, keeping this small GTPase unable to activate mTORC1 (*90*), whereas Raptor phosphorylated by

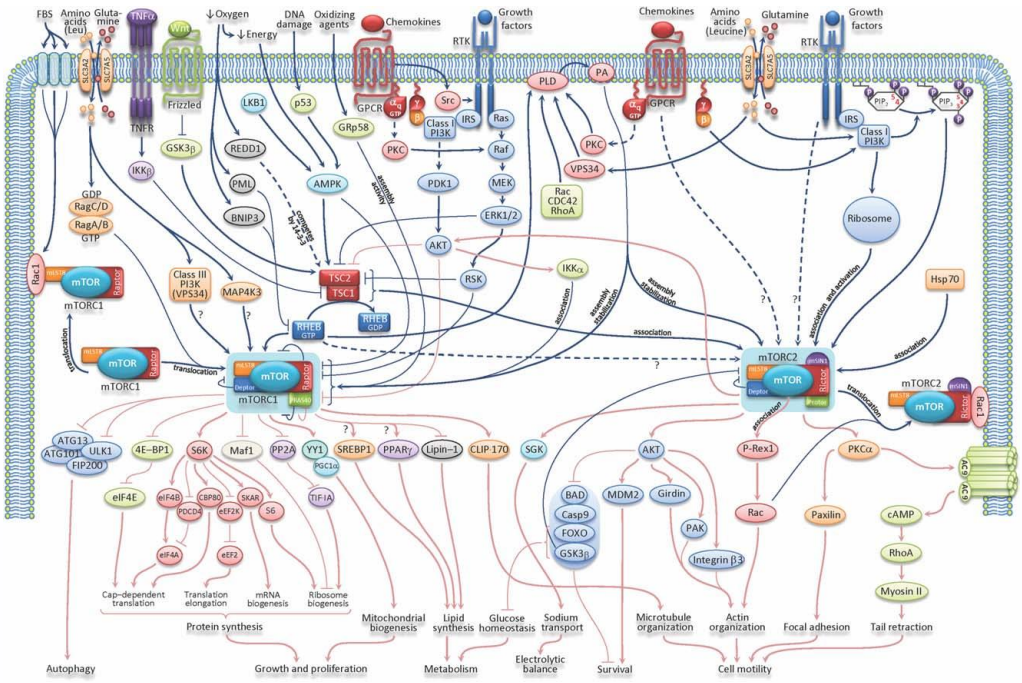



**Figure 2.**

**Figure 2.** mTORC1 and mTORC2 signaling networks. mTORC1 and mTORC2 integrate diverse receptor mediated and intracellular signals and respond by regulating various cellular processes such as metabolism, growth, proliferation survival, and migration. Upstream signals are depicted in dark lines while downstream pathways are depicted in light lines. Arrows (↓) indicate positive regulation and bars (⊥) denote negative regulation. Positive regulators of mTOR complexes include amino acids, phosphatidic acid, oxidizing agents and growth factors.

Activation of mTORC1. In the presence of amino acids, RagGTPases switch to the active conformation promoting the association of mTORC1 with late endosomes and lysosomes at the perinuclear zone, region that contains its activator Rheb (*100, 101*). Activation mTORC2 involves class I PI3K and results in the activation of AKT by phosphorylation at serine 473.

Growth factors recognized by receptor tyrosine kinases, and diverse agonists of G protein-coupled receptors, activate the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by inhibiting TSC2 due to its phosphorylation by AKT (*69, 80, 81*). Alternative mechanism involve the phosphorylation of TSC2 by Erk1/2 (*85, 86*) or RSK1 (*85, 87*). TSC1/TSC2 complex acts as a GAP towards the small GTPase Rheb, which directly activates mTOR when the TSC1/TSC2 complex is inhibited (*70, 78, 79, 209, 210*). AKT also activates mTORC1 via the phosphorylation of PRAS40, releasing this inhibitor from the complex (*54, 55, 82–84*). Additionally, RSK promotes mTORC1 kinase activity by phosphorylating Raptor (*88*). Other pathways that activate mTORC1 include the Wnt pathway by inhibiting GSK3$\beta$, which phosphorylates TSC2 stimulating its GAP activity on Rheb (*89, 90*); TNF$\alpha$, by activating IKK$\beta$ which phosphorylates TSC1, resulting in the inhibition of TSC1-TSC2 complex (*92*). Additionally, IKK$\alpha$ associates with mTORC1 in an AKT-dependent manner, resulting in the activation of mTORC1 (*93*).

Phosphatidic acid activates mTOR presumably by facilitating the assembly of stabilization of both o mTOR complexes (*95, 96*). The Rho GTPase Rac1 induces activation of both mTOR complexes by promoting their association to the plasma membrane (*187*). In response to oxidizing agents, GRp58/ERp57 regulates the assembly and activity of mTORC1 (*8*).

Inhibition of mTORC1. Reduced intracellular levels of energy shut down mTORC1 activity. Low levels of energy are manifested by an increase on the AMP:ATP ratio. AMP activates AMPK leading to the phosphorylation of TSC2, increasing its GAP activity towards Rheb, thus decreasing mTORC1 activity (*90*). Also, AMPK phosphorylates Raptor causing inhibition of mTORC1 (*104*). This mechanism of inhibition is also activated by the tumor suppressor protein LKB1 (*110*). Under hypoxic conditions mTORC1 is inhibited via REED1 (*113, 114*). Consistent with this, the tumor suppressor PML and BNIP3 block mTORC1 by interfering with the interaction between mTOR and Rheb (*115, 116*). Hypoxia also causes reduction in ATP levels and the consequent activation of AMP-AMPK-TSC2 axis. On the other hand, DNA damage can block mTORC1 signaling through AMPK activation mediated by p53 (*112*).

Activation of mTORC2. mTORC2 is activated by growth factors and chemokines. Reported activators include Rac1 (*187*), PIP3 (*211*), direct interaction with TSC1-TSC2 complex (*139*), the heat shock protein of 70 kDa (Hsp70) (*141*) and growth factor-dependent association to ribosomes (*142*), important for the phosphorylation of nascent Akt at the turn motif (*200*).

Effectors of mTORC1. mTORC1 phosphorylates 4E-BP1 and p70S6K, its two major downstream effectors, which regulate the initiation and progression of protein synthesis (*67, 119*). Maf1 an inhibitor of RNA polymerase 3 is inhibited itself by mTORC1, promoting the synthesis of ribosomal components (*193, 207, 208*). mTORC1 also regulates ribosome biogenesis through an inhibitory phosphorylation of protein phosphatase 2A (PP2A) which blocks the effect of Transcriptional Initiation Factor IA (TIF-IA), that mediates the synthesis of ribosomal RNA and ribosomal proteins. mTORC1 also controls mitochondrial metabolism by regulating the transcriptional activity of PGC1 (*129*).

mTORC1 exerts a positive regulation on lipid synthesis by stimulating SREBP1 and PPAR$\gamma$ transcriptional factors (*121, 122*), or linked to the phosphorylation of Lipin-1, a protein related to the synthesis and metabolism of lipids (*212*).

Activated mTOR inhibits autophagia by phosphorylation of ATG13 and ULK1, key elements in the formation of autophagosomes. These proteins are associated with FIP200 and ATG101 forming a complex that contributes to the genesis of autophagosomes (*125–127*).

mTORC1-dependent phosphorylation of Clip-170 (Cytoplasmic linker protein of 170 kDa) induces its binding to microtubules (*205*) and association to IQGAP1 (*206*), forming a bridge between microtubules and the actin cytoskeleton.

Effectors of mTORC2. mTORC2 plays a critical role in the regulation of AGC family kinases such as AKT, PKC$\alpha/\beta$ and SGK (*130, 143–145*). The stabilization and full activation of AKT requires its phosphorylation at threonine-450 and serine-473 by mTORC2, and at threonine-308 by PDK1. Active AKT phosphorylates numerous substrates promoting cell migration, survival, metabolism, growth, proliferation and angiogenesis (*148*). At least in part, some of these functions are brought out by regulation of mTORC1 signaling, phosphorylating and inhibiting negative mTORC1 regulators, such as TSC2 and PRAS40.

mTORC2 regulates actin polymerization, affecting several regulators of the cytoskeleton via phosphorylation or direct interaction. AKT phosphorylated by mTORC2 phosphorylates other substrates such as PAK (*213*), Girdin (*13*), and Integrin $\beta$3 (*214, 215*) which stimulate rearrangement of the actin cytoskeleton and cell migration. Further, mTORC2 phosphorylates Protein Kinase C$\alpha$ (PKC$\alpha$), promoting the assembly of focal adhesions (*9, 10*). mTORC2 interacts with P-Rex1, a Rac GEF that serves as an effector of mTOR linked to the activation of Rac and cell migration (*11*). mTORC2 affects the ability of neutrophils to retract back during chemotaxis by regulating the phosphorylation of myosin II downstream of a signaling axis that includes adenylyl cyclase 9, cAMP and RhoA (*137*).

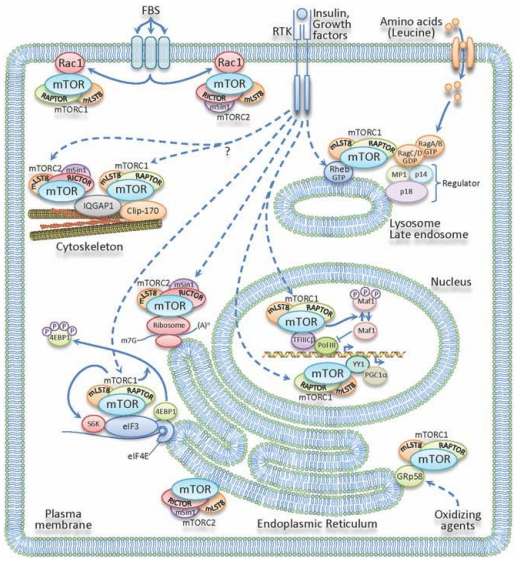
AMPK binds to 14-3-3, likely causing a conformational change that keeps mTORC1 inactive (*104*) (*105*). Additionally, the tumor suppressor LKB1 phosphorylates AMPK in response to energy stress, thus inhibiting mTORC1 (Fig. 2) (*106–111*). Also, DNA damage can block mTORC1 signaling through AMPK activation mediated by p53 (*112*).

Hypoxia also negatively impacts mTORC1 activity. The hypoxia-inducible factor 1α (HIFα) promotes the expression of REDD1 (also known as Rtp801), which by capturing 14-3-3 maintains the TSC1/TSC2 inhibitory complex available to control Rheb in the inactive GDP-bound form, thus resulting on a reduction of mTORC1 activity under hypoxic conditions (Fig. 2) (*113, 114*). Consistent with this, the tumor suppressor PML and the hypoxia-inducible proapoptotic protein BNIP3, block mTORC1 by interfering with the interaction between mTOR and Rheb, in the case of PML by interacting with mTOR, whereas in the case of BNIP3 by interacting with Rheb (Fig. 2) (*115, 116*).

The redox status of the cell impacts the activity of mTORC1 (*8, 117*). In this case, GRp58/ERp57, an mTOR-interacting protein, acts as a sensor that links an oxidant stimulant to the activation of mTORC1 (*8*). Interestingly, GRp58 coexist with mTOR at the cytosolic side of the endoplasmic reticulum and contributes to the assembly of mTORC1 (Fig. 2) (*8*). A putative role as a redox sensor has been attributed to the yeast TOR-FATC domain (*118*).

## CELLULAR ACTIONS OF MTORC1

mTORC1 promotes anabolic and inhibits catabolic processes, to regulate cellular growth, proliferation and metabolism. mTORC1 is a promoter of protein synthesis, phosphorylates S6K and 4EBP-1 leading to synthesis of proteins involved in cell proliferation and survival.




### *mTORC1 Promotes Protein Synthesis*

Phosphorylation of 4E-BP1 (at three threonines and one serine residues) promotes its dissociation from eIF4E, allowing their participation in the cap-dependent translation (*119*). mTORC1 phosphorylates S6K at the hydrophobic motif enabling a second phosphorylation at the catalytic domain by PDK1, obtaining its full activation. Activated S6K promotes phosphorylation of multiple effectors including ribosomal protein S6 (S6), SKAR (S6K1 aly/REF-like target), PDCD4 (Programmed Cell Death 4), eEF2K (eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase), CBP80 (Cap-Binding Protein 80) and eIF4B (eukaryotic Translation Initiation Factor 4B), which collectively enhance protein synthesis and ribosome biogenesis (*67*). mTORC1 also

**Figure 3.** mTORC1- and mTORC2-interacting proteins determine the subcellular localization and activation of these complexes. The diversity of actions in which mTOR complexes are unequivocally involved are controlled at the cellular level by different interacting partners that recruit mTOR complexes to different subcellular locations, providing a link with upstream activators, and bringing downstream effectors into their proximity. In response to amino acids, mTORC1 is recruited to the surface of lysosomes by interaction with Rag GTPases and the ragulator complex, allowing its activation by Rheb (*99*). In serum-stimulated cells, mTORC1 and mTORC2 are translocated to the plasma membrane by direct interactions with the small GTPase Rac1, putatively activating a positive regulatory loop that involves the Rac guanine nucleotide exchange factor P-Rex1 (*11, 151, 187*). This recruitment of both mTOR complexes correlates with their activation via a mechanism that depends on the expression of Rac1 (*187*). The nucleus is also a destination for mTORC1 via interactions with the transcriptional regulators TFIIIC and YY1, regulating the expression of ribosomal components (*193*) and mitochondrial genes (*129*). The association of mTOR with microtubules and the actin cytoskeleton can be mediated by its interaction with the cytoskeleton-associated proteins Clip-170 and IQGAP1 (*201, 205, 206*). Ribosomes are emerging as important regulators of mTORC2 (*142, 200*). Association between mTORC1 and the eIF3 promotes efficient protein translation by facilitating the phosphorylation of S6K and 4EBP1 (*194*). The cytosolic face of the endoplasmic reticulum captures mTORC1, where p70S6K is present and phosphorylated, whereas 4EBP1 is absent, providing an example of specificity related to the regulation of mTORC1 by restricting its subcellular localization and that of one of its cognate substrates (*8*). GRp58 promotes the assembly of mTORC1 and its sensitivity to oxidizing agents. These proteins are found at the endoplasmic reticulum and cytosol, suggesting that changes on the subcellular localization of mTOR affect its availability to be integrated into a complex (*8*). In this regard, an endoplasmic reticulum localization sequence has been identified at the amino terminal region of mTOR (*185*).

regulates ribosome biogenesis through inhibitory phosphorylation of Protein Phosphatase 2A (PP2A) which blocks the effect of Transcriptional Initiation Factor IA (TIF-IA), that mediates the synthesis of ribosomal RNA and ribosomal proteins (*120*).

### *mTORC1 Effect on Lipid Synthesis*

Lipid biosynthesis is positively regulated by mTORC1, via p70S6K, that activates a metabolic program requiring the expression of genes involved in the synthesis of cholesterol and other lipids, controlled by SREBP1 and 2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 and 2) transcription factors (*121, 122*). This pathway is considered relevant in cancer, which is characterized by an abnormally exacerbated metabolism (*123*).

### *mTORC1 Effect on Autophagia*

Under low nutrient availability conditions, self-degradation of intracellular components allows protein turnover and recycling of amino acids, providing an intracellular source of nutrients. During this process, known as macroautophagy, autophagosomes engulf organelles and protein complexes to be degraded, and eventually fuse with lysosomes in order to digest the autophagosomal contents. Autophagy is triggered by AMPK (known as an energy sensor) by phosphorylating ULK1, a conserved kinase that regulates this process in eukaryotic cells (*124*). Whereas activated mTOR inhibits the autophagic process by phosphorylation of the autophagy-related gene 13 (Atg13) and ULK1 (unc-51-like kinase 1), which in complex with FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) and ATG101 conform the mammalian equivalent of the Atg complex, initially identified in yeast, that includes key elements in the formation of autophagosomes (*125–128*).

### *mTORC1 in Mitochondrial Metabolism*

mTORC1 also controls mitochondrial metabolism. In this case, this effect is mediated by a direct interaction with the transcription factor YY1, forming a complex that regulates the transcriptional activity of PGC-1$\alpha$, a key controller of the expression of mitochondrial genes (*129*). Via this pathway, mTORC1 exerts a positive effect on mitochondrial oxidative activities, whereas rapamycin-mediated inhibition resulted in symptoms of diabetes in mice.

## EMERGING MECHANISMS OF REGULATION OF MTORC2

Growth factors and other extracellular cues lead to maximal activation of AKT by promoting its phosphorylation at Ser-473 by mTORC2 via a mechanism that remains elusive (*42, 130, 131*). Since PI3K leads the initial step of activation of AKT, via PIP3 that recruits PDK1 and AKT to the plasma membrane promoting the phosphorylation of AKT at Thr-308, the putative role of this lipid kinase in the activation of mTORC2 has been recently tested. In vitro kinase assays served to demonstrate that mTORC2, isolated by immunoprecipitating Rictor, is activated by PIP3, as determined by the phosphorylation at Ser-473 of a GST-fusion AKT construct lacking the PH domain (*132*). However, since Rictor has been found associated with other kinases (*133, 134*), its activities as a component of mTORC2 need to be further confirmed by additional experiments directly inhibiting mTOR kinase activity or expression. In addition, PI3K-independent pathways might also control mTORC2, as it has been recently discovered in *Dictyostelium* (*135*).

Examples of growth factors and agonists acting on tyrosine-kinase receptors or chemotactic G protein-coupled receptors that activate mTORC2 include insulin, PGE and chemoattractants (*131, 136, 137*). In contrast to the critical role played by Rheb in the activation of mTORC1, this small GTPase does not participate in the activation of mTORC2. However, it has been documented that, independently of its GAP-activity, TSC1/TSC2 complex interacts with mTORC2 promoting its activation (*138, 139*).

Regarding the possibility that aminoacids, classical activators of mTORC1, also have a positive effect on mTORC2, recent evidences indicate that this is in fact the case, but the mechanism differs. They activate mTORC2, via class I PI3K, promoting AKT phosphorylation at Serine-473 and the subsequent phosphorylation of FOXO3a, an AKT substrate (*140*). In addition, Hsp70 (heat shock protein of 70 kDa ) has been identified as a Rictor-binding protein that regulates the assembly of mTORC2 as well as its kinase activity (*141*). A novel mechanism of activation of TORC2 involves its association with ribosomes. This interaction, discovered by a genetic screen in budding yeast, is also relevant in normal mammalian cells and in melanoma and colon cancer cells. Interestingly, it does not require active protein synthesis and occurs via PI3K-signaling in response to insulin, suggesting that interaction between mTORC2 and ribosomes constitutes a critical step for its activation in response to growth factors (*142*).

### *mTORC2 Controls* the *Stability* and *Function* of AGC *Kinases Including* AKT and PKC

Evidence from yeast to mammals has established that TORC2 is a main regulator of AGC kinase family by phosphorylating their turn and hydrophobic motifs which, together with a parallel phosphorylation at the activation-loop by PDK1, offers a gradual mechanism of activation (*130, 143–145*). By means of a cotranslational mode of regulation, TORC2 contributes to the folding and stabilization of AKT, via constitutive phosphorylation of Thr-450, or the equivalent site in PKC$\alpha/\beta$ (*143, 145–147*). Loss of mTORC2 activity reduces PKC$\alpha$ and AKT protein levels (*143*).

Active AKT phosphorylates numerous substrates involved in the control of fundamental cellular functions including survival, metabolism, growth, migration, proliferation and angiogenesis (*148*). As mentioned, some of these functions are brought out by regulating mTORC1 signaling, by phosphorylating and inhibiting negative regulators of mTORC1 such as TSC2 and PRAS40 (Fig. 2). Thus AKT constitutes a node that integrates mTORC2 and mTORC1 signaling axis.

### *mTORC2 Leads to Cell Migration*

Diverse extracellular cues induce the acquisition of a polarized phenotype. Tightly controlled adjustments of cell shape are the result of a complex molecular choreography involving parallel cascades controlled by dynamic protein-protein interactions and local and temporal changes in the levels of second messengers. Chemotactic receptors promote cell migration via a mechanism in which mTORC2 is emerging as a central player (Fig. 4) (*134, 149–152*). The molecular connections linking receptors to

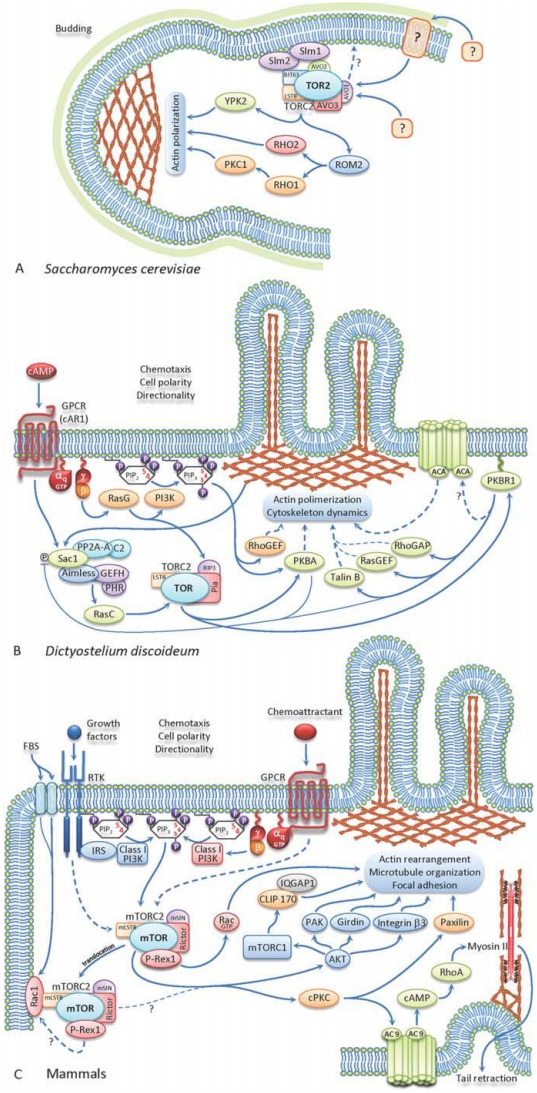



**Figure 4.** TORC2 signaling in chemotaxis. Comparative scheme of TORC2-dependent polarization of actin microfilaments and chemotaxis as currently described in *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Dictyostelium discoideum* (B) and mammalian cells (C). (A) In *S. cerevisiae*, TORC2 is organized in Tor2 kinase in concert with protein adaptors Avo1 (mSIN ortholog), Avo2, Avo3 (Rictor ortholog), Bit61 and Lst8 (*6*). This complex controls the distribution of actin cytoskeleton during cell division or budding (*6, 7*). TORC2 activates Rho-like GTPases RHO1 and RHO2 via their GDP/GTP exchange factor (GEF) Rom2 (*159, 160*). PKC1 is a downstream effector of RHO1 that modulates polarization of the cytoskeleton (*160*). TORC2 can also modulate actin organization through the interaction between Avo2 and Bit61 with Slm1 and Slm2 proteins (synthetic lethal with MSS4 1/2), which contain a PH domains that bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) at the plasma membrane (*162*). The AGC family serine/threonine kinase YpK2 (SGK1 ortholog) is another TORC2 substrate that regulates actin polarization (*163*). Moreover, Avo1 (mSIN1 ortholog) contains a PH-like domain potentially involved in the recruitment of TORC2 to the membrane (*216*). (B) In *D. discoideum* TORC2 contain Tor, LST8, Pia (Rictor ortholog) and Rip3 (mSIN ortholog). Chemotactic response of *D. discoideum* to an extracellular gradient of cyclic AMP (cAMP) is mediated by G protein-coupled receptors with the subsequent activation of RasG GTPase by G$\beta\gamma$. RasG promotes activation of PI3K generating PIP3, allowing the recruitment and activation of AKT homolog PKBA and GEFs (*217*). PIP3-independent TORC2 activation involves RasG through RIP3 (*135*) and the RasC GTPase (*165, 166*). In turn, RasC activation requires the activation of the RasGEF complex (Sac1/Aimless/GEFH/PP2A) by GPCR and F-actin. Activated TORC2 located at the leading edge of the cell after chemoattractant stimulation, directly phosphorylates the hydrophobic motif of AKT homologs PKBR1 and PKBA (*135*). Also, PKBR1 controls Talin B, GEFN/GEFS (Ras GEFs) and GACQ (a RhoGAP) phosphorylation and adenylyl cyclase A (ACA) activation (*135, 165*). Overall, RhoGEF, PKBA and PKBR1 substrates regulate cytoskeleton dynamics and chemotaxis. In addition, PKBA and PKBR1 phosphorylate Sca1 providing a negative regulatory loop (*166*).
C) In mammalian cells mTORC2 activates Rac via a direct interaction with P-Rex1 (*11*). Furthermore, Rac1 induces translocation of mTORC2 to the plasma membrane where it putatively promotes a positive regulatory loop on Rac via P-Rex1 (*187*). In addition, chemotactic GPCRs activate Rho at the trailing edge of neutrophils via an mTORC2-dependent mechanism. This process involves the activation of adenylyl cyclase 9 downstream of mTORC2-activated PKC, resulting in the assembly of contractile complexes involving myosin II and actin (*137*). mTORC2 plays a critical role in the regulation of AGC family kinases that, among their multiple actions, regulate the cytoskeleton (*130, 143–145*). Active AKT phosphorylates substrates such as p21-activated kinase (PAK) (*213*), Girdin (*13*), and Integrin $\beta$3 (*214, 215*), among others, which stimulate cell migration and actin cytoskeleton rearrangement.

the activation of mTORC2 are still poorly defined. Recent evidences highlight the importance of dynamic changes in the localization of mTOR complexes. Extracellular stimuli that promote cell migration orchestrate a dynamic remodeling of the actin cytoskeleton, tightly controlled by local activation of Rho GTPases, which are molecular switches activated by guanine nucleotide exchange factors that promote the interchange of GDP for GTP in the Rho GTPases (*153, 154*). During a chemotactic response, actin polymerization pushes the cell forward and actomyosin complexes retract the trailing edge, resulting in the mobilization towards the source of chemoattractant. The role played by mTORC2 in this complex scenario is starting to be addressed (*9, 10*). mTORC2 controls cell movement via the activation of Rac (*11*), a member of the group of Rho GTPases that promotes the emergence of cellular protrusions called lamellipodia (Fig. 4). The essential role of mTORC2 promoting Rac GTPase activation and cell migration has been documented in experiments in which the expression of Rictor is experimentally decreased using a knockdown approach (*151*). Under these circumstances, migration of SCOV-3 ovarian cancer cells in response to IGF-1, as well as of mast cells in response to prostaglandin E2, is decreased (*151, 155*).

mTORC2 regulates the cytoskeleton via phosphorylation of AKT or direct interaction with P-Rex1 (Fig. 4). AKT activated by mTORC2 phosphorylates diverse proteins involved in cell migration, such as PAK (p21-activated kinase), Girdin (also known as GIV/APE) (*156*), and Integrin $\beta 3$, which stimulate cell migration and actin cytoskeleton rearrangement (*157*). Recently, mTORC2 was identified as an interacting partner of P-Rex1, a PIP3-dependent Rac exchanger also activated by G$\beta\gamma$ (Fig. 4) (*11*). Thus, mTORC2 activates Rac via direct interactions with P-Rex1, promoting cell migration even in the presence of rapamycin (*11*). More recently, a role for mTORC2 during neutrophil chemotaxis has been documented. In this case, Rictor knockdown affects the ability of neutrophils to retract their trailing edge during chemotaxis, independently of AKT. The proposed mechanism involves cAMP in the regulation of RhoA via the activation of adenylyl cyclase 9, downstream of mTORC2 (Fig. 4) (*137*). In different cell types, AKT plays a central role promoting cell migration downstream of mTORC2. In SKOV-3 cells, mTORC2 selectively phosphorylates Akt1, involving this kinase in a chemotactic process promoted by IGF-1. An interesting interplay between P-Rex1 and AKT1 determines the ability of mTORC2 to promote cell migration (*151*). In this case, P-Rex1 expression contributes to the activation of AKT1 by mTORC2 in response to IGF-1 and also to activate Rac and cell migration downstream of AKT1, suggesting the existence of a positive regulatory feedback loop (*151*).

The mechanisms by which TORC2 regulate the actin cytoskeleton have been studied in more detail in budding yeast and *Dictyostelium discoideum* (Fig. 4) (*1, 32, 158*).

Cell cycle in budding yeast implies polarization of actin bundles that allow correct cell organization for budding initiation, maturation and separation (Fig. 4). Genetic ablation of *TOR2* in *S. cerevisiae* causes defects in actin organization during all phases of the cell cycle (*31*). Effectors of TORC2 that promote reorganization of actin cytoskeleton lead to activation of Rho-like GTPases RHO1 and RHO2 (*159*). In fact, over-expression of RHO1, RHO2, their guanine nucleotide exchange factor (GEF) ROM2 or deletion of SAC7 (a GTPase-activating protein) suppressed *TOR2* lethality in *S. cerevisiae*, indicating that TORC2 activates Rho GTPases and the actin cytoskeleton via the guanine exchange factor ROM2 (*159, 160*). Eventually, downstream effectors of RHO1 were identified, in particular Pkc1 which rescues defects in cytoskeleton polarization. Others components of this pathway, Slm proteins (Slm1 and Slm2) are mTORC2 substrates also involved in the regulation of the cytoskeleton (*159, 161–164*). They contain pleckstrin homology (PH) domains that interact with phosphatidylinositol,4,5-bisphosphate (PIP2) helping to recruit TORC2 to the plasma membrane (*162*).

*Dictyostelium discoideum* offers the most detailed example of TORC2 signaling to the cytoskeleton regulating chemotaxis. In this case, TORC2, constituted by TOR, LST8, Pia (AVO3 in *S. cerevisiae* and Rictor in mammalian) and Rip3 (AVO1 in *S. cerevisiae* and mSIN in mammalian cells), all of them vital as indicated by the phenotype of deficient cell which lose polarity and directionality (*135*), integrate signaling inputs from upstream regulators (receptors) to downstream effectors (GEF, PKBR) (Fig. 4). G protein-coupled receptors are activated during the chemotactic response of *Dictyostelium* to extracellular gradients of cyclic AMP (cAMP), then a G$\beta\gamma$mediated pathway leads to cell migration-mediated via PI3K dependent and independent mechanisms (Fig. 4). PIP3 production allows activation of PH-domain-containing proteins like PKBA/AKT at the leading edge of moving cells. Also, TORC2 localizes at the leading edge of chemoattractant-stimulated cells. In these cells, RasC is recognized as the main cytosolic GTPase involved in TORC2 activation (*165, 166*). TORC2 phosphorylates PKBA and PKBR1, activates adenylyl cyclase, and leads to actin polymerization and chemotaxis (Fig. 4). Elevation of PIP3 at the leading edge of chemotactic cells causes cell polarization. However, additional PIP3-independent pathways do exist. The PIP3-independent pathway that activates TORC2 involves heterotrimeric G proteins and Ras GTPases (*135*) and Sca1/aimlees/GEFH/PHR as the group of proteins that modulate the activation of RasC–TORC2 pathways and perhaps their location at the membrane (*167*). A direct connection with TORC2 might depend on the interaction between Ras and Rip3, a component of TORC2 that contains a Ras-binding domain (RBD) (*52*).

### *In Mammalian Cells, P-Rex1 Links mTORC2 to Rac Activation and Cell Migration*

mTORC2 regulates cell migration via the Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) P-Rex1 (Fig. 4) (*11, 168*). As indicated, the complex formed by mTORC2 and P-Rex1 (*11*) has been involved in the activation of AKT1 and cell migration in

cancer cells stimulated with Insulin-like growth factor (*168*). P-Rex1 belongs to a family of more than 60 human RhoGEFs characterized by the presence of DH-PH tandem domains. P-Rex1 is the paradigmatic member of a group of two RacGEFs (one of them with two splicing variants) that share an architecture that includes two DEP, two PDZ domains and a long carboxyl terminus with similarity to inositol phosphate-4-phosphatase (*61, 62*).

P-Rex1 is known to be regulated by PIP3 and G$\beta\gamma$ released from the heterotrimeric G protein coupled to chemotactic GPCRs. It is a critical component of the angiogenic response elicited by SDF-1/CXCL12 acting on CXCR4 receptors (*169*) and, through direct interactions with the carboxyl-terminus of S1P1, regulates the chemotactic response to sphingosine-1-phosphate (*170*). Given the structural similarity between mLST8 and the G$\beta$ subunit of heterotrimeric G proteins, and the fact that many G protein-coupled receptors lead to cellular and molecular events compatible to mTORC2-dependent activities, such as cytoskeleton remodeling and AKT activation, an open interesting question is the possible direct regulation of mTORC2 signaling by G protein-coupled receptors acting through G$\beta\gamma$ in mammalian cells. Chemotactic cell migration in *Dictyostelium* is known to be regulated by extracellular cAMP recognized by cAR, a GPCR that, through G$\beta\gamma$, leads to changes of the actin cytoskeleton and cell migration via PI3K-dependent and independent mechanisms that involve TORC2 (*52, 171*). Thus, the interaction between mTORC2 and P-Rex1 seems to constitute a signaling module linked to chemotactic cell migration.

### *mTORC2 in Cancer Metastasis*

Progression of PTEN-deficient prostate cancer involves the participation of mTORC2 (*172*). Interestingly, P-Rex1 has also been recently involved in the progression of prostate and breast cancer (*173–175*).

Tumor-induced angiogenesis results from a diversity of altered pathways responding to angiogenic factors secreted by growing tumoral cells, resident fibroblasts, and recruited proinflammatory monocytes (*176–178*). One of these pathways involves the SDF-1/CXCR4 signaling axis (*179*). The signaling pathway activated in endothelial cells by CXCR4 receptors involves the critical participation of P-Rex1 which, in response to SDF-1, activates Rac, representing this as a critical step in cell migration and angiogenesis (*169*). This finding opens the possible involvement of mTORC2 in angiogenic signaling downstream of CXCR4. The role played by mTOR as a critical participant in tumor-induced angiogenesis has been recognized even before the discovery of the two independent mTOR complexes (*180, 181*).

### *Cellular Dynamics of mTORC1 and mTORC2: Changes in Subcellular Localization are Linked to Activation*

Emerging models of mTORC1 and mTORC2 activation involve changes in the localization of these complexes (Fig. 3). In this regard, it has been recently shown that the small GTPase Rac1 recruits mTORC1 and mTORC2 to the plasma membrane (*182*). Interestingly, since Rac is activated downstream of mTORC2 via the interaction of this complex with the Rac guanine exchange factor P-Rex1 (*11*), it is possible that a regulatory loop involving mTORC2/P-Rex1/Rac1 controls the signaling behavior of this complex at the plasma membrane. In the process of activation, mTOR complexes change their localization. Under basal conditions, it is cytosolic but can also be found at distinct membrane compartments such as the endoplasmic reticulum and Golgi (*8, 183–185*). In response to amino acids, mTOR is recruited by the so-called ragulator protein complex to late endosomes and lysosomal membranes where it interacts with Rag GTPases (*99, 101*). The ragulator protein complex is critical at this step, highlighting the importance of changes in the localization of mTORC1 for its activation in response to aminoacids. Interestingly, increased peripheral positioning of lysosomes correlates with increased mTORC1 activity (*186*).

Different reports have documented the localization of mTOR and Rheb at different subcellular localizations, opening the intriguing possibility that different signaling inputs lead mTOR to different location and temporality of activation (Fig. 2). The role of the small GTPase Rac recruiting mTORC1 and mTORC2 to the plasma membrane in response to serum, via an interaction with the carboxyl-terminus of Rac1 (*187*) is potentially linked to the requirement of P-Rex1 and AKT1 to localize Rac to the plasma membrane in response to IGF-1 (*151*). Alternatively, mTORC1 coexists, at the cytosolic side of the endoplasmic reticulum, with GRp58, a recently described mTOR partner that contributes to the assembly of mTORC1 and acts as a sensor of an oxidant status (*8*).

Little is known about the cellular dynamics of mTORC2. This complex localizes mainly at the cytosol and specific areas of the cell membrane. mTORC2 and PKC$\alpha$ have been found at lipids rafts with the influence of syndecan-4. In this case, the activity of PKC$\alpha$ contributes to localize mTORC2 to lipid rafts (*188*). However, the mechanism by which PKC$\alpha$ regulates mTORC2 localization remains as an open question.

Studies on the cellular dynamics of mTOR complexes and their specific effectors will help to reveal the underlying specificities by which these complex kinases regulate so many fundamental processes. For instance, where does mTOR activate its effectors relevant for the actions of mTORC2 are still open questions. Additional studies are needed to know whether mTORC2 and P-Rex1 are recruited simultaneously to the leading edge of a migrating cells and to further understand the role of Rac maintaining the distribution of active complexes and the temporality relevant for cell migration.

## INTERPLAY BETWEEN MTORC1 AND MTORC2 COMPLEXES

mTORC1 and mTORC2 cross-regulate their activities (Figs. 2 and 5). Keeping down mTORC1, with either rapamycin or DEP-

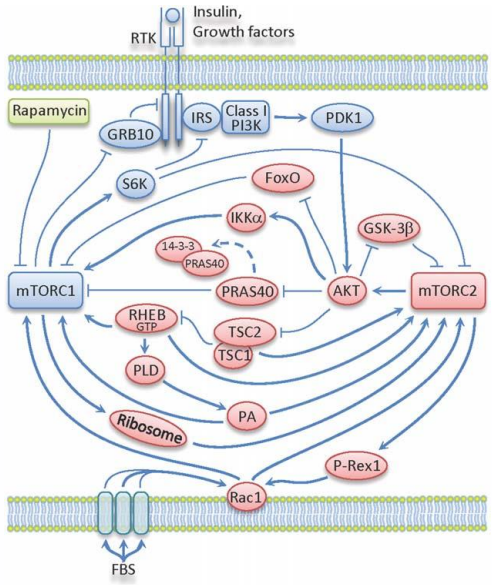



**Figure 5.** Interplay between mTORC1 and mTORC2. mTORC1 and mTORC2 signaling networks are connected at different levels. Whereas mTORC1 keeps controlled different upstream regulators of mTORC2, mTORC1 is itself a downstream effector of mTORC2. The interplay between these complexes involves positive regulation of signaling intermediates, indicated by arrows (↓) and negative regulation of others, indicated with bars (⊥).

TOR overexpression, exacerbates mTORC2 signaling. This effect is due to inhibition of the well-known feedback control mechanism by which mTORC1-dependent effectors prevent PI3K activation linked to IRS, and an emerging mechanism, discovered by extensive phospho-proteomic approaches, which revealed a role for Grb10, identified as an mTORC1 substrate, as a negative regulator of growth factor receptor signaling downstream of mTORC1 (Fig. 5) (*189, 190*). The regulatory intricacies between mTORC1 and mTORC2 have limited the use of rapamycin as an antineoplasic drug. It is currently believed that, for clinical purposes, inhibitors of both signaling complexes, along with the inhibition of other targets, would improve a therapeutic effect. In endothelial cells, for instance, blockade of mTORC1 results in the activation of ERK. In this case, cell migration and angiogenesis are better inhibited when mTOR and ERK inhibitors are simultaneously used (*191*).

The regulatory loop by which mTORC1 keeps inhibited mTORC2, initially recognized due to the activation of mTORC2 in rapamycin-treated cells, naturally occurs when DEPTOR, a negative inhibitor of mTORC1 is overexpressed (*60*). The inhibitory actions of DEPTOR are facilitated by resveratrol, a widely known antioxidant with proved health beneficial effects, which increases the interaction between DEPTOR and mTORC1 (*192*). Resveratrol also inhibits the activation of AKT in response to insulin, indicating that DEPTOR also inhibits mTORC2 (*192*). As mentioned, Grb10 has emerged as an essential regulator of the cross-communication pathways between mTORC1 and mTORC2, Upon phosphorylation by mTORC1, Grb10 inhibits the response to insulin and other growth factors (*189, 190*).

## PERSPECTIVE

Studies focused on the molecular mechanism of action of mTOR complexes have evidenced their critical participation in diverse signaling pathways deregulated under pathological situations such as cancer and diabetes. Future studies will identify additional activators and effectors of these fundamental signaling pathways in diverse mammalian cells under normal and pathological conditions which will be eventually inhibited for therapeutic purposes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Work in our laboratory related to the role of mTOR and P-Rex1 in cell migration and the identification of novel mTOR-partners such as GRp58 is supported by grants from CONACyT. IB-V, IV-M, ER-M, and LC-V are Ph.D. students supported by CONACyT fellowships. We acknowledge the technical assistance provided by Estanislao Escobar Islas and David Pérez.

## REFERENCES

1. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484.
2. Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., et al. (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**, 585–596.
3. Sabatini, D. M., Pierchala, B. A., Barrow, R. K., Schell, M. J., and Snyder, S. H. (1995) The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 20875–20878.
4. Keith, C. T., and Schreiber, S. L. (1995) PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* **270**, 50–51.
5. Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **12**, 21–35.
6. Jacinto, E. (2008) What controls TOR? *IUBMB Life* **60**, 483–496.
7. Polak, P., and Hall, M. N. (2009) mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**, 209–218.
8. Ramirez-Rangel, I., Bracho-Valdes, I., Vazquez-Macias, A., Carretero-Ortega, J., Reyes-Cruz, G., et al. (2011) Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1657–1671.
9. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., et al. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 1296–1302.
10. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., et al. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 1122–1128.

11. Hernandez-Negrete, I., Carretero-Ortega, J., Rosenfeldt, H., Hernandez-Garcia, R., Calderon-Salinas, J. V., et al. (2007) P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 23708–23715.
12. Masri, J., Bernath, A., Martin, J., Jo, O. D., Vartanian, R., et al. (2007) mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor. *Cancer Res.* **67**, 11712–11720.
13. Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., et al. (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev. Cell* **9**, 389–402.
14. Wander, S. A., Hennessy, B. T., and Slingerland, J. M. (2011) Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J. Clin. Invest.* **121**, 1231–1241.
15. van Veelen, W., Korsse, S. E., van de Laar, L., and Peppelenbosch, M. P. (2011) The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* **30**, 2289–2303.
16. Chiu, M. I., Katz, H., and Berlin, V. (1994) RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 12574–12578.
17. Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J., and Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 4947–4951.
18. Lorenz, M. C., and Heitman, J. (1995) TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J. Biol. Chem.* **270**, 27531–27537.
19. Wiederrecht, G. E. F. (1994) The Immunophilins. *Perspect. Drug Discov. Des.* **2**, 57–84.
20. Koltin, Y., Faucette, L., Bergsma, D. J., Levy, M. A., Cafferkey, R., et al. (1991) Rapamycin sensitivity in Saccharomyces cerevisiae is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1718–1723.
21. Brachmann, S. M., Hofmann, I., Schnell, C., Fritsch, C., Wee, S., et al. (2009) Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 22299–22304.
22. Crino, P. B. (2008) Rapamycin and tuberous sclerosis complex: from Easter Island to epilepsy. *Ann. Neurol.* **63**, 415–417.
23. Sehgal, S. N., Baker, H., and Vezina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **28**, 727–732.
24. Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* **28**, 721–726.
25. Douros, J., and Suffness, M. (1981) New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat. Rev.* **8**, 63–87.
26. Eng, C. P., Sehgal, S. N., and Vezina, C. (1984) Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J. Antibiot. (Tokyo)* **37**, 1231–1237.
27. Martel, R. R., Klicius, J., and Galet, S. (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 48–51.
28. Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905–909.
29. Soulard, A., Cohen, A., and Hall, M. N. (2009) TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**, 825–836.
30. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., et al. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**, 457–468.
31. Schmidt, A., Kunz, J., and Hall, M. N. (1996) TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 13780–13785.
32. Cybulski, N., and Hall, M. N. (2009) TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 620–627.
33. Meissner, B., Boll, M., Daniel, H., and Baumeister, R. (2004) Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in Caenorhabditis elegans. *J. Biol. Chem.* **279**, 36739–36745.
34. Miron, M., and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation via TOR signaling: insights from Drosophila melanogaster. *J. Nutr.* **131**, 2988S–2993S.
35. Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., et al. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 815–822.
36. Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., et al. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756–758.
37. Chen, Y., Chen, H., Rhoad, A. E., Warner, L., Caggiano, T. J., et al. (1994) A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1–7.
38. Gangloff, Y. G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., et al. (2004) Disruption of the mouse mTOR gene leads to early post-implantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9508–9516.
39. Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., et al. (2004) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6710–6718.
40. Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., et al. (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* **11**, 859–871.
41. Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D., and Magnuson, M. A. (2006) Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev. Cell* **11**, 583–589.
42. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., et al. (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125–137.
43. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., et al. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* **16**, 1865–1870.
44. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* **15**, 807–826.
45. Hay, N., and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**, 1926–1945.
46. Jacinto, E., and Hall, M. N. (2003) Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 117–126.
47. Perry, J., and Kleckner, N. (2003) The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* **112**, 151–155.
48. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., et al. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175.
49. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., et al. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177–189.
50. Zheng, X. F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G. R., and Schreiber, S. L. (1995) TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* **82**, 121–130.
51. Harris, T. E., and Lawrence, J. C., Jr., (2003) TOR signaling. *Sci STKE* 2003, re15.
52. Lee, S., Comer, F. I., Sasaki, A., McLeod, I. X., Duong, Y., et al. (2005) TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4572–4583.

53. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., et al. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* **11**, 895–904.
54. Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., et al. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* **25**, 903–915.
55. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., and Lawrence, J. C., Jr., (2007) PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 20036–20044.
56. Guertin, D. A., and Sabatini, D. M. (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9–22.
57. Schroder, W. A., Buck, M., Cloonan, N., Hancock, J. F., Suhrbier, A., et al. (2007) Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell. Signal.* **19**, 1279–1289.
58. Huang, X., Pearce, Laura R., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., et al. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J* **405**, 513.
59. Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., and Alessi, D. R. (2011) Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J.* **436**, 169–179.
60. Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., et al. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**, 873–886.
61. Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., et al. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbeta-gamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809–821.
62. Rosenfeldt, H., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J. S. (2004) P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett.* **572**, 167–171.
63. Ramirez-Rangel, I., Bracho-Valdes, I., Vazquez-Macias, A., Carretero-Ortega, J., Reyes-Cruz, G., et al. Regulation of mTORC1 Complex Assembly and Signaling by GRp58/ERp57. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1657–1671.
64. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., et al. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* **22**, 159–168.
65. Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Filonenko, V., Davies, D., et al. (2009) mTORbeta splicing isoform promotes cell proliferation and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 30807–30814.
66. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2009) mTOR signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* **122**, 3589–3594.
67. Ma, X. M., and Blenis, J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 307–318.
68. Shaw, R. J., and Cantley, L. C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430.
69. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K. L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 648–657.
70. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C., and Blenis, J. (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* **13**, 1259–1268.
71. Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K. L. (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17**, 1829–1834.
72. Castro, A. F., Rebhun, J. F., Clark, G. J., and Quilliam, L. A. (2003) Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **278**, 32493–32496.
73. Garami, A., Zwartkruis, F. J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., et al. (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell* **11**, 1457–1466.
74. Tabancay, A. P., Jr., Gau, C. L., Machado, I. M., Uhlmann, E. J., Gutmann, D. H., et al. (2003) Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *J. Biol. Chem.* **278**, 39921–39930.
75. Patel, P. H., Thapar, N., Guo, L., Martinez, M., Maris, J., et al. (2003) Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *J. Cell. Sci.* **116**, 3601–3610.
76. Saucedo, L. J., Gao, X., Chiarelli, D. A., Li, L., Pan, D., et al. (2003) Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 566–571.
77. Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., Belawat, P., et al. (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 559–565.
78. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* **15**, 702–713.
79. Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y., and Avruch, J. (2005) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J. Biol. Chem.* **280**, 23433–23436.
80. Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., and Cantley, L. C. (2002) Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* **10**, 151–162.
81. Potter, C. J., Pedraza, L. G., and Xu, T. (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 658–665.
82. Vander Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., and Kim, D. H. (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell. Biol.* **9**, 316–323.
83. Fonseca, B. D., Smith, E. M., Lee, V. H., MacKintosh, C., and Proud, C. G. (2007) PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 24514–24524.
84. Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K., Tanimura, K., Nakashima, A., et al. (2007) The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J. Biol. Chem.* **282**, 20329–20339.
85. Ballif, B. A., Roux, P. P., Gerber, S. A., MacKeigan, J. P., Blenis, J., et al. (2005) Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 667–672.
86. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P. P. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179–193.
87. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 13489–13494.
88. Carriere, A., Cargnello, M., Julien, L. A., Gao, H., Bonneil, E., et al. (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr. Biol.* **18**, 1269–1277.
89. Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., et al. (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**, 955–968.
90. Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K. L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577–590.
91. Fujishita, T., Aoki, K., Lane, H. A., Aoki, M., and Taketo, M. M. (2008) Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 13544–13549.

92. Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Hsu, J. M., Chou, C. K., et al. (2007) IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* **130**, 440–455.
93. Dan, H. C., Adli, M., and Baldwin, A. S. (2007) Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha. *Cancer Res.* **67**, 6263–6269.
94. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 329–341.
95. Foster, D. A. (2007) Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.* **67**, 1–4.
96. Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N., et al. (2009) Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1411–1420.
97. Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., et al. (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 14484–14494.
98. Lindsley, J. E., and Rutter, J. (2004) Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **139**, 543–559.
99. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., et al. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290–303.
100. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., and Guan, K. L. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 935–945.
101. Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., et al. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501.
102. Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J., and Proud, C. G. (2005) The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J. Biol. Chem.* **280**, 18717–18727.
103. Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., et al. (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 14238–14243.
104. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., et al. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226.
105. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell. Metab.* **1**, 15–25.
106. Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., et al. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2**, 28.
107. Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., et al. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004–2008.
108. Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., et al. (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 3329–3335.
109. Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A., and Guan, K. L. (2004) Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* **18**, 1533–1538.
110. Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., et al. (2004) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91–99.
111. Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 8839–8843.
112. Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., et al. (2007) The regulation of AMPK beta1, 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 Res.* **67**, 3043–3053.
113. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., et al. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **18**, 2893–2904.
114. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L. W. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3-3 shuttling. *Genes Dev.* **22**, 239–251.
115. Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., et al. (2006) PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* **442**, 779–785.
116. Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C. Y., et al. (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem.* **282**, 35803–35813.
117. Sarbassov, D. D., and Sabatini, D. M. (2005) Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 39505–39509.
118. Dames, S. A., Mulet, J. M., Rathgeb-Szabo, K., Hall, M. N., and Grzesiek, S. (2005) The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J. Biol. Chem.* **280**, 20558–20564.
119. Richter, J. D., and Sonenberg, N. (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480.
120. Ma, X. M., and Blenis, J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 307–318.
121. Kim, J. E., and Chen, J. (2004) regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **53**, 2748–2756.
122. Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., et al. (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell. Metab.* **8**, 224–236.
123. Yecies, J. L., and Manning, B. D. (2011) Transcriptional Control of Cellular Metabolism by mTOR Signaling. *Cancer Res.* **71**, 2815–2820.
124. Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., et al. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461.
125. Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., et al. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 12297–12305.
126. Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1981–1991.
127. Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., et al. (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1992–2003.
128. Mizushima, N. (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **22**, 132–139.
129. Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., et al. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* **450**, 736–740.
130. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101.

131. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., et al. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* **16**, 1865–1870.
132. Gan, X., Wang, J., Su, B., and Wu, D. (2011) Evidence for Direct Activation of mTORC2 Kinase Activity by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **286**, 10998–11002.
133. McDonald, P. C., Oloumi, A., Mills, J., Dobreva, I., Maidan, M., et al. (2008) Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res.* **68**, 1618–1624.
134. Zhang, F., Zhang, X., Li, M., Chen, P., Zhang, B., et al. (2010) mTOR complex component Rictor interacts with PKCzeta and regulates cancer cell metastasis. *Cancer Res.* **70**, 9360–9370.
135. Kamimura, Y., Xiong, Y., Iglesias, P. A., Hoeller, O., Bolourani, P., et al. (2008) PIP3-independent activation of TorC2 and PKB at the cell's leading edge mediates chemotaxis. *Curr. Biol.* **18**, 1034–1043.
136. Dada, S., Demartines, N., and Dormond, O. (2008) mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 875–879.
137. Liu, L., Das, S., Losert, W., and Parent, C. A. (2010) mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev. Cell* **19**, 845–857.
138. Yang, Q., Inoki, K., Kim, E., and Guan, K. L. (2006) TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 6811–6816.
139. Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M., and Manning, B. D. (2008) The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4104–4115.
140. Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., and Rosa, J. L. (2011) Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 6128–6142.
141. Martin, J., Masri, J., Bernath, A., Nishimura, R. N., and Gera, J. (2008) Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 578–583.
142. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M. N. (2011) Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* **144**, 757–768.
143. Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., et al. (2008) The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* **27**, 1932–1943.
144. Garcia-Martinez, J. M., and Alessi, D. R. (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* **416**, 375–385.
145. Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K. L. (2008) Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* **27**, 1919–1931.
146. Jacinto, E., and Lorberg, A. (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* **410**, 19–37.
147. Sturgill, T. W., Cohen, A., Diefenbacher, M., Trautwein, M., Martin, D. E., et al. (2008) TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryot. Cell* **7**, 1819–1830.
148. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274.
149. Kuehn, H. S., Jung, M. Y., Beaven, M. A., Metcalfe, D. D., and Gilfillan, A. M. (2011) Prostaglandin E2 activates and utilizes mTORC2 as a central signaling locus for the regulation of mast cell chemotaxis and mediator release. *J. Biol. Chem.* **286**, 391–402.
150. Liu, L., Das, S., Losert, W., and Parent, C. A. (2010) mTORC2 Regulates Neutrophil Chemotaxis in a cAMP- and RhoA-Dependent Fashion. *Dev. Cell* **19**, 845–857.
151. Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., et al. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* **30**, 2954–2963.
152. Moss, S. C., Lightell, D. J. Jr., Marx, S. O., Marks, A. R., and Woods, T. C. (2010) Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J. Biol. Chem* **285**, 11991–11997.
153. Vazquez-Prado, J., Basile, J., and Gutkind, J. S. (2004) Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Methods Enzymol.* **390**, 259–285.
154. Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 690–701.
155. Kuehn HS, J. M., Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM (2011 Jan) Prostaglandin E2 activates and utilizes mTORC2 as a central signaling locus for the regulation of mast cell chemotaxis and mediator release. *J. Biol. Chem.* **286**(1), 391–402.
156. Kitamura, T., Asai, N., Enomoto, A., Maeda, K., Kato, T., et al. (2008) Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 329–337.
157. Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J., and Byzova, T. V. (2006) Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* **5**, 512–518.
158. Van Haastert, P. J. M., and Devreotes, P. N. (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 626–634.
159. Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M. N. (1997) The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* **88**, 531–542.
160. Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y., and Hall, M. N. (1998) The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **8**, 1211–1214.
161. Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A. B., Gao, L., Tabuchi, M., et al. (2004) Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* **23**, 3747–3757.
162. Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., and Kunz, J. (2005) The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1883–1900.
163. Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N. N., Inagaki, F., Wullschleger, S., et al. (2005) Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7239–7248.
164. Fadri, M. (2005) The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1883–1900.
165. Cai, H., Das, S., Kamimura, Y., Long, Y., Parent, C. A., et al. (2010) Ras-mediated activation of the TORC2-PKB pathway is critical for chemotaxis. *J. Cell. Biol.* **190**, 233–245.
166. Charest, P. G., Shen, Z., Lakoduk, A., Sasaki, A. T., Briggs, S. P., et al. (2010) A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev. Cell.* **18**, 737–749.
167. Charest, P. G., Shen, Z., Lakoduk, A., Sasaki, A. T., Briggs, S. P., et al. A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev. Cell.* **18**, 737–749.
168. Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., et al. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* **30**, 2954–2963.
169. Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernandez-Garcia, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., et al. (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol. Pharmacol.* **77**, 435–442.

170. Ledezma-Sanchez, B. A., Garcia-Regalado, A., Guzman-Hernandez, M. L., and Vazquez-Prado, J. (2010) Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1647–1652.
171. Kamimura, Y., Xiong, Y., Iglesias, P. A., Hoeller, O., Bolourani, P., et al. (2008) PIP3-independent activation of TorC2 and PKB at the cell's leading edge mediates chemotaxis. *Curr. Biol.* **18**, 1034–1043.
172. Guertin, D. A., Stevens, D. M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., et al. (2009) mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell.* **15**, 148–159.
173. Montero, J. C., Seoane, S., Ocana, A., and Pandiella, A. (2011) P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene* **30**, 1059–1071.
174. Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., et al. (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol. Cell.* **40**, 877–892.
175. Qin, J., Xie, Y., Wang, B., Hoshino, M., Wolff, D. W., et al. (2009) Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* **28**, 1853–1863.
176. Mazzieri, R., Pucci, F., Moi, D., Zonari, E., Ranghetti, A., et al. (2011) Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell.* **19**, 512–526.
177. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348.
178. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676.
179. Kryczek, I., Lange, A., Mottram, P., Alvarez, X., Cheng, P., et al. (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* **65**, 465–472.
180. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., et al. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* **60**, 1541–1545.
181. Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., et al. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* **8**, 128–135.
182. Saci, A., Cantley, L. C., Carpenter, C. L. (2011) Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol. Cell.* **42**, 50–61.
183. Desai, B. N., Myers, B. R., and Schreiber, S. L. (2002) FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 4319–4324.
184. Drenan, R. M., Liu, X., Bertram, P. G., and Zheng, X. F. (2004) FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **279**, 772–778.
185. Liu, X., and Zheng, X. F. (2007) Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 1073–1082.
186. Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., et al. (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat. Cell. Biol.* **13**, 453–460.
187. Saci, A., Cantley, L. C., and Carpenter, C. L. (2011) Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size. *Mol. Cell.* **42**, 50–61.
188. Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z. W., Martin, K. A., and Simons, M. (2008) Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR Complex2 and Akt activation in a PKCalpha-dependent manner in endothelial cells. *Mol. Cell.* **32**, 140–149.
189. Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., et al. (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* **332**, 1317–1322.
190. Yu, Y., Yoon, S. O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X. M., et al. (2011) Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* **332**, 1322–1326.
191. Dormond-Meuwly, A., Roulin, D., Dufour, M., Benoit, M., Demartines, N., et al. (2011) The inhibition of MAPK potentiates the anti-angiogenic efficacy of mTOR inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **407**, 714–719.
192. Liu, M., Wilk, S. A., Wang, A., Zhou, L., Wang, R. H., et al. (2010) Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *J. Biol. Chem.* **285**, 36387–36394.
193. Kantidakis, T., Ramsbottom, B. A., Birch, J. L., Dowding, S. N., and White, R. J. (2010) mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **107**, 11823–11828.
194. Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**, 569–580.
195. Liu, G. H., Guan, T., Datta, K., Coppinger, J., Yates, J., 3rd, et al. (2009) Regulation of myoblast differentiation by the nuclear envelope protein NET39. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5800–5812.
196. Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585–595.
197. Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., et al. (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J* **405**, 513–522.
198. Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., and Alessi, D. R. (2011) Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J* **436**, 169–179.
199. Woo, S. Y., Kim, D. H., Jun, C. B., Kim, Y. M., Haar, E. V., et al. (2007) PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 25604–25612.
200. Oh, W. J., Wu, C. C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L. A., et al. (2010) mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* **29**, 3939–3951.
201. Wang, J. B., Sonn, R., Tekletsadik, Y. K., Samorodnitsky, D., and Osman, M. A. (2009) IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway. *J. Cell. Sci.* **122**, 2024–2033.
202. Chen, F., Zhu, H. H., Zhou, L. F., Wu, S. S., Wang, J., et al. (2010) IQGAP1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation by Akt activation. *Exp. Mol. Med.* **42**, 477–483.
203. Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., et al. (2011) Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.* **285**, 20109–20116.
204. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294**, 1942–1945.
205. Choi, J. H., Bertram, P. G., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H. H., et al. (2002) The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep.* **3**, 988–994.

206. Swiech, L., Blazejczyk, M., Urbanska, M., Pietruszka, P., Dortland, B. R., et al. (2011) CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J. Neurosci.* **31**, 4555–4568.
207. Michels, A. A., Robitaille, A. M., Buczynski-Ruchonnet, D., Hodroj, W., Reina, J. H., et al. (2010) mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3749–3757.
208. Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., et al. (2010) Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 15380–15392.
209. Kwiatkowski, D. J., and Manning, B. D. (2005) Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.* **14** Spec No. 2, R251–R258.
210. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2003) Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 573–576.
211. Gan, X., Wang, J., Su, B., and Wu, D. (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **286**, 10998–11002.
212. Huffman, T. A., Mothe-Satney, I., and Lawrence, J. C., Jr., (2002) Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 1047–1052.
213. Zhou, G. L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M., et al. (2003) Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8058–8069.
214. Kirk, R. I., Sanderson, M. R., and Lerea, K. M. (2000) Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 30901–30906.
215. Lerea, K. M., Cordero, K. P., Sakariassen, K. S., Kirk, R. I., and Fried, V. A. (1999) Phosphorylation sites in the integrin beta3 cytoplasmic domain in intact platelets. *J. Biol. Chem.* **274**, 1914–1919.
216. Berchtold, D., and Walther, T. C. (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol. Biol. Cell.* **20**, 1565–1575.
217. Affolter, M., and Weijer, C. J. (2005) Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev. Cell.* **9**, 19–34.

1. **Portada de revista: IUBMB Life.**

IUBMB Life

*Volume 63*
*Issue 10*

# Contents

**13th IUBMB Conference, 1st PABMB Conference, and 3rd Meeting of the Signal Transduction and Oxidative Stress Branches of Sociedad Mexicana de Bioquimica, Merida, Yucatan, Mexico, October 22–27, 2011**
**Guest Editors: Fernando López-Casillas and José Vázquez-Prado**

**INTRODICTION**

**Introduction to Special IUBMB Life Issue in Celebration of Cell Signaling Networks, 13th IUBMB Conference, 1st PABMB Conference and 3rd Meeting of the Signal Transduction and Oxidative Stress Branches of Sociedad Mexicana de Bioquímica, to be Held at Mérida, Yucatán, México, October 22–27, 2011.**
*by Fernando López-Casillas and José Vázquez-Prado* **783**

**FEATURES**

**How Mexican Biochemistry Developed and Present Challenges**
*by Antonio Peña* **784**

**The Mexican Society of Biochemistry: Keeping Young at 54**
*by Carlos Gómez-Lojero and Diego González-Halphen* **789**

**The Signal Transduction Branch of the Mexican Society of Biochemistry**
*by Marina Macías-Silva and José Vázquez-Prado* **795**

**Memoranda: History of the Teaching of Biochemistry in Mexico**
*by Federico Martinez and Enrique Piña* **797**

**The History of How the Free Radicals and Oxidative Stress Branch Became a Part of the Mexican Biochemical Society**
*by Mina Königsberg, Tania Zenteno-Savin, Abel Santamarría, and Julio Morán* **803**

**CRITICAL REVIEWS**

**Prolactin and Vasoinhibins: Endogenous Players in Diabetic Retinopathy**
*by Jakob Triebel, Yazmín Macotela, Gonzalo Martínez de la Escalera, and Carmen Clapp* **806**

**Mechanisms Involved in $\alpha_{1B}$-Adrenoceptor Desensitization**
*by J. Adolfo García-Sáinz, María Teresa Romero-Ávila, and Rocío Alcántara-Hernández* **811**

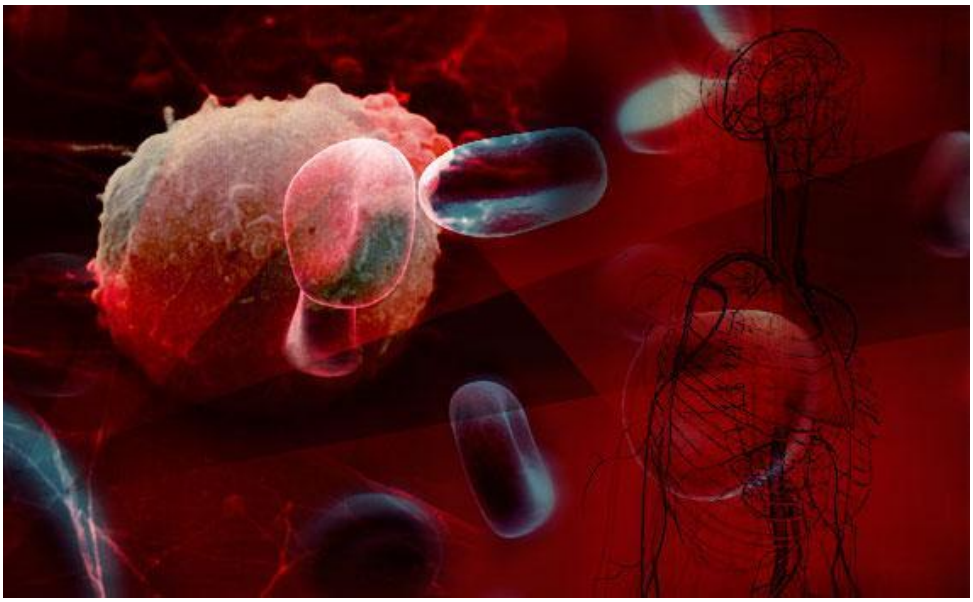
**COVER: Cover artwork designed by Ismael Bracho-Valdés.**

# D. Artículo de divulgación: Angiogénesis tumoral.

Avance y Perspectiva VOL. 4 NO. 3 NUEVA ÉPOCA/JULIO–SEPTIEMBRE 2012
http://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/1732/angiogenesis-tumoral

**Angiogénesis tumoral**

**Ismael Bracho Valdés y José Vázquez Prado***



En el organismo existe una extensa red vascular que se encarga de la correcta distribución de oxígeno y nutrientes, contribuyendo así a mantener un estado físico saludable. Esta red tubular está delimitada por células endoteliales que sirven de barrera selectiva al paso de sustancias y células de la sangre hacia los distintos órganos y tejidos. El plexo vascular primario, formado durante el desarrollo embrionario, conserva cierta plasticidad, de modo que puede dar lugar a la generación de vasos sanguíneos nuevos. El desarrollo de enfermedades como el cáncer se ve favorecido por la generación de vasos sanguíneos que crecen junto con el tumor; este proceso es conocido como angiogénesis tumoral. Las células cancerosas y del estroma tumoral secretan factores angiogénicos que estimulan a las células endoteliales adyacentes, generando cascadas de transducción de señales que dan lugar a eventos de migración celular quimiotáctica, proliferación y ajustes morfológicos compatibles con la función capilar. Además, un tumor en desarrollo puede tener efectos sistémicos tales como promover la movilización de células progenitoras endoteliales provenientes de la médula ósea hacia el tumor en crecimiento; o bien, a sitios en los que se favorece el establecimiento de metástasis. Así pues, factores angiogénicos de origen tumoral, así como los receptores que los detectan y las proteínas de transducción de señales activadas por estos, constituyen blancos farmacológicos útiles en el tratamiento del cáncer. La terapia contra el factor de crecimiento de endotelio vascular, ampliamente conocido como VEGF, representa un ejemplo exitoso que ha beneficiado a pacientes con distintos tipos de cáncer.

**Introducción**

El sistema vascular, constituido por vasos sanguíneos y linfáticos, permite un transporte eficiente y simultáneo de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalización y células circulantes entre tejidos y órganos. Este sistema contribuye a que las células de todo el organismo se mantengan informadas de su entorno y cubran sus requerimientos de oxígeno y nutrientes. Durante el desarrollo embrionario, el proceso de vasculogénesis da origen al plexo vascular primario a partir de células progenitoras conocidas como angioblastos. La complejidad del sistema aumenta al generarse vasos nuevos a partir de los preexistentes; esta segunda etapa que se extiende a la vida postnatal es conocida como angiogénesis, mientras que los vasos linfáticos se originan de venas embrionarias. Tanto éstos como los vasos sanguíneos están revestidos por células endoteliales y las alteraciones en la constitución y función de la red vascular propician patologías debidas a insuficiencia, como en el caso de isquemias, o bien a sobreproducción de vasos sanguíneos, como en la retinopatía diabética [1-4].

En el cáncer, la proliferación descontrolada de células tumorales requiere del suministro de oxígeno y nutrientes. El crecimiento tumoral favorece la generación de vasos sanguíneos que a su vez contribuyen al crecimiento del tumor y al establecimiento de metástasis. Por lo tanto, se considera a la angiogénesis tumoral como un proceso susceptible a inhibición con fines terapéuticos [5-10] (Figura 1). Además, se ha postulado que células progenitoras residentes en la médula ósea pueden responder a factores angiogénicos de origen tumoral y contribuir, de mayor a menor grado, a la angiogénesis tumoral y, en particular, al establecimiento de nichos metastásicos, de tal suerte que células de la médula ósea han sido postuladas como vehículos terapéuticos para el tratamiento del cáncer [11-14].

Ante la premisa de que el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis requieren de la formación de capilares sanguíneos y linfáticos, destaca el potencial terapéutico de inhibir a la angiogénesis tumoral. Con esta idea, la identificación de proteínas que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos tumorales sirve de base para diseñar terapias que combatan el cáncer de manera específica. Las estrategias en desarrollo consisten en inhibir a las proteínas proangiogénicas mediante un diseño inteligente de fármacos, aprovechando el conocimiento básico generado de la caracterización de tales proteínas, siendo particularmente importantes aquellas relacionadas con la detección y transducción de señales angiogénicas [5, 7, 10]. La investigación básica en este campo se ha enfocado tanto en la caracterización de moléculas y procesos implicados en el reconocimiento de factores angiogénicos de origen tumoral por parte de células endoteliales y progenitoras, como en el estudio de cascadas de señalización intracelulares que contribuyen a la angiogénesis tumoral. Estas redes de interacciones bioquímicas controlan diversos procesos celulares necesarios para la formación de un nuevo capilar, entre los que se incluyen el movimiento, proliferación y remodelado de células endoteliales. Estos procesos dependen de cambios en el citoesqueleto, de la expresión de genes y de la secreción de proteasas que remodelan a la matriz extracelular y liberan factores, quimiotácticos y de crecimiento atrapados en ella. Nuestros estudios se han enfocado precisamente en la caracterización de cascadas de transducción de señales relevantes para la migración de células endoteliales [15-24]. Consideramos fundamental la caracterización de los mecanismos moleculares que llevan a la activación de proteínas conocidas como GTPasas de la

familia de Rho, pertenecientes a una de las súperfamilias de proteínas de transducción de señales ampliamente reconocidas por su papel central como switches moleculares que controlan procesos celulares fundamentales. En particular, las GTPasas de la familia de Rho controlan la polimerización de actina, conduciendo a cambios en el citoesqueleto que dan lugar a ajustes en la forma celular y son necesarios para el movimiento de la célula misma. Estos procesos celulares ocurren durante el desarrollo de vasos sanguíneos asociados a tumores. Hemos revisado previamente las bases moleculares de este proceso [25], haciendo énfasis en la participación de receptores con propiedades angiogénicas y las proteínas activadas por ellos, por lo que recomendamos la lectura del texto: *Mecanismos moleculares de la migración de células endoteliales y angiogénesis: papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho*, disponible como documento electrónico en línea: http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq06v30p77_104_Jose_Vazquez.pdf.

**Angiogénesis: Formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de capilares preexistentes**

La formación de vasos sanguíneos nuevos, a partir de capilares preexistentes, se inicia en capilares adyacentes a tejidos secretores de factores angiogénicos. Las células endoteliales responden a factores angiogénicos, desencadenando intracelularmente cascadas de transducción de señales que modifican su fenotipo. La existencia de gradientes de concentración de factores angiogénicos causa que algunas células endoteliales sean las primeras en detectarlos, favoreciendo una respuesta polarizada que contribuye a definir sitios de brote para nuevas ramas endoteliales. La respuesta diferencial entre las distintas células endoteliales, que constituyen a un capilar expuesto a un estímulo angiogénico, está determinada por la participación de diversos sistemas de receptores y cascadas de transducción que localmente generan señales positivas proangiogénicas y negativas, garantizando la integridad del capilar en los sitios en los que no se genera un brote.

Las células líderes de la migración endotelial interpretan una serie de señales quimioatrayentes y repulsivas que determinan de forma muy precisa las rutas de extensión del capilar en formación. Estas células responden a gradientes de VEGF y de otras moléculas que marcan los caminos de migración celular y aquellos en que se establecen barreras que limitan el desplazamiento celular. Tales sistemas de señales, incluyendo ligandos, receptores y proteínas intracelulares de transducción de señales, participan en el remodelado embrionario del sistema vascular y en procesos de angiogénesis tumoral [26, 27].

**Angiogénesis tumoral, perspectiva histórica**

A mediados del siglo XIX, Rudolf Virchow hizo las primeras observaciones en tumores humanos que evidenciaron la estructura anormal de los vasos sanguíneos tumorales[28]. Pocas décadas más tarde, el crecimiento tumoral y la formación de vasos sanguíneos empezaron a ser considerados eventos asociados[29]. Fue en la década de 1930 cuando se estudió por primera vez, en un animal vivo, el patrón de ramificación de vasos sanguíneos en la oreja de conejos a quienes se les colocaron cámaras transparentes[30]. En tanto, la primera asociación entre el

crecimiento tumoral y un infiltrado de vasos sanguíneos recién formados en un modelo tumoral en conejo, data de 1939 [31]. En la década de los 40 se observó que existen vasos sanguíneos que se dirigen hacia un tumor[32-34]; posteriormente se describió la existencia de una actividad angiogénica regulada por oxígeno que en la retina mediaba el crecimiento anormal de vasos sanguíneos[35]. La existencia de un "factor tumoral difusible" con capacidad d atraer nuevos vasos sanguíneos hacia un tumor en desarrollo, fue demostrada en 1968 [36, 37]. En 1971, Judah Folkman introdujo el concepto de que los inhibidores de la angiogénesis podrían usarse como terapia contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis, como la retinopatía diabética[38].

**Crecimiento tumoral y generación de nuevos vasos sanguíneos**

El cáncer se caracteriza por un aumento desproporcionado en la masa del tejido afectado y por su propagación a sitios normalmente ajenos al tipo celular transformado. A nivel molecular, este crecimiento descontrolado es causado por mutaciones o cambios en la expresión de genes que promueven la progresión en el ciclo celular, favorecen la sobrevivencia celular o bien, codifican para proteínas como proteasas y factores de crecimiento capaces de alterar el microambiente a favor del desarrollo de la masa tumoral[39, 40]. Una célula transformada prolifera hasta alcanzar una masa cuyos límites son definidos por la dependencia de su entorno. Para sostener su crecimiento, un tumor debe encontrar la forma de asegurar el suministro constante de nutrientes. Entre las estrategias tumorales para alcanzar este objetivo, destacan la capacidad de promover la generación de nuevos vasos asociados al tumor y la capacidad de movilizarse hacia nuevos sitios en un proceso metastásico[11, 41] (Figura 1). Otras estrategias involucran el crecimiento al margen de vasos sanguíneos, como en el caso de astrocitomas[42, 43] o bien, la generación de estructuras no endoteliales que mimetizan vasos sanguíneos, como puede ocurrir en el melanoma[44]. En general, las proteínas que se expresan en respuesta al microambiente tumoral contribuyen a favorecer el remodelado de la matriz extracelular, alteran la adhesión celular y promueven la motilidad, favoreciendo procesos de invasión, angiogénesis y metástasis, además de promover un estado inflamatorio que puede retroalimentar positivamente al proceso patológico[45, 46].

La capacidad angiogénica de los tumores reside en su habilidad para secretar factores que promueven la generación de nuevos vasos sanguíneos. Un tumor incipiente crece hasta alcanzar el límite que le asegure que sus células reciban el oxígeno necesario para cubrir sus requerimientos metabólicos y mantenerse vivas. Un micro tumor avascular requiere generar sistemas que le permitan el aporte de oxígeno y nutrientes. Así pues, aquellas células que al proliferar la masa tumoral van quedando más alejadas de los capilares existentes, caen en una situación de hipoxia que en sí misma genera una señal intracelular que es trasladada al núcleo de la célula, promoviendo la expresión de genes en respuesta a la falta de oxígeno. El ejemplo paradigmático de esta situación lo ilustra el mecanismo de acción del factor de transcripción regulado por hipoxia, conocido como HIF1α (llamado así por sus siglas en inglés que corresponden a *hypoxia inducible factor*)[47, 48], entre cuyos genes blanco se encuentra el que codifica para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, considerado uno de los

factores angiogénicos más potentes). Así pues, el VEGF secretado por el tumor es reconocido por los receptores presentes en el endotelio de los capilares adyacentes, promoviendo la generación de brotes endoteliales que se mueven hacia la fuente del factor angiogénico y son seguidos de células que proliferan, cambian su forma y consolidan un nuevo capilar que acerca el suministro sanguíneo al tumor en crecimiento, pudiendo además servir de vía para la dispersión de células tumorales en su búsqueda de nuevos nichos.

Entre los múltiples genes cuya expresión se favorece en un tumor en estado de hipoxia, se encuentran los que codifican para receptores que reconocen factores quimiotácticos, de tal manera que al expresarse en la superficie de células tumorales favorecen la motilidad de las mismas y su desplazamiento hacia sitios en que los factores quimiotácticos correspondientes se encuentran presentes. Un ejemplo dramático de esta situación corresponde a la expresión de receptores para el factor derivado del estroma (conocido como SDF-1 o quimiocina CXCL12); estos receptores, llamados CXCR4, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Su expresión en células tumorales favorece el establecimiento de metástasis[49, 50]. Paradójicamente, el SDF-1/CXCL12 también puede expresarse en condiciones de hipoxia y funcionar como una señal de sobrevivencia para células tumorales y, en paralelo, difundirse hacia la periferia del tumor, actuando como un factor angiogénico que incluso favorece el reclutamiento de células progenitoras endoteliales provenientes de la médula ósea[51, 52].

**Switch angiogénico**

El desarrollo de vasos sanguíneos asociados a tumores puede ocurrir de manera muy pronunciada. A esta etapa de transición entre un estado no vascularizado que limita el crecimiento tumoral y un estado de formación rápida de vasos sanguíneos se conoce como "switch a giogénico"[53]. La inducción del switch angiogénico depende del desequilibrio en la balanza que representa la acción de moléculas antiangiogénicas y proangiogénicas en favor de estas últimas. La expresión de genes proangiogénicos se ve incrementada por estímulos como la hipoxia resultante de un aumento en la masa tisular[54], así como por la activación de oncogenes o por mutaciones en genes supresores de tumor[55].

El switch angiogénico puede también ocurrir a consecuencia de la liberación de factores angiogénicos atrapados en la matriz extracelular. En este caso, la acción de proteasas es fundamental. La metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) es considerada como un componente del switch angiogénico debido a que libera al VEGF asociado a la matriz extracelular, quedando disponible para su interacción con sus receptores[56].

**Formación de vasos sanguíneos tumorales**

Un aumento en la disponibilidad de VEGF es suficiente para iniciar la angiogénesis en la vasculatura quiescente. Las etapas iniciales están definidas por vasodilatación e incremento en la permeabilidad capilar. Posteriormente ocurre la migración de células endoteliales hacia el estímulo angiogénico, cuyas propiedades quimiotácticas determinan la dirección de la

migración endotelial y, en consecuencia, la región en la que los vasos nuevos son formados. Luego, las células endoteliales se multiplican formando una columna que crece en la dirección marcada por la migración de las células líderes que siguen la fuente del factor angiogénico. Inicialmente se forman ramas endoteliales que no van acompañadas de pericitos y que, por lo tanto, muestran una fragilidad mayor en comparación con los capilares que les dieron origen[57]. Finalmente, las células endoteliales adquieren una morfología tubular capaz de permitir la circulación sanguínea. En esta etapa ocurre la estabilización de los vasos gracias a la asociación entre células y con la matriz extracelular. Considerando que los capilares tumorales frecuentemente presentan anormalidades estructurales que impiden un transporte apropiado de sangre, dejando a las células tumorales poco accesibles a terapias citotóxicas, se ha sugerido que la aplicación de tales terapias citotóxicas debe ser precedida por una terapia que favorezca la normalización de estas estructuras capilares.

**Estimulación del crecimiento angiogénico. Selección de células que forman un brote endotelial ante un estímulo angiogénico**

La formación de un brote capilar depende de que algunas células endoteliales sean seleccionadas para dar lugar a una rama capilar nueva. Estas células se transforman en líderes, se ubican al frente de la rama endotelial emergente y dirigen la migración y crecimiento del brote hasta generar una rama que eventualmente se consolida en un capilar funcional. El mecanismo que selecciona a las células endoteliales que reaccionan a la presencia de un factor angiogénico depende de señales negativas locales. Los receptores Notch y su ligando Delta-like-4 (DLL4) son esenciales para este control negativo de la generación inapropiada de brotes durante el proceso de remodelado de los vasos sanguíneos. En modelos tumorales, un bloqueo de la vía de DLL4-Notch causa una formación masiva de brotes y bifurcación de vasos sanguíneos tumorales generando vasos poco funcionales que, por consiguiente, no cubren los requerimientos del tumor, conduciendo a un estado hipóxico y disminución del crecimiento tumoral. Esto implica que la vía de Notch puede ser blanco de terapias antiangiogénicas. El VEGF-A induce la expresión de DLL4, de esta forma las células que dirigen el crecimiento del brote endotelial producen al ligando (DLL4) que hace que sus vecinas se vean impedidas a generar otro brote endotelial.

**Consecuencias de la generación de brotes endoteliales y de la quimiotaxis**

Las células endoteliales ubicadas al frente del brote adquieren una conducta invasiva y móvil. Además, activan proteasas que degradan localmente la membrana basal subendotelial. Un gradiente de VEGF funciona como una señal quimioatrayente responsable de causar cambios dramáticos en la forma de la célula líder del brote endotelial, misma que genera extensiones polarizadas conocidas como filopodios, constituidos por extensiones membranales digitiformes que se extienden hacia el frente de las células que migran. Estas extensiones están estructuradas por los filamentos de actina formados por la polimerización de esta proteína del citoesqueleto en respuesta a la transducción de señales quimiotácticas[58]. Al polimerizarse, la actina empuja a la membrana celular en dirección al quimioatrayente. Estas extensiones

celulares se consolidan mediante el establecimiento de adhesiones a la matriz extracelular, contribuyendo al desplazamiento de la célula.

**Transformación de brotes endoteliales en vasos sanguíneos maduros**

Convertir los brotes endoteliales en vasos sanguíneos funcionales depende de la progresión efectiva de distintos procesos celulares. Para formar nuevas conexiones vasculares, las células líderes de la rama endotelial en crecimiento deben suprimir su motilidad y establecer interacciones con otros capilares, de forma que eventualmente se pueda cerrar el circuito endotelial.

El establecimiento del flujo sanguíneo requiere de la formación del lumen vascular. Este proceso involucra un cambio importante en la forma celular que requiere de la contribución de la maquinaria de adhesión celular, particularmente de receptores de la familia de las integrinas y de la activación de GTPasas pequeñas de la familia de Rho, en particular Cdc42 y Rac1. La activación de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42 promueve la polimerización de actina y los cambios en la forma celular que resultan en consecuencia. Finalmente, el reclutamiento de pericitos y la síntesis de proteínas de matriz extracelular que constituyen a la membrana basal subendotelial, junto con la reducción en la proliferación endotelial, resultan en la maduración de los capilares recién formados. En el cáncer pueden presentarse alteraciones en las distintas etapas del proceso, dando lugar a vasos sanguíneos aberrantes.

**Anormalidades en la morfología de los vasos tumorales**

Los capilares tumorales frecuentemente son disfuncionales. Por ellos el flujo sanguíneo es irregular, lento y en ocasiones oscilante. Esto se debe a que la angiogénesis tumoral genera capilares que muestran una arquitectura irregular, son dilatados, tortuosos y pueden presentar ramificaciones en fondo de saco. Además, la red vascular que se forma en los tumores es frecuentemente fenestrada y hemorrágica, debido en parte a la sobreproducción de VEGF, que al promover un aumento en la permeabilidad de los endotelios provoca la extravasación de proteínas plasmáticas y el depósito de fibrina. Además, la falta de consolidación de los capilares tumorales es explicada por una menor asociación con células perivasculares, en comparación con capilares normales caracterizados por establecer un contacto íntimo, entre pericitos y el endotelio, requerido para alcanzar la estabilidad de un capilar normal[59, 60].

Las anormalidades estructurales y funcionales en los vasos tumorales reflejan la naturaleza patológica de su inducción. Las características morfológicas peculiares que presenta el endotelio tumoral han justificado la búsqueda de marcadores específicos. Para esto se han empleado métodos proteómicos basados en la recuperación y análisis de proteínas presentes en el lumen de endotelio tumoral[61]. También se han empleado métodos de expresión diferencial de genes en los que se ha comparado endotelio normal con endotelio tumoral[62, 63] y métodos para identificar péptidos con afinidad por endotelio tumoral[64]. Diversos estudios han demostrado que existen diferencias entre endotelio normal y tumoral, así como entre endotelio normal de diferentes orígenes[65, 66]. Cabe destacar que existen proteínas integrales de

membrana que han sido consideradas marcadores de endotelio tumoral. Esta información ha impulsado estudios encaminados a desarrollar agentes terapéuticos dirigidos a reconocer tales proteínas, expresadas de forma exclusiva en los vasos tumorales; así como estrategias para la visualización in vivo del endotelio tumoral.

La justificación general para el uso de agentes dirigidos al endotelio tumoral está basada en la premisa de que su localización hacia el torrente sanguíneo ofrece una mayor accesibilidad al tratamiento por esta vía. Sin embargo, el hecho de que tales vasos frecuentemente presenten aberraciones complica las estrategias terapéuticas, por lo que se ha insistido en que primero deben aplicarse tratamientos encaminados a "normalizar" la estructura de los vasos tumorales, de forma que al estar mejor irrigados resulten más accesibles a la acción terapéutica[67].

**Papel de las células progenitoras endoteliales en la angiogénesis tumoral**

El desarrollo de la vasculatura tumoral puede ser favorecido por el reclutamiento de células progenitoras provenientes de la médula ósea[11-14, 68]. En algunos casos se habla de células progenitoras endoteliales que se incorporan en el lumen de capilares tumorales. Mientras que en otros casos se considera la existencia de poblaciones proangiogénicas que no llegan a incorporarse al lumen del vaso sanguíneo tumoral, pero sí se incorporan al tumor en crecimiento y favorecen el desarrollo de capilares tumorales, aparentemente sirviendo como una fuente adicional de factores angiogénicos.

En ratones usados como modelos experimentales de cáncer, en los que los tumores promueven el reclutamiento de células precursoras endoteliales de la médula ósea[68], se ha demostrado que estas células pueden ser utilizadas como un vehículo de terapia antitumoral. De acuerdo al concepto de "caballo de Troya", estas células pueden reconocer los sitios de desarrollo tumoral, incorporarse a ellos y ejercer localmente su efecto terapéutico. Para ello las células son modificadas genéticamente, introduciéndoles un gen suicida cuya expresión es inducible, de tal forma que una vez incorporadas al tumor se induce la expresión de ese gen y destruye a las células que lo portan y a aquellas localizadas en su entorno[69, 70].

El porcentaje de incorporación de células progenitoras endoteliales generalmente es bajo y depende de la naturaleza del tumor. Sin embargo, en algunos sistemas modelo los tumores son dependientes de la movilización de células endoteliales precursoras[68].

Recientemente se ha postulado la participación de células progenitoras de la médula ósea en el establecimiento de nichos metastásicos[11]. De acuerdo a este concepto, los tumores primarios, al promover la movilización de células progenitoras provenientes de la médula ósea, conducen a que una fracción de ellas se establezca en los sitios en los que eventualmente se generará una metástasis (Figura 1). Esta situación ha sido demostrada en modelos de ratón con cáncer de mama y metástasis a pulmón. En tales modelos, la contribución de la médula ósea fue necesaria para el desarrollo de metástasis y no para el desarrollo de vasos sanguíneos de los tumores primarios[14]. Otra situación en la que la incorporación de células de la médula

ósea fue necesaria para el desarrollo de vasos tumorales, fue la que se demostró en modelos tratados con agentes destructores de la vasculatura tumoral. En estos casos, hubo un resurgimiento rápido de vasos a partir de la periferia del tumor[71, 72]. Ambas situaciones son particularmente importantes, ya que tanto la metástasis tumoral como el resurgimiento agresivo de tumores en pacientes tratados con agentes quimioterapéuticos, se ubican entre los retos más importantes a resolver en el tratamiento de pacientes con cáncer.

De los estudios referidos se vislumbra la posibilidad de que terapias dirigidas contra la movilización de células progenitoras endoteliales sean útiles para prevenir el desarrollo de metástasis o bien, como acompañamiento en el tratamiento con agentes destructores de la vasculatura tumoral, además de su potencial como vehículos para dirigir terapias a los nichos metastásicos. Para consolidar tales expectativas es menester caracterizar a las poblaciones celulares residentes en la médula ósea, que constituyen el grupo de células progenitoras endoteliales y células proangiogénicas, así como entender a nivel molecular los mecanismos que controlan su migración hacia los nichos metastásicos.

**Factores angiogénicos tumorales y sus receptores**

Muchos de los factores angiogénicos expresados por tumores son los mismos cuya función es fundamental durante el desarrollo de la vasculatura en el periodo embrionario. El ejemplo más sobresaliente lo constituye el VEGF-A (comúnmente llamado VEGF). Este es el factor angiogénico cuya inhibición ha demostrado utilidad terapéutica en distintos tipos de cáncer y que durante el desarrollo embrionario tiene una función fundamental: en condiciones de hipoxia es secretado por células tumorales, teniendo entonces una función patológica asociada a la formación de vasos sanguíneos tumorales.

Entre los receptores para factores angiogénicos más estudiados se cuentan tres tipos de receptores para VEGF. De ellos, el VEGFR2 es al que se le ha atribuido un papel preponderante en el proceso de angiogénesis postnatal, incluyendo la angiogénesis tumoral.

**Modelos animales para el estudio de la angiogénesis tumoral**

Varios modelos tumorales en ratones han servido para avanzar en la caracterización de la angiogénesis tumoral. Se ha extendido el uso de ratones modificados genéticamente en los que se altera la función de oncogenes y genes supresores de tumores. En estos ratones la neovascularización comienza en estados displásicos tempranos y es un prerrequisito para el desarrollo tumoral. Los tumores en crecimiento atraviesan por distintos estados histológicos: las células normales progresan a hiperplasia, displasia angiogénica y, eventualmente, a tumores invasivos vascularizados, representando estados similares a los que se observan en muchos cánceres en humanos. Aunque el VEGF y sus receptores se encuentran constitutivamente expresados durante la progresión del tumor, su inhibición bloquea el switch angiogénico y en menor grado el crecimiento tumoral. Por otra parte, se ha evidenciado también la existencia de diversos inhibidores naturales del proceso angiogénico. Acorde con estos modelos, en el caso de pacientes con cáncer de mama, cérvix o próstata, comúnmente

se desarrollan carcinomas premalignos (lesiones in situ) que se vuelven vasoproliferativos[53]. En el cáncer de mama la densidad vascular se ha correlacionado con mal pronóstico[73].

Los modelos animales modificados genéticamente, diseñados para caracterizar la función de algún marcador de endotelio tumoral o de alguna otra proteína -cuya participación en angiogénesis tumoral se presume- se basan en bloquear la expresión del gen correspondiente y provocar algún tipo de neoplasia, de forma que se pueda evidenciar el requerimiento de dicha proteína en el proceso de angiogénesis y progresión tumoral. Los modelos que hasta ahora se han desarrollado han alcanzado un grado de sofisticación considerable. Ejemplos recientes consisten en estudiar el efecto de interrumpir los genes de diferentes candidatos moleculares, de manera específica al endotelio vascular, en algunos casos incluso de forma inducible. Esto se ha logrado gracias al empleo de transgenes asociados a promotores específicos de endotelio. Las cruzas de ratones con modificaciones genéticas en el endotelio con aquellos que están genéticamente programados para desarrollar tumores, permite recapitular con gran precisión el papel de la angiogénesis tumoral en la progresión del cáncer.

**Conclusiones**

El desarrollo de tumores se ve favorecido por la formación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a estímulos angiogénicos secretados por el tumor mismo. Este proceso se considera blanco de terapia antitumoral. Para ello es primordial la caracterización de los factores angiogénicos y linfangiogénicos, los receptores que los reconocen y las proteínas de transducción de señales necesarias para la formación de vasos sanguíneos que nutren a los tumores. La perspectiva es lograr combatir el crecimiento tumoral y el establecimiento de metástasis. Bajo esta premisa se han desarrollado agentes terapéuticos que han demostrado su efectividad en pacientes con distintos tipos de cáncer. El caso paradigmático lo constituye el desarrollo y uso clínico de una terapia contra el VEGF, sin embargo esta terapia no es suficiente para combatir todos los tipos de cáncer, por lo que falta descubrir nuevos blancos moleculares que lleven al desarrollo de enfoques terapéuticos alternativos. Con este fin, nuestro grupo se ha enfocado a la caracterización de las proteínas de transducción de señales angiogénicas vinculadas a la activación de las GTPasas de la familia de Rho, y al movimiento celular implicado en la formación de vasos sanguíneos tumorales.

**Agradecimientos**

Nuestros estudios, orientados a entender los aspectos moleculares de la migración de células endoteliales y su relevancia en procesos angiogénicos, son apoyados con recursos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). Agradecemos a Estanislao Escobar Islas y a David Pérez Rangel por su apoyo técnico.

**M. en C. Ismael Bracho Valdés, estudiante de Doctorado en Farmacología. Dirigir la correspondencia a José Vázquez Prado, investigador del departamento de Farmacología CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360,*

*Apartado postal 14-740, 07000 México, D.F. Tel: (52-55) 5747-3380. Email: jvazquez@cinvestav.mx*

Para conocer más sobre el tema de manera gráfica consulte la liga: http://ayp.calypso-media.com/infografia/angiogenesis.html

**Referencias**

1. Cueni LN, Detmar M. *New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease.* J Invest Dermatol, 2006; 126(10):2167-77.

2. Carmeliet P. *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003; 9(6):653-60.

3. Jain RK. *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003; 9(6):685-93.

4. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. *Lymphangiogenesis in development and human disease*. Nature, 2005; 438(7070):946-53.

5. Ferrara N, Kerbel RS. *Angiogenesis as a therapeutic target*. Nature, 2005; 438(7070):967-74.

6. Kerbel RS. *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008; 358(19):2039-49.

7. Carmeliet P. *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005; 438(7070):932-6.

8. Karpanen T, Alitalo K. *Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis*. Annu Rev Pathol, 2008; 3:367-97.

9. Adams RH, Alitalo K. *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007; 8(6):464-78.

10. Folkman J. *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007; 6(4):273-86.

11. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. *Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells*. Genes Dev, 2008; 22(5):559-74.

12. De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. *Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications*. Trends Immunol, 2007; 28(12):519-24.

13. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. *The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification*. Nat Rev Cancer, 2006; 6(11):835-45.

14. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. *Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis*. Science, 2008; 319(5860):195-8.

15. Ramirez-Rangel I, Bracho-Valdes I, Vazquez-Macias A, Carretero-Ortega J, Reyes-Cruz G, Vazquez-Prado J. *Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57*. Mol Cell Biol, 2011; 31(8):1657-71.

16. Bracho-Valdes I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martinez I, Robles-Molina E, Chavez-Vargas L, Vazquez-Prado J. *mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused*. IUBMB Life, 2011; 63(10):880-98.

17. Ledezma-Sanchez BA, Garcia-Regalado A, Guzman-Hernandez ML, Vazquez-Prado J. *Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2010; 391(4):1647-52.

18. Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernandez-Garcia R, Reyes-Cruz G, Brown JH, Vazquez-Prado J. *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis*. Mol Pharmacol 2010;77(3):435-42.

19. Guzman-Hernandez ML, Vazquez-Macias A, Carretero-Ortega J, Hernandez-Garcia R, Garcia-Regalado A, Hernandez-Negrete I, et al. *Differential inhibitor of Gbetagamma signaling to AKT and ERK derived from phosducin-like protein: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and in vitro angiogenesis*. J Biol Chem, 2009; 284(27):18334-46.

20. Garcia-Regalado A, Guzman-Hernandez ML, Ramirez-Rangel I, Robles-Molina E, Balla T, Vazquez-Prado J, et al. *G protein-coupled receptor-promoted trafficking of Gbeta1gamma2 leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by Gbeta1gamma2-Rab11a interaction*. Mol Biol Cell, 2008; 19(10):4188-200.

21. Hernandez-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernandez-Garcia R, Calderon-Salinas JV, Reyes-Cruz G, et al. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. J Biol Chem, 2007; 282(32):23708-15.

22. Vazquez-Prado J, Miyazaki H, Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. *Chimeric G alpha i2/G alpha 13 proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G alpha 13*. J Biol Chem, 2004; 279(52):54283-90.

23. Vazquez-Prado J, Basile J, Gutkind JS. *Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors*. Methods Enzymol, 2004; 390:259-85.

24. Rosenfeldt H, Vazquez-Prado J, Gutkind JS. *P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor*. FEBS Lett, 2004; 572(1-3):167-71.

25. Vázquez-Prado J, Guzmán-Hernández M, Carretero-Ortega J, Sánchez-Barbosa S, Hernández-García R, Reyes-Cruz G. *Mecanismos moleculares de la migración de células endoteliales y angiogénesis: papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho*. In: Flores-Herrera O O-HJ, Rendon-Huerta E, Velazquez-Lopez I, editor. *Mensaje Bioquimico*. Mexico City: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Medicina; 2006. p. 77-104.

26. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. *Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring*. Nature, 2005; 436(7048):193-200.

27. Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. *Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation*. Genes Dev, 2005; 19(9):1013-21.

28. Rudolf V. *Die Krankhaften Geschwulste*. August Hirschwald, Berlin; 1863.

29. Goldman E. *Growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to vascular system*. Proc. R. Soc. Med. 1907;1:1-13.

30. Clark ER, Clark, E.L. *Observations on living preformed blood vessels as seen in a transparent chamber inserted into the rabbit ear*. Am. J. Anat. 1932; 49:441-447

31. Ide AG, Baker, N.H. & Warren, S.L. *Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber*. Am. J. Roentgenol 1939; 42:891-899.

32. Algire GH. *An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse*. J. Natl. Cancer Inst. 1943; 4:1-11.

33. Algire GH. *Microscopic studies of the early growth of a transplantable melanoma of the mouse, using the transparent-chamber technique*. J. Natl. Cancer Inst. 1943; 4:13-20.

34. Algire GH, Chalkeley, H.W., Legallais, F.Y. & Park, H.D. *Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants*. J. Natl. Cancer Inst. 1945; 6:73-85.

35. Michelson IC. *The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders*. Trans. Ophthalmol. Soc. UK 1948; 68:137-180.

36. Greenblatt M, Shubi P. *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique*. J Natl Cancer Inst 1968; 41(1):111-24.

37. Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma. *Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy*. J Natl Cancer Inst 1968; 41(6):1329-41.

38. Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med 1971; 285(21):1182-6.

39. Vinay Kumar AKA, Nelson Fausto. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* Seventh Edition ed. Philadelphia, Pennsylvania.; 2005.

40. Yokota J, Sugimura T. *Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes*. Faseb J 1993;7(10):920-5.

41. Nguyen DX, Massague J. *Genetic determinants of cancer metastasis*. Nat Rev Genet 2007; 8(5):341-52.

42. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, et al. *Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2*. J Clin Invest 2002; 109(6):777-85.

43. Sakariassen PO, Prestegarden L, Wang J, Skaftnesmo KO, Mahesparan R, Molthoff C, et al. *Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(44):16466-71.

44. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. *Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma*. Nat Rev Cancer 2003; 3(6):411-21.

45. Renan MJ. *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Mol Carcinog 1993; 7(3):139-46.

46. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell 2000; 100(1):57-70.

47. Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med 2003; 9(6):677-84.

48. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Activation of the HIF pathway in cancer*. Curr Opin Genet Dev 2001; 11(3):293-9.

49. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature 2003; 425(6955):307-11.

50. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature 2001; 410(6824):50-6.

51. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell 2005; 121(3):335-48.

52. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, et al. *HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. Cancer Cell 2008; 13(3):206-20.

53. Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell 1996; 86(3):353-64.

54. Dor Y, Porat R, Keshet E. *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280(6):C1367-74.

55. Kerbel R, Folkman J. *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*. Nat Rev Cancer 2002; 2(10):727-39.

56. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol 2000; 2(10):737-44.

57. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature 2000; 407(6801):242-8.

58. Vázquez-Prado José G-HML, Carretero-Ortega Jorge, Sánchez-Barbosa Sandra, Hernández-García Ricardo y Guadalupe Reyes Cruz. *Mecanismos moleculares de la migración de células endoteliales y angiogénesis: Papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho*. Distrito Federal, México; 2006.

59. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. S*elective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest 1999; 103(2):159-65.

60. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol 2002; 160(3):985-1000.

61. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. *Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy*. Nature 2004; 429(6992):629-35.

62. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. *Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis*. Cancer Cell 2007; 11(6):539-54.

63. Nanda A, St Croix B. *Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy*. Curr Opin Oncol 2004; 16(1):44-9.

64. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. *Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents*. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(15):1622-54.

65. Valadon P, Garnett JD, Testa JE, Bauerle M, Oh P, Schnitzer JE. *Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(2):407-12.

53. Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell 1996; 86(3):353-64.

54. Dor Y, Porat R, Keshet E. *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280(6):C1367-74.

55. Kerbel R, Folkman J. *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*. Nat Rev Cancer 2002; 2(10):727-39.

56. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol 2000; 2(10):737-44.

57. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature 2000; 407(6801):242-8.

58. Vázquez-Prado José G-HML, Carretero-Ortega Jorge, Sánchez-Barbosa Sandra, Hernández-García Ricardo y Guadalupe Reyes Cruz*. Mecanismos moleculares de la migración de células endoteliales y angiogénesis: Papel regulador de las GTPasas de la familia de Rho*. Distrito Federal, México; 2006.

59. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. S*elective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest 1999; 103(2):159-65.

60. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol 2002; 160(3):985-1000.

61. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. *Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy*. Nature 2004; 429(6992):629-35.

62. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. *Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis*. Cancer Cell 2007; 11(6):539-54.

63. Nanda A, St Croix B. *Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy*. Curr Opin Oncol 2004; 16(1):44-9.

64. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. *Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents*. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(15):1622-54.

65. Valadon P, Garnett JD, Testa JE, Bauerle M, Oh P, Schnitzer JE. *Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(2):407-12.

66. Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, et al. *Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung*. Nat Biotechnol 2007; 25(3):327-37.

67. Jain RK. *Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer*. Nat Rev Cancer 2008; 8(4):309-16.

68. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nat Med 2001; 7(11):1194-201.

69. Arap W, Pasqualini R. *Engineered embryonic endothelial progenitor cells as therapeutic Trojan horses*. Cancer Cell 2004; 5(5):406-8.

70. Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, et al. *Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery*. Cancer Cell 2004; 5(5):477-88.

71. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, et al. *Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors*. Science 2006; 313(5794):1785-7.

72. Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, et al. *Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents*. Cancer Cell 2008; 14(3):263-73.

73. Weidner N. *Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow*. J Pathol 1998; 184(2):119-22.

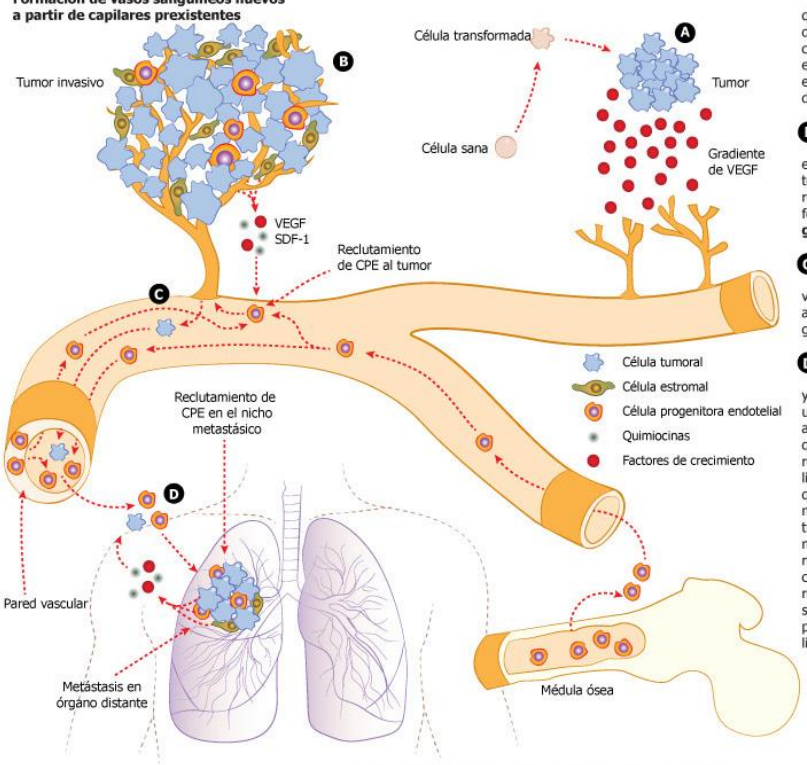
## 1. Cartel del artículo de divulgación: Angiogénesis tumoral.

# ANGIOGÉNESIS TUMORAL, CLAVE EN TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

En el cáncer, la proliferación descontrolada de células tumorales requiere del suministro de oxígeno y nutrientes. El crecimiento tumoral favorece la generación de vasos sanguíneos que a su vez contribuyen al crecimiento del tumor y al establecimiento de metástasis. Por lo tanto, se considera a la angiogénesis tumoral como un proceso susceptible a inhibición con fines terapéuticos

### Angiogénesis

**Formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de capilares prexistentes**




**A** En condiciones de hipoxia, las células neoplásicas y del estroma que quedan atrapadas en el centro de la masa tumoral expresan una capacidad angiogénica consistente en la liberación de factores, como el **VEGF**, que estimulan la formación de vasos sanguíneos

**B** De esta forma favorecen el crecimiento del tumor al asegurar el suministro de oxígeno y nutrientes que les permiten cubrir sus requerimientos metabólicos, este fenómeno es conocido como **angiogénesis tumoral**

**C** Las células tumorales también se diseminan a **órganos distantes** vía los vasos sanguíneos asociados al tumor o los vasos sanguíneos del ganglio centinela

**D** Las células del estroma tumoral (fibroblastos, células inflamatorias y del sistema inmune) constituyen una fuente adicional de factores angiogénicos, además producen quimiocinas como el **SDF-1**, el cual recluta células progenitoras endoteliales derivadas de la **médula ósea** que participan activamente en la neovascularización en el sitio tumoral primario o en el nicho metastásico. Además, se ha sugerido fuertemente la movilización de células progenitoras endoteliales residentes en la pared de los vasos sanguíneos para contribuir a este pool de células progenitoras endoteliales circulantes

### Recorrido histórico

A mediados del **siglo XIX**, **Rudolf Virchow** hizo las primeras observaciones en tumores humanos que evidenciaron la estructura anormal de los vasos sanguíneos tumorales

Pocas décadas más tarde, el crecimiento tumoral y la formación de vasos sanguíneos empezaron a ser considerados eventos asociados

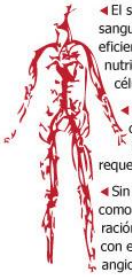
Fue en la década de **1930** cuando se estudió por primera vez en un animal vivo el patrón de ramificación de vasos sanguíneos en la oreja de conejos a quienes se les colocaron cámaras transparentes

La primera asociación entre el crecimiento tumoral y un infiltrado de vasos sanguíneos recién formados, en un modelo tumoral en conejo, data de **1939**

En la década de los **cuarenta** se observó que existen vasos sanguíneos que se dirigen hacia un tumor. Posteriormente se describió la existencia de una actividad angiogénica regulada por oxígeno, que en la retina mediaba el crecimiento anormal de vasos sanguíneos

La existencia de un "factor tumoral difusible", con capacidad de atraer nuevos vasos sanguíneos hacia un tumor en desarrollo, fue demostrada en **1968**

En **1971**, **Judah Folkman** introdujo el concepto de que los inhibidores de la angiogénesis podrían usarse como terapia contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis, como la retinopatía diabética



El sistema vascular, constituido por vasos sanguíneos y linfáticos, permite un transporte eficiente y simultáneo de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalización y células circulantes entre tejidos y órganos

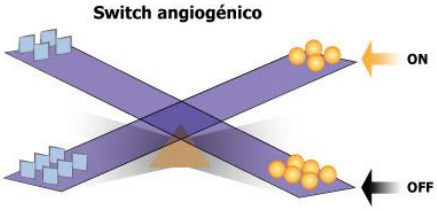
Este sistema contribuye a que las células de todo el organismo se mantengan informadas de su entorno y cubran sus requeri-mientos de oxígeno y nutrientes

Sin embargo, el desarrollo de enfermedades como el cáncer se ve favorecido por la generación de vasos sanguíneos que crecen junto con el tumor, este proceso es conocido como angiogénesis tumoral

### Modelos animales

**Varios modelos tumorales en ratones han servido para avanzar en la caracterización de la angiogénesis tumoral. Se ha extendido el uso de ratones modificados genéticamente en los que se altera la función de oncogenes y genes supresores de tumores**

### Switch angiogénico




El desarrollo de vasos sanguíneos asociados a tumores puede ocurrir de manera muy pronunciada. A esta etapa de transición entre un estado no vascularizado que limita el crecimiento tumoral y un estado de formación rápida de vasos sanguíneos se conoce como switch angiogénico

Activadotes (VEGF, bFGF, IL-8)
Inhibidores (thrombospondin-1, angiostatin, interferon-∞, -8)

Fuente: **Ismael Bracho Valdés y José Vázquez Prado. Departamento de Farmacología, CINVESTAV del IPN**

Infografía: **poliedro.mx**